

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

Génétique des cardiopathies rythmiques et dégénératives

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale : Chimie-Biologie

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Génétique moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

Solena LE SCOUARNEC

Le 23 mai 2008, devant le jury ci-dessous

Président M. Hervé LE MAREC, PU-PH, l'institut du thorax, CHU de Nantes

Rapporteurs M. Patrice BOUVAGNET, MCU-PH, EA 4171, Université Lyon 1
M. Claude FEREC, PU-PH, Inserm U613, Université de Brest

Examineurs

M. Xavier JEUNEMAITRE, PU-PH, Département de génétique, HEGP, Paris
M. Philippe MABO, PU-PH, Service de cardiologie, CHU de Rennes

Directeur de thèse M. Jean-Jacques SCHOTT, DR, Inserm U915, Nantes

Table des matières

A- AVANT-PROPOS	11
B- INTRODUCTION GENERALE	13
C- GENETIQUE DES TROUBLES DU RYTHME HEREDITAIRES	25
I- INTRODUCTION	26
I.1- GENERALITES SUR LA MORT SUBITE ET LES TROUBLES DU RYTHME CARDIAQUE	26
I.2- GENETIQUE DES TROUBLES DU RYTHME CARDIAQUE PRIMAIRES	32
I.2.1- Génétique du syndrome du QT long	32
I.2.2- Génétique du syndrome du QT court	36
I.2.3- Génétique du syndrome de Brugada	38
I.2.4- Génétique des tachycardies ventriculaires catécholergiques	44
I.2.5- Génétique de la fibrillation auriculaire	46
I.2.6- Génétique de la dysfonction sinusale	48
I.2.7- Génétique des troubles de conduction	49
I.2.8- Les syndromes chevauchants	51
I.2.8.1- Na _v 1.5, ses sous-unités β, et les canalopathies associées	51
1- Sous-unités α du canal sodique	52
2- Sous-unités β régulatrices du canal sodique	52
3- Implication dans les arythmies cardiaques	53
I.2.8.2- Du syndrome du QT long de type 4 au syndrome ankyrine-B	56
1- Les ankyrines, protéines d'ancrages	56
2- Implication de l'ankyrine-B dans le SQTl de type 4	59
3- Le syndrome ankyrine-B	62
II- RESULTATS ET DISCUSSION	64
II.1- PROJET #1 : COMPREHENSION DES RELATIONS GENOTYPE-PHENOTYPE DANS LE SYNDROME ANKYRINE-B	64
II.1.1- Etude #1a : Caractérisation d'une seconde grande famille liée au locus <i>ANK2</i>	64
II.1.1.1- Article 1 : Etude phénotypique de la famille Ma	64
II.1.1.2- Article 1 : Etude génétique de la famille Ma	65
II.1.1.3- Recherche de la mutation au niveau du locus <i>ANK2</i>	65
1- Description et séquençage de nouveaux exons du gène <i>ANK2</i>	65
2- Séquençage d'autres gènes du locus	66
II.1.1.4- Nouvel élément en faveur du gène <i>ANK2</i> et étude des régions non-codantes	67
1- Séquençage du promoteur proximal et de la région 3'UTR	67

2- Séquençage des régions conservées	67
3- Recherche de grands réarrangements par CGH-array	69
II.1.2- Etude #1b : Identification de nouvelles mutations du gène <i>ANK2</i>	106
II.1.2.1- Article 2 : Objectifs	106
II.1.2.2- Article 2 : Résultats	107
II.1.3- Discussion (projet #1)	110
II.2- PROJET #2 : ETUDE GENETIQUE D'UN SYNDROME DE REPOLARISATION PRECOCE MALIGNNE	114
II.2.1- Article 3 : Description clinique du syndrome	114
II.2.2- Etude génétique du syndrome	116
II.2.2.1- Approche gène candidat : étude de cas isolés	116
II.2.2.2- Approche familiale : étude de la famille B	117
1- Etude clinique de la famille B	117
2- Etude génétique de la famille B	121
II.2.3- Discussion (projet #2)	124
II.3- PROJET #3 : RECHERCHE DE NOUVEAUX GENES POUR LE SYNDROME DE BRUGADA	126
II.3.1- Etude #3a : Importance du fond génétique	126
II.3.2- Etude #3b : Approche gène candidat : la sous-unité $\beta 1$ du canal sodique	128
II.3.2.1- Article 4 : Objectifs	128
II.3.2.2- Article 4 : Résultats	128
II.3.3- Etude #3c : Approche familiale : recherche d'un nouveau gène de syndrome de Brugada	131
II.3.3.1- Résumé des travaux antérieurs	131
II.3.3.2- Résultats	132
1- Identification d'une nouvelle branche familiale	132
2- Poursuite de l'hypothèse du locus du chromosome 17	132
3- Identification d'un polymorphisme fréquent : <i>SCN5A-F2004L</i>	134
4- Analyse de liaison pan-génomique sur la nouvelle branche familiale	134
II.3.4- Discussion (projet #3)	137
III- DISCUSSION ET PERSPECTIVES (PROJETS #1, #2, #3)	139
D- GENETIQUE DU RETRECISSEMENT AORTIQUE CALCIFIE	141
I- INTRODUCTION	142
I.1- GENERALITES SUR LE RETRECISSEMENT AORTIQUE	142
I.2- ASPECTS CLINIQUES	145
I.2.1- Facteurs de risque, symptômes, et pronostic	145
I.2.2- Diagnostic	147
I.2.3- Prise en charge thérapeutique : le remplacement chirurgical valvulaire	147
I.3- HYPOTHESES PHYSIOPATHOLOGIQUES	149
I.3.1- Aspects histologiques	152

I.3.1.1- Réaction inflammatoire	152
I.3.1.2- Accumulation de lipides	153
I.3.1.3- Remodelage de la matrice extracellulaire (MEC)	153
I.3.1.4- Processus de calcification et ossification	154
I.3.2- Modèles animaux	156
I.3.3- Aspects génétiques	157
II- RESULTATS - PROJET #4 : RECHERCHE DU PREMIER GENE DE RETRECISSEMENT AORTIQUE CALCIFIE	161
II.1- ENQUETE CLINIQUE ET GENETIQUE : IDENTIFICATION DE FORMES FAMILIALES	161
II.1.1- Article 5 : Objectifs	161
II.1.2- Article 5 : Résultats	161
II.2- ANALYSE DE LIAISON PAN-GENOMIQUE	164
II.2.1- <i>LOD scores</i> deux-point	167
II.2.2- <i>LOD scores</i> multi-point	169
III- DISCUSSION ET PERSPECTIVES (PROJET #4)	171
<u>E- CONCLUSION GENERALE</u>	178
<u>F- ANNEXES</u>	180
I- ANNEXE 1 : L'ACTIVITE NORMALE DU CŒUR	181
I.1- ANATOMIE ET FONCTIONNEMENT DU CŒUR	181
I.2- CYCLE CARDIAQUE ET CARDIOMYOCYTES	182
I.3- LES CANAUX JONCTIONNELS : LES CONNEXINES	184
I.4- L'ACTIVITE ELECTRIQUE CARDIAQUE	186
I.4.1- Au niveau cellulaire : potentiel d'action, canaux, et courants ioniques	186
I.4.2- L'électrocardiogramme de surface	189
II- ANNEXE 2 : MATERIEL ET METHODES	192
II.1- APPROCHE FAMILIALE POUR L'IDENTIFICATION DE NOUVEAUX GENES	192
II.1.1- Etape clinique : identification et recrutement des familles	192
II.1.2- Etape génétique : analyse de liaison et « clonage positionnel »	193
II.1.2.1- La recombinaison méiotique	193
II.1.2.2- Principe de l'analyse de liaison	194
II.1.2.3- Protocole de génotypage des marqueurs microsatellites	196
1- Analyse de liaison pan-génomique	196
2- Analyse des loci candidats	196
II.1.2.4- Protocole de génotypage des SNP	197
II.1.2.5- Mesure statistique de la liaison génétique	199

II.2- RECHERCHE DE VARIANTS DANS LES GENES OU REGIONS CANDIDATES	200
II.2.1- Polymorphisme ou mutation ?	200
II.2.2- Protocoles de détection de mutations ponctuelles ou micro-réarrangements	201
II.2.2.1- Séquençage direct	201
II.2.2.2- DHPLC (<i>Denaturing High Performance Liquid Chromatography</i>)	201
II.2.2.3- Restriction par digestion enzymatique	203
II.2.3- Protocole de détection de réarrangements génomiques	203
II.3- ANALYSE TRANSCRIPTIONNELLE : LA TECHNIQUE DE RT-PCR	205
II.3.1- Extraction d'ARN	205
II.3.2- Transcription inverse (RT)	205
II.3.3- PCR en temps réel : quantification relative des transcrits	205
II.3.4- Recherche de nouveaux exons dans le gène <i>ANK2</i>	206
III- ANNEXE 3 : RESULTATS	208
III.1- GENES PRESENTS DANS L'INTERVALLE DE LIAISON DE LA FAMILLE MA	208
III.2- SEQUENCES DES NOUVEAUX EXONS DU GENE <i>ANK2</i>	210
III.3- SEQUENCES DES REGIONS INTRONNIQUES CONSERVEES DU GENE <i>ANK2</i>	210
III.4- VARIANTS IDENTIFIES PAR LE CRIBLAGE DU GENE <i>ANK2</i>	210
G- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	215

Table des illustrations

Liste des figures

Figure 1 – Evolutions technologiques en génétique et implications en médecine	15
Figure 2 – Accélération de la découverte de gènes morbides entre 1981 et 2002	16
Figure 3 – Transmission des maladies monogéniques et complexes (multigéniques)	20
Figure 4 – Mécanismes de la mort subite cardiaque par arythmie ventriculaire	26
Figure 5 – ECG caractéristiques (1) des troubles du rythme primaires ayant une origine génétique (SQTL, SQTC, SBr)	29
Figure 6 – ECG caractéristiques (2) des troubles du rythme primaires ayant une origine génétique (TVC, FA, DS, TdC)	30
Figure 7 – Représentation schématique des protéines impliquées dans les arythmies cardiaques	31
Figure 8 – Rôle dans le PA des canaux ioniques impliqués dans le SQTL	32
Figure 9 – Hypothèses sur la modification des PA dans le ventricule droit, expliquant la manifestation du syndrome de repolarisation précoce bénin et du SBr à l'ECG	41
Figure 10 – Représentation schématique du canal sodique voltage-dépendant	51
Figure 11 – Représentation schématique des mutations du gène <i>SCN5A</i> et leur localisation sur le canal Na _v 1.5	54
Figure 12 – Domaines fonctionnels et différentes isoformes des ankyrines R, B, G	57
Figure 13 – Représentation schématique des domaines de l'ankyrine et ses interactions protéiques	58
Figure 14 – ECG d'un patient de la première famille SQTL4	59
Figure 15 – Le « complexe ankyrine-B » cardiaque	61
Figure 16 – Hypothèses sur les conséquences potentielles d'un défaut ankyrine-B dans l'activité électrique cardiaque	61
Figure 17 – Pedigree des propositus identifiés avec des mutations <i>ANK2</i> par un criblage à grande échelle de 664 patients	62
Figure 18 – Représentation schématique des exons des transcrits cardiaques du gène <i>ANK2</i>	66
Figure 19 – Représentation des régions conservées (ECR, <i>Evolutionary Conserved Regions</i>) du gène <i>ANK2</i> entre différentes espèces et l'homme	68
Figure 20 – Recherche de réarrangements génomiques dans le gène <i>ANK2</i> et le locus 4q25-q27 dans la famille Ma par CGH-array	70
Figure 21 – Arbre généalogique de la famille B montrant un haplotype commun aux patients considérés atteints pour l'analyse de liaison en 19p13.3	118
Figure 22 – ECG de deux patients de la famille B montrant syndrome de repolarisation précoce maligne ou tachycardie/fibrillation ventriculaire	120
Figure 23 – Représentation des valeurs de <i>LOD scores</i> multi-point obtenues par analyse paramétrique des SNP sur la famille B avec l'algorithme Merlin	123

Figure 24 – Absence de la mutation familiale <i>SCN5A</i> chez une patiente présentant un SBr	126
Figure 25 – Arbres généalogiques des famille Mo (branches 1 et 2) et famille L (île de la Réunion)	133
Figure 26 – Représentation graphique des valeurs de <i>LOD scores</i> pour l'analyse de liaison pan-génomique sur les deux branches de la famille Mo	135
Figure 27 – Valve aortique humaine saine	143
Figure 28 – Valves aortiques humaines avec RA dégénératif sur valve tricuspide (A) ou bicuspide (B) et RA rhumatismal (C)	145
Figure 29 – Mécanismes potentiels simplifiés de l'inflammation et l'infiltration lipidique conduisant à la calcification de la valve aortique	150
Figure 30 – Représentation schématique de l'épaississement d'un feuillet de valve sténosée en comparaison avec une valve normale	151
Figure 31 – Arbre généalogique de la famille A'	165
Figure 32 – Information associée aux SNP ou aux microsatellites selon la disponibilité ou non des génotypes parentaux	174
Figure 33 – Arbres généalogiques des petites familles atteintes de RAC	176
Figure 34 – Structure du cœur	181
Figure 35 – Les valves cardiaques	182
Figure 36 – Le cœur et le tissu de conduction	183
Figure 37 – Couplage excitation-contraction dans les cardiomyocytes	184
Figure 38 – Structure des jonctions communicantes	185
Figure 39 – Représentation des principaux courants ioniques responsables des potentiels d'action auriculaires et ventriculaires humains et des canaux ioniques associés	187
Figure 40 – Potentiels d'action épicardique et endocardique chez l'homme	188
Figure 41 – L'ECG, manifestation du fonctionnement électrique du cœur	189
Figure 42 – Principaux paramètres de l'ECG	191
Figure 43 – Principe de la liaison génétique	193
Figure 44 – Exemple simplifié d'analyse de liaison ou non-liaison entre un marqueur génétique et une pathologie	194
Figure 45 – Marqueurs génétiques : microsatellites et SNP	195
Figure 46 – Protocole de génotypage avec la puce GeneChip® 250K Nsp I	198
Figure 47 – Principe de la détection de variants par DHPLC	202
Figure 48 – Principe de la détection de réarrangements génomiques par CGH- <i>array</i>	203
Figure 49 – Représentation schématique de la méthode du $2^{-\Delta Ct}$	206

Liste des tableaux

Tableau 1 – Caractéristiques cliniques des troubles du rythme cardiaques primaires héréditaires	28
Tableau 2 – Gènes identifiés dans le syndrome du QT long congénital	33
Tableau 3 – Gènes identifiés dans le syndrome du QT court	37
Tableau 4 – Gènes identifiés dans le syndrome de Brugada	39
Tableau 5 – Gènes et locus identifiés dans les tachycardies ventriculaires polymorphes catécholergiques	45
Tableau 6 – Gènes et loci identifiés dans la fibrillation auriculaire	47
Tableau 7 – Gènes identifiés dans la dysfonction sinusale	48
Tableau 8 – Gène et locus identifiés dans les troubles de conduction cardiaque progressifs isolés	50
Tableau 9 – Sous-unités β du canal sodique	53
Tableau 10 – Polymorphismes des ECR du gène <i>ANK2</i> séquencés dans la famille Ma	69
Tableau 11 – Gènes séquencés chez les patients « syndrome de repolarisation précoce »	116
Tableau 12 – Caractéristiques cliniques des individus de la famille B	119
Tableau 13 – Critères simplifiés pour le diagnostic du RAC	147
Tableau 14 – Caractéristiques des individus de la famille A' inclus dans l'analyse de liaison	166
Tableau 15 – Analyse de liaison sur la famille A' : <i>LOD scores</i> deux-point	168
Tableau 16 – Analyse de liaison sur la famille A' : <i>LOD scores</i> multi-point	170
Tableau 17 – Gènes situés entre les marqueurs microsatellites D4S1572 et D4S427	208
Tableau 18 – Séquences nucléotidiques et protéiques prédites des nouveaux exons cardiaques du gène <i>ANK2</i> humain	211
Tableau 19 – Séquences humaines des régions introniques conservées du gène <i>ANK2</i>	212
Tableau 20 - Variants introniques et exoniques identifiés par le criblage du gène <i>ANK2</i> sur 47 patients « Brugada » (exons 13 à 23) et 282 patients « arythmies » (exons 35 à 46)	214

Table des publications

- Article 1** 71
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, Anderson ME, Schott JJ, Mohler PJ.
Failure to target, failure to pace: Dysfunction in ankyrin-B-dependent ion channel and transporter targeting causes human sinus node disease.
Soumis.
- Article 2** 109
Mohler PJ, Le Scouarnec S, Denjoy I, Lowe JS, Guicheney P, Caron L, Driskell IM, Schott JJ, Norris K, Leenhardt A, Kim RB, Escande D, Roden DM.
Defining the cellular phenotype of "ankyrin-B syndrome" variants: human ANK2 variants associated with clinical phenotypes display a spectrum of activities in cardiomyocytes.
Circulation. 2007. 115(4):432-41. IF : 10,94.
- Article 3** 115
Haïssaguerre M, Derval N, Sacher F, Jesel L, Deisenhofer I, De Roy L, Pasquié JL, Nogami A, Babuty D, Yli-Mayry S, De Chillou C, Scanu P, Mabo P, Matsuo S, Probst V, Le Scouarnec S, Defaye P, Schlaepfer J, Rostock T, Lacroix D, Lamaison D, Lavergne T, Aizawa Y, Englund A, Anselme F, O'Neill M, Hocini M, Lim KT, Knecht S, Veenhuyzen GD, Bordachar P, Chauvin M, Jais P, Coureau G, Chene G, Klein GJ, Clémenty J.
Sudden cardiac arrest associated with early repolarization.
The New England Journal of Medicine. 2008. 358(19):2016-23. IF : 51,296.
- Article 4** 130
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, Kääb S, Wichmann HE, Hasdemir C, Aizawa Y, Wilde AA, Roden DM, Bezzina CR.
Sodium channel beta-1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans.
Journal of Clinical Investigation. 2008. 118(6):2260-68. IF : 15,754.
- Article 5** 163
Probst V, Le Scouarnec S, Legendre A, Jousseau V, Jaafar P, Nguyen JM, Chaventre A, Le Marec H, Schott JJ.
Familial aggregation of calcific aortic valve stenosis in the western part of France.
Circulation. 2006. 113(6):856-60. IF : 10,94.

* : Contribution équivalente. IF : Impact factors 2006.

Liste des abréviations

BAV	B loc a uriculo- v entriculaire
bpm	B attements p ar m inute
CGH	<i>Comparative genomic hybridization</i> (Hybridation génomique comparative)
cM	centiM organ
CNV	<i>Copy Number Variation</i> (Variation de nombre de copies)
DAVD	D ysplasie a rythmogène du v entricule d roit
DHPLC	<i>Denaturing high performance liquid chromatography</i> (Chromatographie liquide à haute pression en condition dénaturante)
DS	D ysfonction s inusale
ECG	E lectro c ardiogramme
ECR	<i>Evolutionary conserved regions</i> (Régions conservées avec l'évolution)
FA	F ibrillation a uriculaire
FV	F ibrillation v entriculaire
Ind	I ndividu
InsP(3)	<i>Inositol 1,4,5-triphosphate</i>
kb	k ilobases
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i> (Lipoprotéine de faible densité)
Mb	M égabases
MGP	<i>Matrix GLA Protein</i>
MS(C)	M ort s ubite (c ardiaque)
PA	P otentiel d' a ction
pb	P aires de b ases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Réaction de polymérisation en chaîne)
RA(C)	R étrécissement a ortique (c alcifié)
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RS	R éticulum s arcoplasmique
SBr	S yndrome de B rugada
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (Polymorphisme d'un nucléotide unique)
SQTC	S yndrome du Q T c ourt
SQTL	S yndrome du Q T l ong
SRPM	S yndrome de repolarisation p récoce m aligne
TBE	T ris- B orate- E DTA
TdC	T roubles d e c onduction
TdP	T orsade d e p ointes
TV	T achycardie v entriculaire
TVC	T achycardie v entriculaire polymorphe c atécholergique
UTR	<i>Untranslated region</i> (Région non traduite)
VDR	<i>Vitamin D receptor</i>

A- Avant-propos

Les maladies cardio-vasculaires sont la première cause de mortalité dans les pays développés, avec près de 180 000 décès par an en France, soit un tiers des décès totaux. Le nombre des décès imputables à ces maladies est susceptible d'augmenter avec le vieillissement de la population. Cependant, la mortalité diminue chaque année grâce à une meilleure prévention et une meilleure prise en charge thérapeutique.

La thématique de recherche de l'unité Inserm (U533 puis U915 depuis le 1^{er} janvier 2008) au sein de l'institut du thorax a pour objectif la compréhension et la mise en place de stratégies thérapeutiques pour les cardiopathies graves à risque de mort subite et les pathologies vasculaires et respiratoires. Les projets de recherche reposent sur une approche pluridisciplinaire et intégrée, en collaboration étroite avec la partie clinique de l'institut, associant l'identification des bases moléculaires, la compréhension des mécanismes physiopathologiques, et la thérapie cellulaire et génique de ces pathologies.

La compréhension des maladies cardio-vasculaires, bien que complexe, est en pleine expansion grâce au développement de nouveaux outils cliniques et moléculaires. Dans la plus grande majorité des cas, les maladies cardio-vasculaires ont une origine multiple, et sont associées à des facteurs de risque (âge, sexe, cholestérol, tabagisme, hypertension) et des facteurs environnementaux. Pour certaines pathologies, une origine génétique est en revanche clairement établie. Ces formes génétiques dont l'expressivité est parfois modulée par les facteurs environnementaux correspondent, selon leur niveau de complexité, soit à des **pathologies monogéniques** (à transmission mendélienne), où un gène majeur est à l'origine du mécanisme pathologique, soit à des **pathologies multigéniques**, où l'association de plusieurs gènes est nécessaire pour développer une pathologie.

C'est dans ce contexte que l'équipe de génétique a contribué à l'identification de nouveaux gènes pour des pathologies cardiaques monogéniques. Ceci a été rendu possible par la découverte de formes familiales rares permettant des études d'**analyse de liaison** ne nécessitant pas d'établir d'hypothèses physiologiques au préalable. Il est ensuite nécessaire une fois qu'un gène est identifié d'étendre nos connaissances sur les **relations génotype-phénotype**. Enfin il est reconnu par les cliniciens et les généticiens qu'une même mutation cause parfois un large spectre de sévérité de la maladie, des porteurs sains aux patients sévèrement atteints. A plus long terme le défi sera donc d'identifier les gènes modificateurs et les facteurs environnementaux déterminants dans l'expressivité phénotypique.

B- Introduction générale

Evolutions conceptuelles et technologiques en génétique moléculaire

Dans les premières tentatives pour comprendre les origines des maladies humaines, les études étaient souvent descriptives, basées sur l'observation de l'ensemble des caractères morphologiques et physiopathologiques de la maladie. Bien après la première étude scientifique sur les fondements de l'hérédité par Gregor Mendel au 19^e siècle, les avancées technologiques du 20^e siècle en biologie moléculaire ont largement contribué à la compréhension des maladies rares héréditaires (Figure 1). Depuis 2003, la séquence complète du génome humain est connue. Les enjeux actuels consistent à comprendre le rôle des éléments encore peu explorés du génome et l'organisation de la régulation de l'expression des gènes : mécanismes épigénétiques pouvant modifier durablement la transcription, effet des séquences régulatrices et des polymorphismes (SNP et variations de nombre de copies), et fonction des transcrits non-codants (siRNA, miRNA). L'ensemble de ces nouvelles connaissances contribuera à identifier les bases moléculaires des maladies rares et communes et à améliorer la compréhension des relations génotype-phénotype pour ces pathologies. Elles permettront d'optimiser la prise en charge des patients grâce à une meilleure stratification du risque et de nouvelles solutions thérapeutiques préventives et curatives, l'objectif à long terme étant la médecine prédictive.

Du concept de l'hérédité à la séquence complète du génome humain

La seconde moitié du 20^e siècle a connu d'énormes développements dans le domaine de la génétique moléculaire (Figure 1). La redécouverte des lois de Mendel au début du siècle a été le fondement de la discipline. Dès 1865, ses travaux sur les pois lui avaient permis de décrire la transmission des caractères héréditaires et les notions de dominance et récessivité. En 1953, la structure en double hélice et la base chimique de l'ADN, la base de l'hérédité, a été décrite par James Watson et Francis Crick (prix Nobel 1962), et dans les années 70, ce fut le début d'une véritable révolution technologique avec les manipulations de l'ADN (Figure 1). Tous les projets de séquençage des années 90 utiliseront la technique de séquençage développée par Frederick Sanger à la fin des années 70. Le génie génétique va permettre un développement considérable des connaissances sur les gènes, leur fonctionnement et leur régulation.

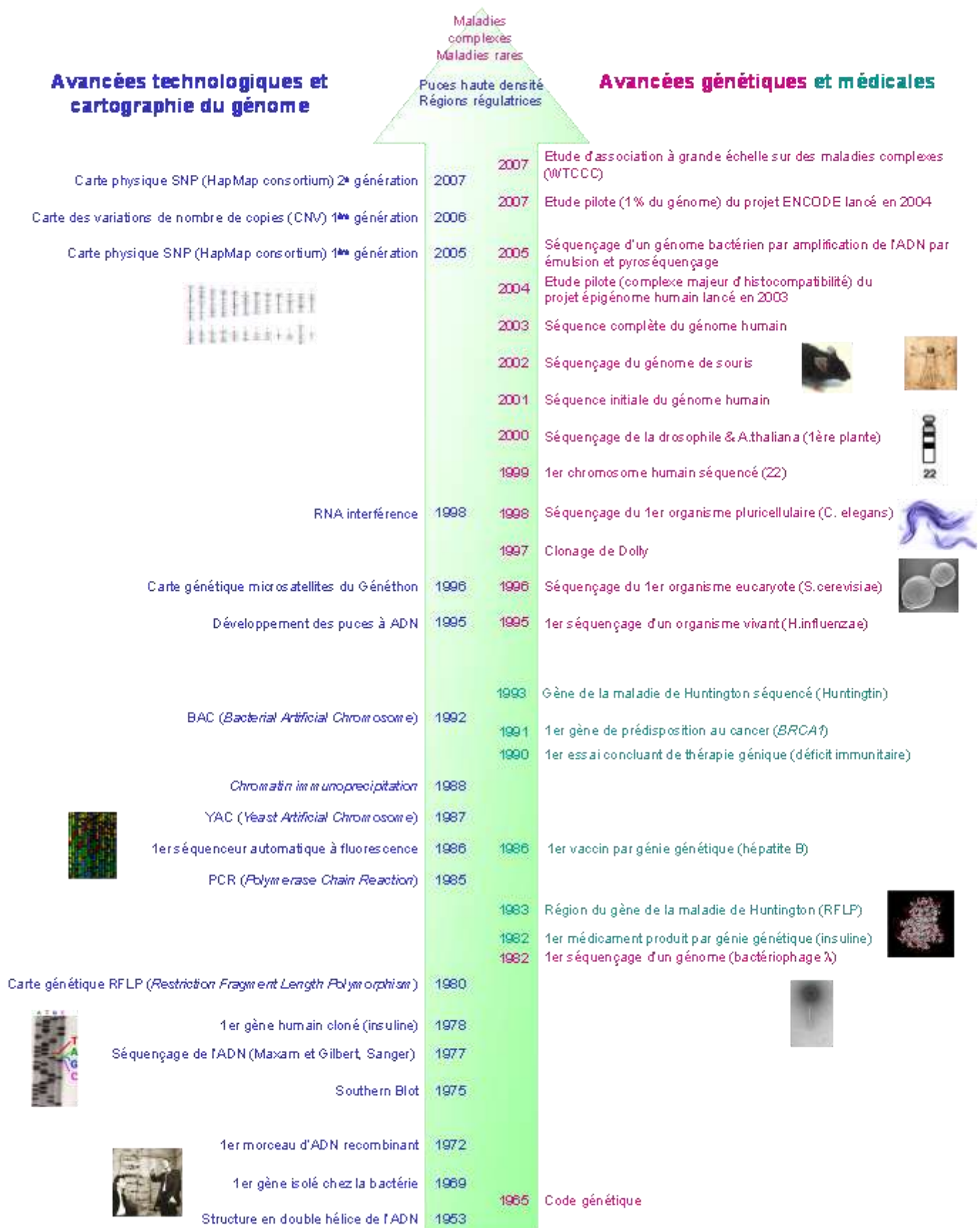


Figure 1 – Evolutions technologiques en génétique et implications en médecine

Les techniques atteignent très vite un niveau élevé de performance permettant l'étude du génome humain. Au début des années 80, les scientifiques ont commencé à localiser les régions des gènes impliqués dans les maladies. Il a fallu ensuite des années pour arriver à identifier dans ces régions les gènes mutés. En 1990, le Projet Génome Humain a débuté. L'objectif était de séquencer les 3 milliards de bases du génome pour 2005 afin de faciliter le clonage de gènes impliqués dans des pathologies, et de comprendre l'association entre génotypes et phénotypes.

Avec l'augmentation croissante des informations dans les bases de données publiques, le nombre de gènes impliqués dans les pathologies a connu une croissance remarquable (Figure 2). Les objectifs fixés au commencement du Projet Génome Humain ont été atteints avec 2 ans d'avance, la séquence initiale du génome ayant été publiée en 2001 [Lander *et al.*, 2001 ; Venter *et al.*, 2001] et la séquence complète en 2003 (2,86 milliards de bases), cinquante ans après la découverte de la structure de l'ADN par Watson et Crick. Parallèlement au séquençage du génome humain, le séquençage du génome complet de 671 espèces (dont 22 espèces eucaryotes et un seul autre mammifère, la souris) a été achevé et plus de 1 000 autres espèces sont en cours de séquençage (données issues du « *NCBI Entrez Genome Project* »).

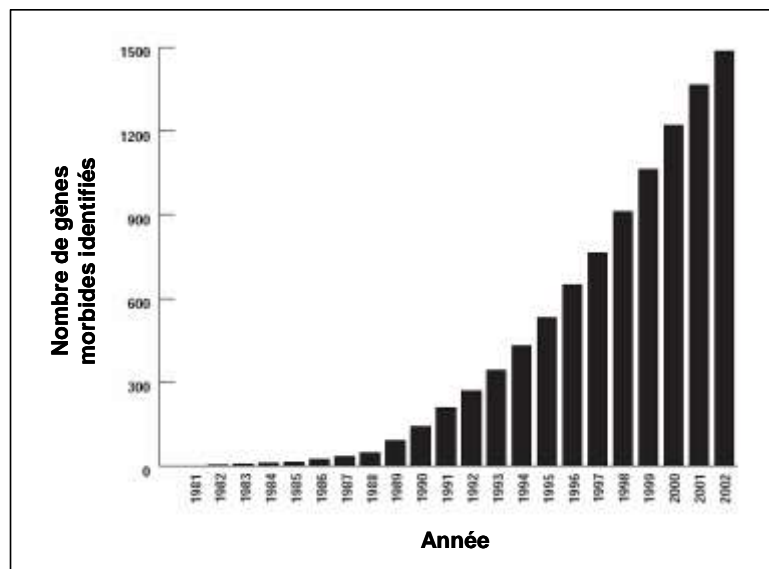


Figure 2 – Accélération de la découverte de gènes morbides entre 1981 et 2002

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

Les temps et coûts du séquençage vont diminuer en même temps que les technologies progressent. Le génome de James Watson a d'ailleurs été entièrement séquencé en 4 mois pour environ 1,5 million de dollars par la société 454 Life Sciences [Wheeler *et al.*, 2008].

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

Méthodes d'identification de nouveaux gènes pour les maladies monogéniques

Deux approches apparues il y a plus de 20 ans sont toujours largement utilisées aujourd'hui : l'approche gène candidat et l'approche d'analyse de liaison (ou clonage positionnel).

Pour identifier le gène responsable de la maladie, les premières approches consistaient à séquencer le gène en fonction de la protéine défectueuse, suspectée sur la base du phénotype. Cela a permis par exemple d'identifier pour l'hémophilie des mutations dans les gènes codant pour des facteurs de coagulation, le plus célèbre étant le facteur VIII dans l'hémophilie A (gène caractérisé par [Gitschier *et al.*, 1984]). Aujourd'hui, selon le phénotype observé et les données de la littérature, on peut émettre des hypothèses sur la physiopathologie de la maladie et les voies impliquées, et rechercher des variants dans les **gènes « candidats »** dont l'expression et la fonction présumée sont compatibles avec son implication. Cependant cette approche est limitée, car il est parfois impossible de définir quelle est la protéine défectueuse à partir du phénotype observé, et même en se limitant aux gènes à expression cardiaque dans le cadre des cardiopathies, il n'est possible avec les techniques actuelles que de tester un certain nombre de ces gènes. Cette approche est généralement utilisée pour les gènes connus comme codant pour des partenaires de protéines déjà impliquées dans des pathologies, ayant un rôle majeur dans une fonction

particulière, ou des gènes invalidés dans des modèles animaux au phénotype évocateur de la pathologie humaine étudiée.

Au cours des années, les progrès en biologie moléculaire ont permis d'introduire de nouveaux types de marqueurs génétiques [revue par Schlotterer, 2004]. D'abord variants protéiques (allozymes pour « variant allélique d'enzyme »), ils ont laissés la place à l'analyse de variants au niveau de l'ADN : (i) polymorphismes au niveau des sites de restriction enzymatiques (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*), (ii) répétitions de motifs (minisatellites, microsatellites), (iii) variants au niveau de la séquence d'ADN (SNP), et plus récemment (iv) variations de nombre de copies (CNV).

Les cartes génétiques composées au départ de marqueurs **RFLP** [Botstein *et al.*, 1980 ; Donis-Keller *et al.*, 1987]) ont laissé la place à des cartes de plus en plus denses de marqueurs **microsatellites** hautement polymorphes [NIH/CEPH Collaborative Mapping Group, 1992 ; Weissenbach *et al.*, 1992 ; Murray *et al.*, 1994 ; Gyapay *et al.*, 1994 ; Buetow *et al.*, 1994 ; The Utah Marker Development Group, 1995] disponibles aujourd'hui dans les bases de données sous le nom de Généthon [Dib *et al.*, 1996], Marshfield [Broman *et al.*, 1998] et deCODE [Kong *et al.*, 2002]. Ces cartes ont permis d'appliquer une nouvelle approche à l'échelle pan-génomique pour identifier des gènes morbides : le **clonage positionnel** ou « génétique inverse ». L'approche repose sur l'identification de formes familiales de la pathologie. A l'opposé de la « génétique classique », elle ne nécessite pas d'émettre d'hypothèses physiopathologiques puisqu'on cherche d'abord à localiser la position chromosomique du gène par une analyse de liaison entre les marqueurs génétiques et la pathologie représentée par les patients de la famille. Les marqueurs RFLP ont notamment permis d'identifier les régions des gènes impliqués dans la maladie de Huntington [Gusella *et al.*, 1983] ou la mucoviscidose [Tsui *et al.*, 1985]. Les annotations du génome accessibles dans les bases de données permettent aujourd'hui de faciliter l'identification du gène morbide (MapView, NCBI ; Ensembl).

Une troisième génération de cartes, les cartes physiques de **SNP** (*Single Nucleotide Polymorphism*) [Wang *et al.*, 1998 ; Cargill *et al.*, 1999] améliorées grâce au Projet Génome Humain et au Projet HapMap [The International HapMap Consortium, 2003 ; The International HapMap Consortium, 2005 ; The International HapMap Consortium, 2007] est de plus en plus utilisée actuellement.

L'analyse de liaison familiale a permis d'élucider les bases moléculaires à l'origine de certaines de **maladies monogéniques rares**. Cependant, cette méthode nécessite de disposer de familles suffisamment grandes, génétiquement informatives, et que la pathologie soit liée à un ou des gènes à effet majeur. Le clonage de nouveaux gènes par l'approche familiale est parfois rendu difficile par une pénétrance variable de certaines mutations et la

présence de phénotypes dans la famille, ou l'absence de mutation exonique qui conduit à exclure à tort le gène. En effet un nombre considérable de loci identifiés n'ont pas abouti à l'identification du gène. Ces données suggèrent que les régions non-codantes et les petits réarrangements génomiques (délétions, duplications, inversions), qui étaient encore peu ou pas explorés et sous-estimés il y a quelques années, pourraient avoir un rôle majeur dans le développement des pathologies.

Complexité des mutations génétiques

Grâce aux avancées considérables que le Projet Génome Humain a engendré, ces mutations « complexes » hors des séquences codantes sont de plus en plus fréquemment identifiées. Précédemment, les défauts pathogènes du génome chez les malades étaient déterminés uniquement par la technique de séquençage pour les mutations d'une ou quelques bases, ou par les techniques de cytogénétique pour les grands réarrangements chromosomiques. La détection de ces grands réarrangements était limitée à des techniques lourdes de cytogénétique telles que le **FISH** (*Fluorescent In Situ Hybridization*) et la **CGH** (*Comparative Genomic Hybridization*).

Ces dernières années, la mise en évidence de réarrangements a considérablement augmenté grâce au développement de techniques permettant leur détection à l'échelle d'un exon. La **QMPSF** (*Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragments*) [Charbonnier *et al.*, 2000] et la **MLPA** (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*, MRC-Holland) [Schouten *et al.*, 2002], sont maintenant utilisées en routine dans les laboratoires de diagnostic. Une nouvelle technique haut-débit plus résolutive pour les analyses pangénomiques dérivée de la CGH a également émergé : la **CGH-array** [Solinas-Toldo *et al.*, 1997]. Les sondes sont des clones génomiques [Pinkel *et al.*, 1998], des ADNc [Pollack *et al.*, 1999], ou plus récemment des produits de PCR [Mantripragada *et al.*, 2004 ; Dhami *et al.*, 2005] et des sondes oligonucléotidiques [Carvalho *et al.*, 2004 ; Brennan *et al.*, 2004], et permettent de mettre en évidence des remaniements de petite taille [revues par Pinkel & Albertson, 2005 ; Ylstra *et al.*, 2006].

En plus de ces réarrangements, les mutations pathogènes peuvent se situer dans les **séquences régulatrices** importantes pour la transcription ou la traduction comme les sites de fixation des facteurs de transcription ou des microRNA (768 mutations sur 57 301 mutations recensées dans la base de données HGMD [<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>] en mars 2008), et dans les **sites consensus ou séquences auxiliaires d'épissage** (5 394 mutations recensées).

Des maladies monogéniques aux maladies complexes

Les progrès en génétique moléculaire ont été considérables au cours des dernières décennies et reposent toujours sur des concepts avancés par Gregor Mendel. Cependant, même si ces lois qui définissent l'hérédité sont toujours exactes aujourd'hui pour les maladies monogéniques, les généticiens se tournent de plus en plus vers l'étude des maladies communes (diabète, cancer, asthme, maladies cardio-vasculaires, maladies neuro-psychiatriques...) où la transmission est bien souvent plus complexe due à la co-existence de plusieurs facteurs causals, à la fois génétiques et environnementaux. Chaque facteur individuel contribue faiblement au risque, et il s'agit donc d'un réel défi (Figure 3). La difficulté est d'identifier les différents gènes impliqués, l'effet de chacun, et comment ils interagissent entre eux et avec l'environnement pour aboutir au phénotype observé.

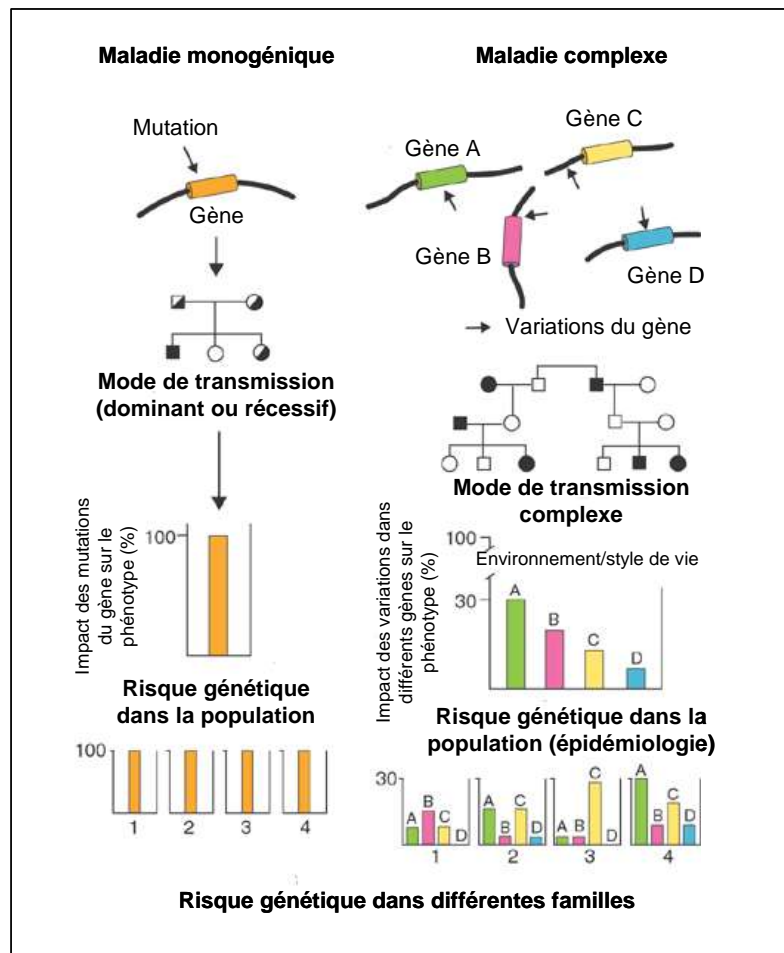


Figure 3 – Transmission des maladies monogéniques et complexes (multigéniques)

A gauche : Pour les maladies monogéniques, une mutation unique est suffisante pour produire le phénotype clinique. Le risque génétique de développer la maladie est le même dans toutes les familles.

A droite : Pour les maladies complexes, les variations dans différents gènes résultent en une prédisposition génétique. L'environnement et le style de vie contribuent de façon majeure à l'apparition des maladies complexes. Entre différentes familles, l'impact de ces gènes pourra être différent. Modifié d'après [Peltonen & McKusick, 2001].

Pour les maladies communes, une alternative à l'analyse de liaison familiale a donc été développée pour identifier des facteurs génétiques de susceptibilité à développer la maladie : l'**étude d'association**. Le principe est de localiser le ou les polymorphismes de susceptibilité en détectant des marqueurs génétiques (SNP) en **déséquilibre de liaison** avec ces polymorphismes, et dont la position chromosomique est connue. Le déséquilibre de liaison entre un marqueur et le locus causal se traduit par une association allélique non aléatoire entre un allèle du marqueur et l'allèle de susceptibilité du locus causal, indiquant qu'il y a liaison génétique. Les mesures courantes du déséquilibre de liaison sont le coefficient de déséquilibre D, le coefficient de corrélation r^2 , et le coefficient de Lewontin D'. Pour les études cas-témoin, les fréquences alléliques des marqueurs génétiques étudiés sont comparées dans une population de patients et une population d'individus sains non apparentés et concordants en terme d'âge et d'ethnie [revues par Hirschhorn & Daly, 2005 ; Newton-Cheh & Hirschhorn, 2005]. Les marqueurs génétiques possédant des allèles préférentiellement présents chez le groupe de patients indiqueront que ces marqueurs sont (i) eux-mêmes causals ou (ii) physiquement proches du polymorphisme impliqué dans la pathologie (en déséquilibre de liaison). La valeur statistique de « *P-value* » doit être faible (au moins $< 0,05$) pour une forte évidence d'association.

Cette approche est possible à l'échelle de gènes candidats et plus récemment à l'échelle du génome entier grâce au développement de cartes denses de SNP et aux informations sur leur fréquence, leur répartition physique, et les groupes de SNP en déséquilibre de liaison qui permettent de limiter le nombre de SNP étudiés (« *TagSNP* ») [The International HapMap Consortium, 2005 ; The International HapMap Consortium, 2007] [revues par Ardlie *et al.*, 2002 ; Morton, 2005]. Elle nécessite de très grandes cohortes de patients pour déterminer significativement des régions pouvant contenir des variants communs responsables d'une prédisposition et mettre en évidence des gènes impliqués dans des pathologies communes.

Récemment, le Wellcome Trust Sanger Institute a publié les résultats d'une étude d'association sur une cohorte de 2 000 patients et 3 000 contrôles pour sept pathologies communes (maladie coronarienne, hypertension, diabète de type 1, diabète de type 2, maladie de Crohn, arthrite rhumatoïde, et trouble bipolaire). Certains loci correspondent à des loci précédemment identifiés et de nouveaux loci ont été rapportés [The Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007].

Le Projet Génome Humain et le Projet HapMap ont accéléré la découverte des gènes impliqués dans des traits phénotypiques complexes. Si des variants rares interviennent dans l'apparition des maladies communes, identifier ces variants de susceptibilité à effet individuel mineur sera difficile. Il sera d'autant plus difficile d'appliquer des traitements communs aux patients si le substrat génétique est extrêmement variable, nécessitant dans les années futures de grands progrès pour la « médecine génomique » personnalisée.

Complexité du génome et variabilité interindividuelle

En plus des variations pathogènes, il était admis qu'au niveau de la séquence du génome, les humains sont identiques à 99,9%, les bases qui varient correspondant à des polymorphismes contribuant à la diversité entre les individus, les SNP (environ un variant toutes les 1 000 bases entre deux individus). Cependant, il a été mis en évidence des **variations de nombre de copies** d'ADN (*Copy Number Variations*, **CNV**), qui révolutionnent nos concepts sur la diversité entre les individus. En effet ces variations pourraient toucher jusqu'à 12% du génome (~360 Mb) avec 1 447 régions CNV identifiées sur une population de 270 individus *a priori* sains [Redon *et al.*, 2006]. Une base de données recense les variations de nombre de copies pour des segments d'ADN d'une taille supérieure à 1 kb chez des individus contrôles (Database of Genomic Variants, Toronto, Canada) [lafrate *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2006] [<http://projects.tcag.ca/variation/>]. Les données doivent être interprétées avec précaution puisque pour l'instant la taille exacte des CNV et les points de cassure ne sont pas délimités avec précision.

La mise en évidence de variations de nombre de copies a amené à reconsidérer le concept de variation interindividuelle attribuée aux SNP. Certaines de ces régions contiennent des gènes impliqués dans les maladies cardio-vasculaires [revue par Pollex & Hegele, 2007]. Les études futures permettront de déterminer l'importance des CNV dans les maladies monogéniques où ils pourraient contribuer aux variations d'expression des mutations (pénétrance), et dans l'apparition des maladies complexes.

La complexité du génome se situe également au niveau de l'épissage. Le génome contient seulement 20 000 gènes, loin de l'estimation de 100 000 gènes avant le début du Projet Génome Humain. Le Projet **ENCODE** (« *Encyclopedia Of DNA Elements* ») destiné à identifier et analyser les éléments fonctionnels du génome [The ENCODE Project Consortium, 2004] a souligné la complexité et le nombre considérable de transcrits que le génome produit, revisitant le vieux concept d'un gène, un transcrit, une protéine [Tress *et al.*, 2007]. Les séquences régulatrices orchestrant la transcription des gènes ne sont pas nécessairement situés en amont de ces gènes et peuvent même en être situés très loin

jusqu'à un autre chromosome [Spilianakis *et al.*, 2005]. Les résultats d'un projet pilote portant sur 1% du génome ont été publiés en 2007 [Birney *et al.*, 2007].

Un autre consortium international regroupé autour du projet **HEP** (« *Human Epigenome Project* ») et lancé fin 2003 a pour objectif d'identifier les régions variables de méthylation dans le génome [revues par Novik *et al.*, 2002 ; Bradbury, 2003]. Une étude pilote s'est intéressée à la méthylation des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité. L'analyse des niveaux de méthylation a montré une spécificité du tissu, une variabilité interindividuelle, et une corrélation avec le niveau d'expression des gènes [Rakyan *et al.*, 2004].

Tous ces projets fondamentaux de grande envergure ont pour vocation d'aider à mieux connaître les facteurs génétiques qui contribuent au développement des maladies pour déterminer des stratégies de prévention et de traitement appropriées. La complexité de ces facteurs moléculaires hérités se mêle à la complexité de leurs interactions avec les facteurs environnementaux en particulier pour les maladies communes.

L'étude des pathologies cardiaques rares démontre que même pour les maladies monogéniques, on peut être confronté à des difficultés dans l'étude génétique. Il existe de nombreux cas de transmission complexe dans les familles, à cause sans doute d'une grande hétérogénéité génétique, du défaut de pénétrance de certaines mutations et de l'intervention de facteurs modificateurs génétiques et environnementaux.

Objectifs de la thèse

L'émergence de ces outils de génétique permet d'aborder sous un nouvel aspect la compréhension de diverses maladies, rares ou communes, et notamment les maladies cardio-vasculaires. Les progrès sur l'élucidation des mécanismes responsables de ces pathologies permettront d'optimiser la prise en charge des patients par un diagnostic préventif et une amélioration des solutions thérapeutiques. L'activité normale du cœur est finement régulée et de nombreux facteurs de risque, génétiques ou environnementaux, sont incriminés dans les cardiopathies. Les plus communes incluent la maladie coronarienne, l'insuffisance cardiaque, les inflammations d'origine bactérienne ou virale, et les malformations congénitales. Au cours de mon travail de thèse, j'ai été amenée à étudier deux types de pathologies impliquées dans la mort subite cardiaque : les troubles du rythme primaires, d'occurrence rare, et une valvulopathie fréquente chez les patients âgés, le rétrécissement aortique calcifié.

Dans une première partie, j'aborderai mon travail sur les **troubles du rythme cardiaque héréditaires** qui ont porté principalement sur l'étude du syndrome ankyrine-B,

d'un nouveau syndrome de repolarisation précoce maligne décrit tout récemment, et du syndrome de Brugada. Mon travail a consisté à (projet #1) améliorer la compréhension des relations génotype-phénotype dans le syndrome ankyrine-B précédemment nommé syndrome du QT long de type 4, en caractérisant une seconde grande famille liée au gène *ANK2* et en identifiant de nouvelles mutations du gène *ANK2* élargissant le spectre phénotypique du syndrome, (projet #2) identifier les bases moléculaires à l'origine d'un nouveau syndrome de fibrillation ventriculaire avec repolarisation précoce maligne, et (projet #3) rechercher de nouveaux gènes pour expliquer l'hétérogénéité génétique du syndrome de Brugada à partir d'une approche gène candidat et familiale.

Dans une seconde partie, j'exposerai mes travaux sur la recherche du premier gène impliqué dans le **rétrécissement aortique calcifié**, première cause de remplacement chirurgical valvulaire dans les pays développés. Mon travail a consisté à (projet #4) démontrer que le rétrécissement aortique calcifié, pathologie du vieillissement, pouvait être familial et avoir une base génétique, et être abordé par des approches d'analyse de liaison associées à de vastes enquêtes généalogiques.

C- Génétique des troubles du rythme héréditaires

I- Introduction

I.1- Généralités sur la mort subite et les troubles du rythme cardiaque

La mort subite cardiaque (MSC, *Sudden Cardiac Death*) est un problème de santé publique majeur puisqu'elle touche environ un individu sur mille par an dans les pays développés (40 000 cas par an en France) [revues par Zipes & Wellens, 1998 ; Huikuri *et al.*, 2001 ; Jouven & Escande, 2006]. Elle est définie comme une mort inattendue et brutale survenant dans l'heure suivant l'apparition des premiers symptômes. Chez la moitié des victimes, il s'agit de la première et dernière manifestation d'une cardiopathie sous-jacente méconnue, le plus fréquemment une maladie coronarienne ou une cardiomyopathie dilatée ou hypertrophique. Le taux de survie est inférieur à 3% en France (« mort subite récupérée »).

Le mécanisme létal est dans 80% des cas un trouble du rythme ventriculaire causé par l'instabilité électrique du cœur : **fibrillation** ou **tachycardie** qui peut dégénérer en fibrillation comme les **torsades de pointes** (Figure 4). Un autre élément déclencheur est la bradycardie majeure causée par une dysfonction sinusale ou un bloc auriculo-ventriculaire. Les hypothèses sur les mécanismes du remodelage électrique en particulier en situation d'ischémie myocardique ont été passées en revue [Rubart & Zipes, 2005]. L'activité normale du cœur est décrite en annexe F-I, page 181.

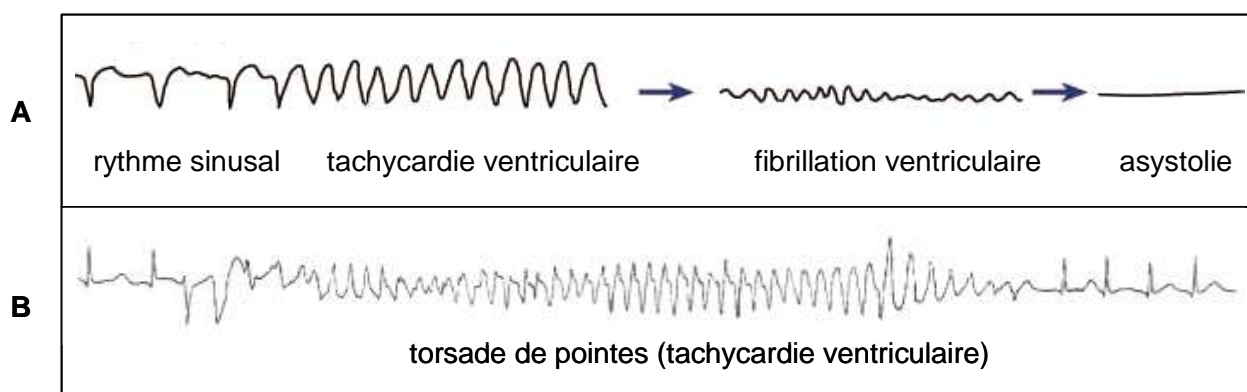


Figure 4 – Mécanismes de la mort subite cardiaque par arythmie ventriculaire

A : La tachycardie ventriculaire (TV monomorphe ou polymorphe, complexes QRS larges, fréquence cardiaque rapide) peut dégénérer en fibrillation ventriculaire (FV, perte de toute activité électrique organisée des ventricules) et causer la mort par asystolie. Modifié d'après [Huikuri *et al.*, 2001].

B : Les torsades de pointes (TdP) décrivent une sorte de torsion autour de la ligne isoélectrique. Elles sont liées à un phénomène de ré-entrée ventriculaire (désynchronisation des périodes réfractaires des cellules myocardiques), causée par une bradycardie importante ou un allongement de l'intervalle QT comme dans cet exemple chez un garçon de 15 ans. Modifié d'après [Napolitano & Priori, 2002].

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

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

Le développement de ces arythmies est sous l'influence de variants rares à effet majeur, les mutations, mais également de polymorphismes communs [revues par Kaab & Schulze-Bahr, 2005 ; Schulze-Bahr, 2006]. D'autre part, l'expressivité des mutations semble aussi dépendante du sexe. En effet, on remarque une disparité de la pénétrance, en particulier pour le syndrome du QT long congénital et le syndrome de Brugada, qui pourrait s'expliquer par une action des hormones stéroïdes sur la régulation des canaux ioniques [Furukawa & Kurokawa, 2007], et une expression différentielle des canaux ioniques [Di Diego *et al.*, 2002]. En situation non pathologique, la différence liée au sexe est déjà visible à l'électrocardiogramme (ECG) avec une fréquence cardiaque plus élevée, un intervalle QT plus long, et une amplitude et une durée du complexe QRS plus faibles chez les femmes et qui explique en partie une susceptibilité à développer certaines arythmies [revue par Bernal & Moro, 2006]. Le diagnostic de ces pathologies dont les principaux aspects cliniques sont définis dans le Tableau 1 est possible grâce à l'ECG de surface (Figure 41, page 189, et Figure 42, page 191). Les formes les plus fréquentes de ces troubles du rythme sont illustrées par des ECG typiques en Figure 5 et Figure 6.

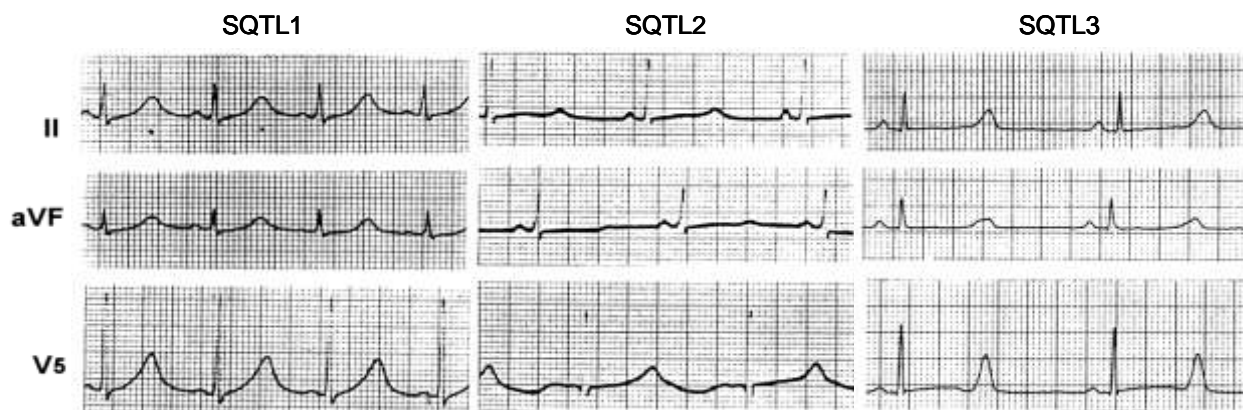
L'histoire familiale de mort subite, les symptômes, et éventuellement une exploration électrophysiologique, une épreuve d'effort ou un test pharmacologique, permettent aux cliniciens de décider de la prise en charge adaptée en fonction du risque arythmogène.

Tableau 1 – Caractéristiques cliniques des troubles du rythme cardiaques primaires héréditaires

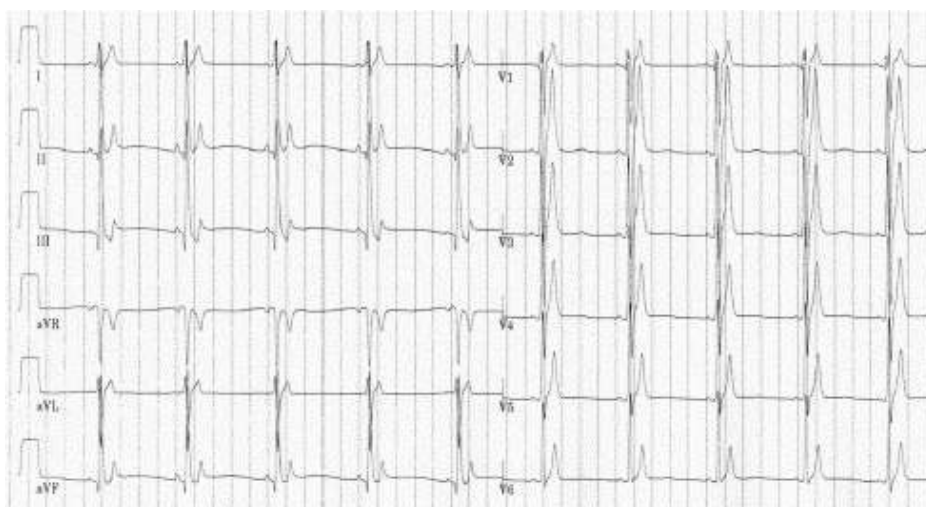
Type d'arythmie	Prévalence Risque accru	Principaux critères diagnostic (ECG + interrogatoire)	Traitement
Syndrome du QT long (SQTL)	1/2 500, femmes exercice (SQTL1,4,7,8), stress (SQTL2,4), repos (SQTL3)	QTc > 440 ms, onde T de morphologie anormale, TdP Syncope, histoire familiale de MSC	β-bloquants (SQTL1), DAI, ou SC
Syndrome du QT court (SQTC)	rare	QTc < 320-340 ms (mesuré avec un rythme < 80 bpm) Syncope, histoire familiale de MSC	DAI, quinidine (?)
Syndrome de Brugada (SBr)	5-14/10 000, hommes asiatiques ~40 ans repos	Type I : J ≥ 2mm, aspect convexe et descendant du segment ST, onde T inversée (« <i>coved-type</i> ») Type II : J ≥ 2 mm, aspect en selle du segment ST, sus-décalage ST ≥ 1 mm, onde T positive ou biphasique (« <i>saddle-back</i> ») Type III : J ≥ 2 mm, aspect en selle du segment ST, sus-décalage ST < 1 mm, onde T positive (« <i>saddle-back</i> ») + FV, TV polymorphe, histoire familiale de MSC (< 45 ans), BBD	DAI, quinidine (?)
TV polymorphes catécholergiques (TVC)	rare jeunes ~20 ans effort, stress	Diagnostic par épreuve d'effort ou holter (ECG au repos souvent normal sauf la bradycardie) Extrasystoles ventriculaires isolées puis TV bidirectionnelles, TV polymorphe, FV, induites par un stress physique ou émotionnel, régression des anomalies à l'arrêt de l'effort	β-bloquants à forte dose, DAI
Fibrillation auriculaire (FA)	< 1% jeunes adultes ~10-20% > 80 ans	Activité rapide et anarchique des oreillettes	anticoagulants, radiofréquence, antiarythmiques
Dysfonction sinusale (DS)	1/600 (> 65 ans)	Bradycardie : FC < 60 bpm, bloc sino-auriculaire...	SC
Troubles de conduction (TdC)	↑ avec l'âge pour les formes progressives	PFHB1 : infra-hissien, BBD, parfois HBAG, QRS allongé PFHB2 : BAV (1 ^{er} , 2 nd , 3 ^e degré), QRS fins, PR allongé, bradycardie sinusale Lenègre : proche du PFHB1, tout type de bloc, PR, QRS, onde P allongés	antiarythmiques, SC

bpm : Battements par minute, *DAI* : Défibrillateur automatique implantable, *SC* : Stimulateur cardiaque, *TdP* : Torsades de pointes, *BBD* : Bloc de branche droit, *MSC* : Mort subite cardiaque, *QTc* : QT corrigé, *PFHB* : Progressive familial heart block, *HBAG* : Hémibloc antérieur gauche, *BAV* : Bloc auriculo-ventriculaire. (?) signifie que les données sont encore insuffisantes ou imprécises. Des exemples d'ECG typiques sont représentés en Figure 5, Figure 6.

Syndrome du QT long (SQTL)



Syndrome du QT court (SQTC)



Syndrome de Brugada (SBr)

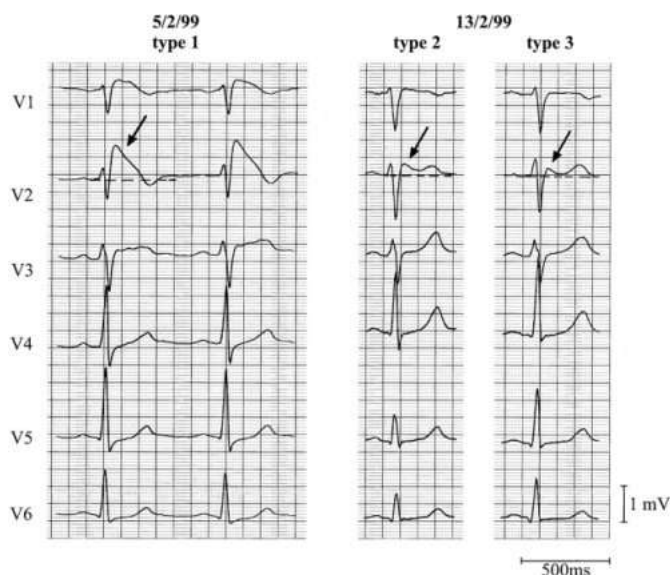


Figure 5 – ECG caractéristiques (1) des troubles du rythme primaires ayant une origine génétique

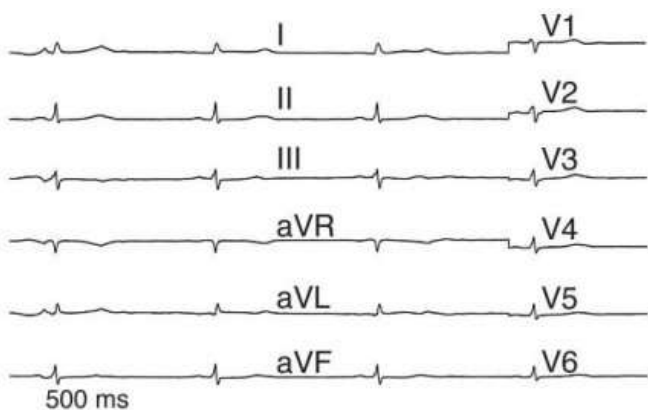
SQTL : Types 1 (onde T à large base), 2 (onde T de faible amplitude en DII et léger aspect en double bosse), 3 (onde T tardive avec long segment ST). D'après [Moss et al., 1995]. **SQTC** : ECG 12-dérivations d'un patient de 16 ans présentant un SQTC congénital (onde T hautes et symétriques, intervalle QT 248 ms, QTc 252 ms. D'après [Schimpf et al., 2005]. **SBr** : ECG des dérivations précordiales d'un patient SBr ayant survécu à une mort subite cardiaque. Le profil est variable dans le temps et montre les 3 types de SBr. Les flèches pointent l'onde J. D'après [Wilde et al., 2002].

Tachycardies ventriculaires catécholergiques (TVC)

Troubles de conduction progressifs isolés (TdC)

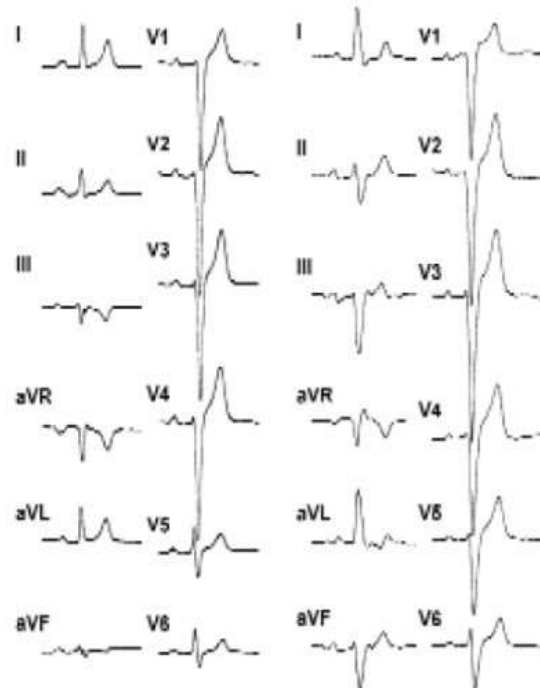


Bradycardie sinusale (DS)



1986

1998



Fibrillation auriculaire familiale (FA)

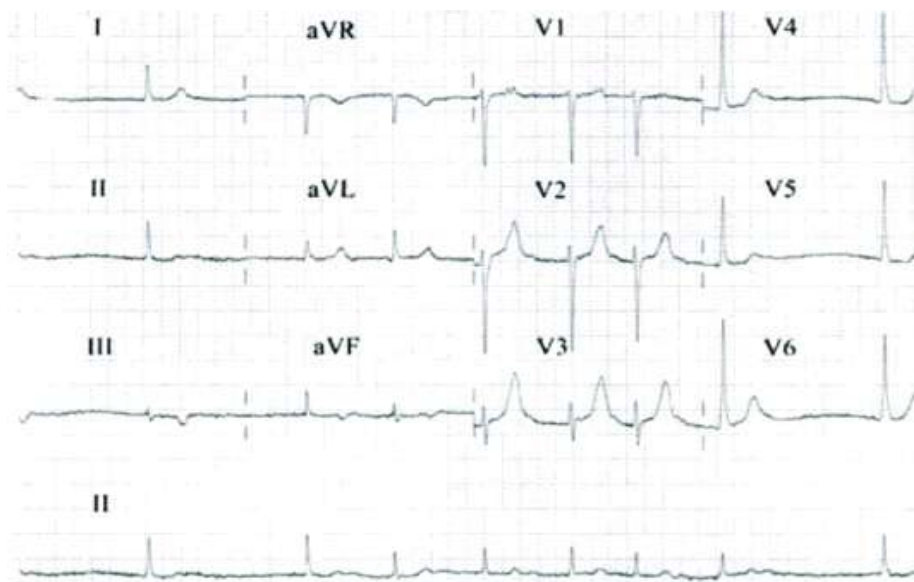


Figure 6 – ECG caractéristiques (2) des troubles du rythme primaires ayant une origine génétique

TVC : ECG d'un patient de 16 ans pendant un test d'exercice et stress. L'ECG 12-dérivations suggère une tachycardie ventriculaire polymorphe, bidirectionnelle dans les dérivations III, aVF, et aVL (encadré). D'après [Sarkozy & Brugada, 2005]. FA : ECG 12-dérivations d'un patient atteint de FA familiale. D'après [Chen et al., 2003]. DS : ECG d'une patiente présentant une bradycardie sinusale prononcée (41 bpm) après admission à l'hôpital suite à une syncope. D'après [Schulze-Bahr et al., 2003b]. TdC (maladie de Lenègre) : Le patient avait un trouble de conduction non spécifique à l'âge de 60 ans (durée de QRS de 120 ms) mais à l'âge de 72 ans il présentait un hémibloc antérieur gauche avec des complexes QRS larges et un intervalle PR long (240 ms). D'après [Schott et al., 1999].

Dans cette partie, nous aborderons les principaux troubles du rythme cardiaque primaires ayant une composante génétique démontrée. Ces troubles sont essentiellement des canalopathies, hétérogènes génétiquement et associés à des mutations dans des gènes codant pour des canaux ioniques impliqués dans la dépolarisation ou la repolarisation des cellules, mais pas exclusivement (Figure 7 et Figure 39, page 187). La classification utilisée dans cette partie pour décrire les différents sous-types d'arythmies (liés aux différents gènes impliqués) suit les recommandations d'une publication récente [Lehnart *et al.*, 2007].

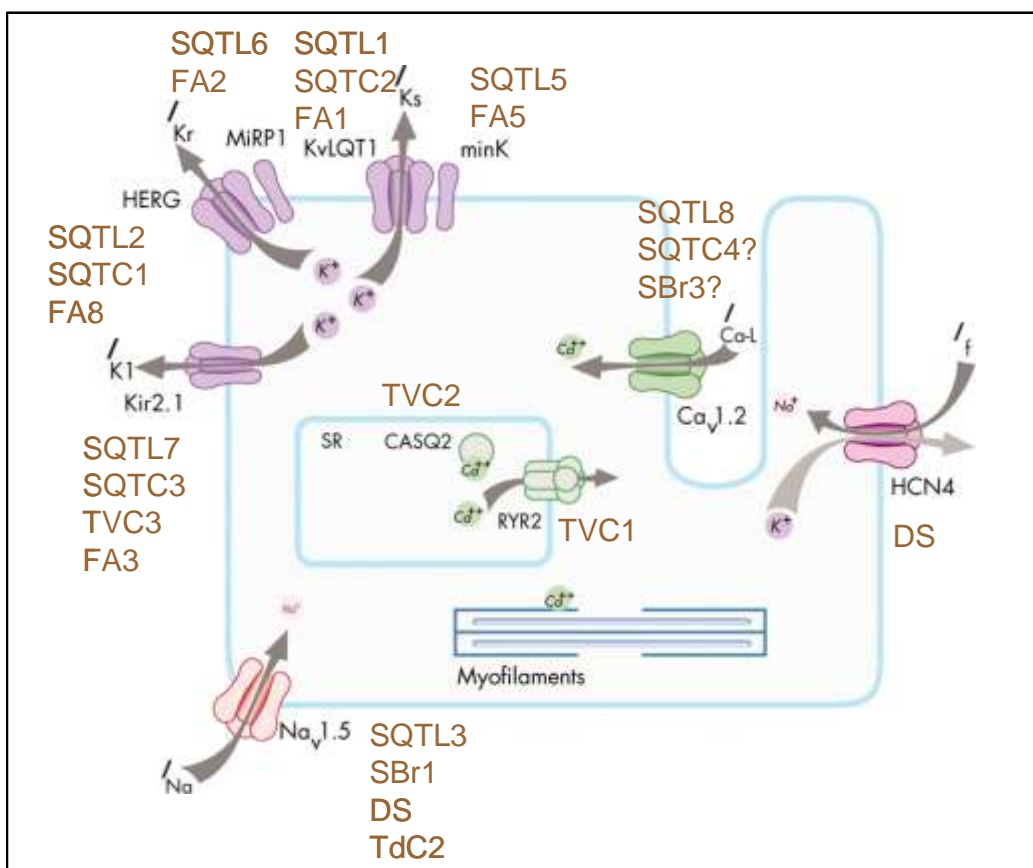


Figure 7 – Représentation schématique des protéines impliquées dans les arythmies cardiaques

SQTL : Syndrome du QT long, *SQTC* : Syndrome du QT court, *SBr* : Syndrome de Brugada, *TVC* : Tachycardie ventriculaire polymorphe catécholergique, *FA* : Fibrillation auriculaire, *DS* : Dysfonction sinusale, *TdC* : Troubles de conduction. L'ankyrine-B (*SQTL4*, *FA7*), la cavéoline-3 (*SQTL9*), Na_vβ4 (*SQTL10*), K_v1.5 (*FA6*), GPD1L (*SBr2*), Ca_vβ2b (*SQTC5 ?*, *SBr4 ?*), la connexine-40 (*FA4*) et SUR2A (*FA9*) ne sont pas représentés. Modifié d'après [Wilde & Bezzina, 2005].

I.2- Génétique des troubles du rythme cardiaque primaires

I.2.1- Génétique du syndrome du QT long

Le syndrome du QT long (SQTL) congénital est hétérogène du point de vue phénotypique et génétique. Il est causé par des mutations « gain ou perte de fonction » dans des gènes codant à la fois pour des canaux ioniques (sous-unités α et sous-unités régulatrices) impliqués dans les phases de dépolarisation et repolarisation du potentiel d'action (PA, Figure 8), et des gènes codant pour des protéines non canales (Tableau 2). En effet, bien que le SQTL soit classiquement appelé une « canalopathie » puisque la majorité des gènes impliqués codent pour des canaux, deux protéines non canales ont été identifiées : l'ankyrine-B et la cavéoline-3. Toutes deux participent à l'ancrage de canaux ioniques et leur activité est essentielle dans le potentiel d'action. Très récemment, une autre protéine d'ancrage, AKAP9 (*A-Kinase Anchoring Protein*, Yotiao), a été impliquée dans une forme rare de syndrome de QT long. La mutation (AKAP9-S1570L) est localisée dans le domaine de liaison à KCNQ1, impliqué dans le SQTL de type 1 [Chen *et al.*, 2007]. La mutation réduit l'interaction entre KCNQ1 et Yotiao et réduit la phosphorylation du canal médiée par l'AMPc.

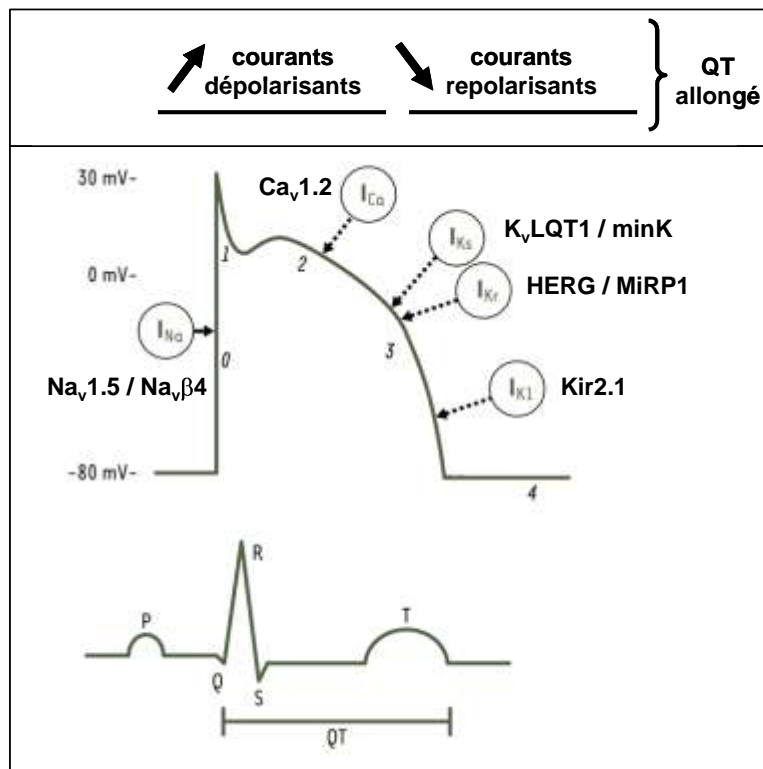


Figure 8 – Rôle dans le PA des canaux ioniques impliqués dans le SQTL

Modifié d'après [Pourrier & Nattel, 2004].

Tableau 2 – Gènes identifiés dans le syndrome du QT long congénital (SQTL)

Type	% patients SQTL	Locus	Gène	Protéine, fonction/courant	Effet des mutations	Transmission
SQTL1	30-35%	11p15.5 ^a	<i>KCNQ1</i> ^b	K _v LQT1 ou K _v 7.1 (canal potassique α), repolarisation/I _{Ks}	↓ I _{Ks}	AD, Sp, Acq
SQTL2	25-30%	7q35-q36 ^c	<i>KCNH2</i> ^d	HERG ou K _v 11.1 (canal potassique α), repolarisation/I _{Kr}	↓ I _{Kr}	AD, Sp, Acq
SQTL3	5-10%	3p21 ^c	<i>SCN5A</i> ^e	Na _v 1.5 (canal sodique α), dépolarisation/I _{Na}	↑ I _{Na}	AD, Sp, Acq
SQTL4	rare	4q25-q27 ^f	<i>ANK2</i> ^g	ankyrine-B, ancrage/I _{Na} /Ca	multiple	AD
SQTL5	~1%	21q22.12	<i>KCNE1</i> ^h	minK ou Isk (canal potassique β), repolarisation/I _{Ks}	↓ I _{Ks} /K _r	AD, Sp
SQTL6	rare	21q22.12	<i>KCNE2</i> ⁱ	MiRP1 (canal potassique β), repolarisation/I _{Kr}	↓ I _{Kr}	AD, Sp
SQTL7	rare	17q23.1-q24.2	<i>KCNJ2</i> ^j	Kir2.1 (canal potassique α), repos, repolarisation/I _{K1}	↓ I _{K1}	AD, Sp
SQTL8	rare	12p13.3	<i>CACNA1C</i> ^k	Ca _v 1.2 (canal calcique α 1C), dépolarisation/I _{Ca-L}	↑ I _{Ca-L}	AD, Sp
SQTL9	rare	3p25	<i>CAV3</i> ^l	cavéoline-3, signalisation intracellulaire et ancrage au niveau des cavéoles	↑ I _{Na}	Sp
SQTL10	rare	11q23.3	<i>SCN4B</i> ^m	Na _v β 4 (canal sodique β 4), I _{Na}	↑ I _{Na}	AD
JLN1	rare	11p15.5	<i>KCNQ1</i> ^{n,o}	K _v LQT1 ou K _v 7.1 (canal potassique α), repolarisation/I _{Ks}	↓ I _{Ks}	AR
JLN2	rare	21q22.12	<i>KCNE1</i> ^p	minK ou Isk (canal potassique β), repolarisation/I _{Ks}	↓ I _{Ks}	AR

JLN : Syndrome de Jervell et Lange-Nielsen, AD : Autosomique dominant, AR : Autosomique récessif, Sp : Sporadique, Acq : Acquis.

Références : a = [Keating et al., 1991] ; b = [Wang et al., 1996] ; c = [Jiang et al., 1994] ; d = [Curran et al., 1995] ; e = [Wang et al., 1995] ; f = [Schott et al., 1995] ; g = [Mohler et al., 2003] ; h = [Splawski et al., 1997b] ; i = [Abbott et al., 1999] ; j = [Plaster et al., 2001] ; k = [Splawski et al., 2004] ; l = [Vatta et al., 2006] ; m = [Medeiros-Domingo et al., 2007] ; n = [Neyroud et al., 1997] ; o = [Splawski et al., 1997a] ; p = [Schulze-Bahr et al., 1997].

L'allongement de la durée de l'intervalle QT qui manifeste l'allongement du potentiel d'action au niveau ventriculaire favorise les post-dépolarisations précoces (*Early After Depolarization*). Ces EAD peuvent provoquer la survenue d'arythmies ventriculaires polymorphes en particulier les torsades de pointes (TdP, Figure 4, page 26) pouvant provoquer la mort subite par fibrillation. Plus l'intervalle QT est allongé, plus le risque d'événements cardiaques est grand [Moss et al., 1991].

Le SQTL est appelé **syndrome de Romano-Ward** pour la forme dominante [Romano et al., 1963 ; Ward, 1964], et **syndrome de Jervell et Lange-Nielsen (JLN)** [Jervell & Lange-Nielsen, 1957] pour la forme récessive plus grave et plus rare, où il est associé à une surdité [revue par Schwartz et al., 2006]. La forme SQTL4 a été renommée « syndrome

ankyrine-B » compte tenu des anomalies rythmiques variées n'incluant pas nécessairement un QT long pour les patients mutés dans le gène *ANK2*. Dans la forme SQTL de type 7, l'allongement de l'intervalle QT est lié au syndrome d'Andersen, dont les caractéristiques cliniques en plus des arythmies ventriculaires sont un dysfonctionnement du muscle squelettique associé à une paralysie périodique sensible au potassium et des anomalies du développement en faisant un syndrome polymalformatif [Andersen *et al.*, 1971 ; Tawil *et al.*, 1994]. Dans la forme SQTL de type 8, l'allongement de l'intervalle QT est lié au syndrome de Timothy qui associe autisme et syndactylie [Splawski *et al.*, 2004].

En plus des mutations dans des gènes à effet majeur, d'autres facteurs interviendraient dans la modulation du phénotype. L'héritabilité de la durée de l'intervalle QT a été démontrée (25-50%) ce qui suggère l'intervention de facteurs génétiques, notamment au niveau des loci SQTL1 et SQTL4 [Russell *et al.*, 1998 ; Busjahn *et al.*, 1999 ; Carter *et al.*, 2000 ; Newton-Cheh *et al.*, 2005]. Les variants communs des gènes impliqués dans le SQTL auraient un effet sur la durée de l'intervalle QT [Gouas *et al.*, 2005 ; Pfeufer *et al.*, 2005 ; Gouas *et al.*, 2007] et pourraient agir comme modulateurs pour l'expressivité d'une mutation, mais pas uniquement. Récemment, par une étude d'association sur de grandes cohortes, la région du gène *NOS1AP* (*Nitric Oxide Synthase 1 Adaptator Protein*, également appelé *CAPON*) a été identifiée comme ayant un effet sur la variation de l'intervalle QT et serait un modulateur de la repolarisation cardiaque dans la population générale à hauteur de 1,5% [Arking *et al.*, 2006 ; Aarnoudse *et al.*, 2007 ; Post *et al.*, 2007] [revue par Newton-Cheh & Shah, 2007]. Les études fonctionnelles ont montré que la *CAPON* interagit avec *NOS1* pour accélérer la repolarisation cardiaque en inhibant les canaux calciques de type L [Chang *et al.*, 2008].

A ces facteurs génétiques s'additionnent d'autres conditions pour l'apparition d'un allongement de l'intervalle QT (cardiomyopathies, déséquilibre d'électrolytes, bradycardie) et il peut aussi être déclenché par les effets environnementaux. En particulier, la prise de certains médicaments (antihistaminiques, neuroleptiques, érythromycine, antiarythmiques de classe III...) peut révéler une mutation silencieuse, provoquant le **syndrome du QT long acquis** qui s'oppose au QT long « congénital ». Il est plus particulièrement associé aux mutations de *KCNH2*, les médicaments agissant comme des « bloqueurs » du canal HERG [revues par Roden & Viswanathan, 2005 ; Kannankeril & Roden, 2007].

La stratification du risque de mort subite en fonction du gène muté a été étudiée. Le risque d'événements cardiaques et la mortalité avant 40 ans et sans traitement serait plus important pour les patients SQTL3, puis SQTL2, et enfin SQTL1 (la forme la plus fréquente), la durée de l'intervalle QTc et le type de gène muté étant les facteurs les plus significatifs [Zareba *et al.*, 1998 ; Priori *et al.*, 2003]. La position de la mutation dans la protéine et le type de mutation sont également des facteurs importants, par exemple les mutations du pore du

canal sont généralement plus nocives. La mutation fréquente du SQT1 A341V, située dans le sixième domaine transmembranaire de K_vLQT1 , est associée une manifestation clinique sévère chez les patients [Crotti *et al.*, 2007].

Le traitement par les β -bloquants comme intervention antiadrénergique, les troubles survenant souvent en condition d'effort ou de stress, protège de façon plus efficace les patients SQT1 par rapport aux patients SQT2 et SQT3 [Priori *et al.*, 2004]. L'implantation d'un défibrillateur est parfois indiquée même s'il ne traite pas la cause, et le traitement pharmacologique qui prévient les événements arythmiques est préconisé pour la majorité des patients. La forme SQT3 se stabilise à l'effort par une diminution de l'intervalle QT avec l'augmentation de la fréquence cardiaque, alors que le sport est contre-indiqué pour la forme SQT1. De plus, la prévention passe aussi par la proscription des médicaments causant un allongement de l'intervalle QT et présentant un risque de développer des TdP. La liste de ces médicaments est répertoriée sur le site internet [<http://www.qtdrugs.org/>]. La meilleure connaissance des relations génotype-phénotype a permis d'améliorer le diagnostic génétique en première intention, et la prise en charge thérapeutique [Schwartz *et al.*, 2001 ; Van Langen *et al.*, 2003 ; Tan *et al.*, 2006] [revue par Schwartz, 2006]. La pénétrance est estimée à 85-90%.

Des formes très sévères ont été expliquées par la présence de deux mutations dans les deux gènes distincts *KCNQ1* et *KCNH2* (doubles hétérozygotes) [Yamaguchi *et al.*, 2005 ; Fodstad *et al.*, 2006]. Ce fait est intrigant puisque le syndrome du QT long congénital est considéré comme rare [Schwartz *et al.*, 2003]. La proportion de **doubles hétérozygotes** est estimée à environ 4 à 8% [Westenskow *et al.*, 2004 ; Napolitano *et al.*, 2005] et chaque gène devrait être criblé même après l'identification d'une première mutation pour mieux définir les risques.

Enfin, le SQT est majoritairement causé par des mutations dans les régions codantes ou les sites d'épissage. Cependant, pour environ 25% des patients le gène n'est pas identifié.

Récemment une mutation intronique (T1945+6C) [Zhang *et al.*, 2004] et une duplication dans *KCNH2* [Koopmann *et al.*, 2006] ont été liées au SQT et les réarrangements génomiques pourraient expliquer en partie pourquoi certains patients au phénotype évocateur de SQT n'apparaissent pas mutés lors du criblage des régions codantes des gènes par les outils de diagnostic classiques (DHPLC/séquençage direct). Une autre explication évoquée pour les faux-négatifs est la présence de polymorphismes au niveau des amorces de PCR qui empêchent l'amplification de l'allèle muté [Tester *et al.*, 2006b].

I.2.2- Génétique du syndrome du QT court

La durée de l'intervalle QT est un paramètre dynamique qui diminue avec une augmentation du rythme cardiaque. Le syndrome du QT court (SQTC, [revues par Schimpf *et al.*, 2005 ; Borggreffe *et al.*, 2005]) a été décrit en 2000 par une étude présentant une fibrillation auriculaire paroxystique familiale associée à un QT court ne s'adaptant pas à la fréquence cardiaque [Gussak *et al.*, 2000].

Une étude de deux familles a ensuite confirmé que ce syndrome était associé à une incidence plus élevée de mort subite familiale [Gaita *et al.*, 2003]. Tous les patients présentaient à l'exploration électrophysiologique des périodes réfractaires courtes au niveau auriculaire et ventriculaire et chez une grande majorité la fibrillation ventriculaire était induite par stimulation ventriculaire programmée.

Avec l'identification de mutations dans un même codon du gène *KCNH2* un an plus tard pour ces deux familles, la base génétique du SQTC était démontrée. L'étude fonctionnelle de cette première mutation (N588K) a montré qu'elle abolit l'inactivation du canal HERG, ce qui augmente le courant repolarisant I_{Kr} . Cet effet est observé lorsque le canal est réexprimé seul ou avec sa sous-unité régulatrice codée par *KCNE2*. Il s'agit donc d'une mutation « perte de fonction » qui conduit à une diminution de la durée du potentiel d'action et explique le raccourcissement de l'intervalle QT [Brugada *et al.*, 2004]. La mort subite de deux patients avant un an dans une de ces familles, dont une a été récupérée, suggère un lien entre mutations *KCNH2* et mort subite du nourrisson. La troisième famille rapportée dans cet article ne possédait pas de mutation dans le gène *KCNH2* et suggérait que comme les autres arythmies cardiaques, le SQTC est génétiquement hétérogène.

En effet, deux autres gènes codant pour des canaux potassiques (*KCNQ1* et *KCNJ2*) déjà impliqués dans le syndrome du QT long congénital ont rapidement été identifiés, mais il s'agit là de mutations « gain de fonction » (Tableau 3). La première mutation dans *KCNQ1* (V307L), étudiée au laboratoire, produit un courant potassique I_{Ks} sortant d'amplitude normale mais le canal a une cinétique d'activation accélérée conduisant à un gain de fonction [Bellocq *et al.*, 2004]. Le patient muté, âgé de 70 ans, a fait une mort subite récupérée pour un épisode de fibrillation ventriculaire et présentait un QT de 290 ms (QTc = 302 ms). Une seconde mutation a été identifiée chez un nourrisson présentant QT court et fibrillation auriculaire (mutation *de novo*, V141M) [Hong *et al.*, 2005b]. La mutation *KCNJ2*-D172N conduit à un phénotype de QT court d'aspect atypique avec une onde T asymétrique et une phase terminale très rapide [Priori *et al.*, 2005].

En 2007, des mutations « perte de fonction » dans le canal calcique $Ca_v1.2$ et sa sous-unité auxiliaire $Ca_{v\beta2b}$ ont été identifiées chez des patients présentant un syndrome de Brugada avec des QT plus courts que la normale, mais seuls 3 propositus sur 7 mutés ont un $QTc \leq 360$ ms [Antzelevitch *et al.*, 2007]. Parmi ces trois propositus un seul (*CACNB2b-S481L*) a un intervalle QTc considéré comme réellement court selon les critères du SQTC ($QTc = 330$ ms). On ne connaît pas encore la fréquence de ces mutations calciques chez des patients présentant un SQTC prononcé et isolé. Il avait déjà été rapporté qu'un intervalle QT court était fréquemment trouvé chez les hommes manifestant une FV idiopathique [Viskin *et al.*, 2004]. La genèse des arythmies dans le syndrome de Brugada et le SQTC est supposée être due à une amplification de l'hétérogénéité des caractéristiques du potentiel d'action à travers les différents types cellulaires de la paroi du ventricule.

Ce syndrome, comme le syndrome du QT long, est donc hétérogène génétiquement et associé à un risque accru de fibrillation auriculaire et ventriculaire, dès le plus jeune âge. Le petit nombre de cas rapportés limite les études génotype-phénotype. Chez ces patients, le sotalol, un bloqueur de I_{Kr} , est inefficace pour allonger la durée du QT, qui est revanche augmentée par la quinidine [Gaita *et al.*, 2004]. Le traitement de choix lorsqu'il est possible reste toutefois le défibrillateur pour ces patients à haut risque de développer des arythmies ventriculaires.

Tableau 3 – Gènes identifiés dans le syndrome du QT court (SQTC)

Type	Locus	Gène	Protéine, fonction/courant	Effet des mutations	Transmission
SQTC1	7q35-q36	<i>KCNH2</i> ^a	HERG ou $K_v11.1$ (canal potassique α), repolarisation/ I_{Kr}	$\uparrow I_{Kr}$	AD
SQTC2	11p15.5	<i>KCNQ1</i> ^b	K_vLQT1 ou $K_v7.1$ (canal potassique α), repolarisation/ I_{Ks}	$\uparrow I_{Ks}$	Sp
SQTC3	17q23.1-q24.2	<i>KCNJ2</i> ^c	$Kir2.1$ (canal potassique α), repos, repolarisation/ I_{K1}	$\uparrow I_{K1}$	AD
SQTC4 ?	12p13.3	<i>CACNA1C</i> ^d	$Ca_v1.2$ (canal calcique $\alpha1C$), dépolarisation/ I_{Ca-L}	$\downarrow I_{Ca}$	AD
SQTC5 ?	10p12	<i>CACNB2</i> ^d	$Ca_{v\beta2b}$ (canal calcique $\beta2b$), dépolarisation/ I_{Ca-L}	$\downarrow I_{Ca}$	AD

AD : Autosomique dominant, *Sp* : Sporadique.

Références : a = [Brugada *et al.*, 2004] ; b = [Bellocq *et al.*, 2004] ; c = [Priori *et al.*, 2005] ; d = [Antzelevitch *et al.*, 2007].

I.2.3- Génétique du syndrome de Brugada

Le syndrome de Brugada (SBr) a été décrit en 1992 [Brugada & Brugada, 1992]. Il associe un risque accru de mort subite cardiaque par fibrillation ventriculaire à un phénotype électrocardiographique particulier en faisant une entité distincte des FV idiopathiques. Une grande partie des FV idiopathiques (~60%) sont attribuées aujourd'hui au SBr, pour lequel la mort subite provient principalement au repos, notamment la nuit, sur un cœur normal [revues par Brugada *et al.*, 2005 ; Antzelevitch, 2006 ; Rossenbacker & Priori, 2007].

Dès la fin des années 70, des études américaines rapportaient des morts subites inhabituelles chez des jeunes immigrants originaires d'Asie du Sud, définies comme le « *Sudden Unexplained Nocturnal Death Syndrome* » (SUNDS). En Asie, plusieurs noms signifiant « mort pendant la nuit » lui ont été associés : « *lai tai* » en Thaïlande, « *bangungut* » aux Philippines, « *pokkuri* » au Japon [Nademanee, 1997]. Il s'agit en fait de la même maladie, phénotypiquement, génétiquement, et fonctionnellement [Nademanee *et al.*, 1997 ; Vatta *et al.*, 2002]. A l'inverse du syndrome du QT long congénital qui touche préférentiellement les femmes à l'âge adulte, le SBr est associé à une prédominance masculine [revue par Eckardt, 2007].

Le profil électrocardiographique typique, avec une sur-élévation du segment ST et un bloc de branche droit dans les dérivations précordiales droites V1 à V3, est variable dans le temps. Il est modulé par le système neurovégétatif, l'hypo ou hyperkaliémie, l'hypercalcémie, la sécrétion d'insuline et certaines substances (β -bloquants, antidépresseurs, cocaïne, alcool...). Le profil peut aussi être induit par la fièvre [Saura *et al.*, 2002 ; Keller *et al.*, 2005]. L'ECG caractéristique doit être de type I (« *coved-type* », Tableau 1, page 28) et associé à des symptômes pour valider le diagnostic. Le profil est observé « de base » ou après administration d'un test pharmacologique en perfusion continue sur 10 min avec un antiarythmique de classe Ic, l'**ajmaline** (1 mg/kg) ou la **flécaïnide** (2 mg/kg) pour « démasquer » le syndrome [Brugada *et al.*, 2000 ; Wolpert *et al.*, 2005]. La pénétrance passe d'environ 32% à 78% avec l'utilisation de ces bloqueurs des canaux sodiques [Hong *et al.*, 2004b]. Néanmoins, ce test diagnostique n'est pas fiable à 100% et complique les analyses de liaison familiales. En particulier on peut observer des faux-positifs avec l'ajmaline qui est plus efficace que la flécaïnide [Hong *et al.*, 2004a]. Il a été préconisé d'utiliser en complément un bloqueur des canaux calciques comme le **vérapamil** [Fish & Antzelevitch, 2004].

Les critères de prise en charge des patients ont été harmonisés par l'élaboration de rapports de consensus, le premier focalisé sur le diagnostic, et le second sur la stratification

du risque et les approches thérapeutiques [Wilde *et al.*, 2002 ; Antzelevitch *et al.*, 2005]. Une étude de suivi à long terme a permis de mieux rendre compte de l'évaluation des risques et en particulier a montré le faible risque d'événement rythmique chez les patients asymptomatiques [Eckardt *et al.*, 2005]. De même chez les enfants, le risque est plus élevé si le patient est symptomatique ou diagnostiqué avec un ECG type I de base, le risque étant aggravé par des épisodes de fièvre [Priori *et al.*, 2000a ; Probst *et al.*, 2007].

En plus des troubles de conduction, d'autres anomalies cardiaques peuvent être observées chez les patients atteints d'un syndrome de Brugada mais il n'est pas encore démontré que les différents phénotypes pourraient être causés par un même substrat génétique. Un lien avec la dysfonction sinusale [Sumiyoshi *et al.*, 2005], le développement d'arythmies auriculaires [Morita *et al.*, 2002 ; Bordachar *et al.*, 2004], et le syndrome du QT court [Viskin *et al.*, 2004] ont été évoqués. Il ne faut pas confondre le SBr avec la dysplasie arythmogène du ventricule droit (DAVD) qui est caractérisée par un sus-décalage du segment ST et une TV polymorphe associée à une fibrose du ventricule droit [revue par Calkins, 2006].

Depuis l'implication du gène *SCN5A* par une approche gène candidat en 1998, un locus a été identifié en 2002 par une approche familiale et la mutation, unique, touche le gène *GPD1L* (Tableau 4). Ce gène est également impliqué dans des cas de mort subite du nourrisson [Van Norstrand *et al.*, 2007]. A ce jour une centaine de mutations *SCN5A* liées au SBr sont répertoriées, mais un diagnostic génétique est validé pour seulement 15-25% des patients criblés nécessitant la recherche d'autres gènes morbides [Schulze-Bahr *et al.*, 2003a ; Tan, 2006 ; Antzelevitch *et al.*, 2007].

Tableau 4 – Gènes identifiés dans le syndrome de Brugada (SBr)

Type	Locus	Gène	Protéine, fonction/courant	Effet des mutations	Transmission
SBr1	3p21	<i>SCN5A</i> ^a	Na _v 1.5 (canal sodique α), dépolariation/I _{Na}	↓ I _{Na}	AD, Sp
SBr2	3p22.3 ^b	<i>GPD1L</i> ^c	Glycerol-3-phosphate déshydrogenase 1-like	↓ I _{Na}	AD
SBr3 ?	12p13.3	<i>CACNA1C</i> ^d	Ca _v 1.2 (canal calcique α 1C), dépolariation/I _{Ca-L}	↓ I _{Ca}	AD
SBr4 ?	10p12	<i>CACNB2</i> ^d	Ca _v β 2b (canal calcique β 2b), dépolariation/I _{Ca-L}	↓ I _{Ca}	AD

AD : Autosomique dominant, *Sp* : Sporadique.

Références : a = [Chen *et al.*, 1998] ; b = [Weiss *et al.*, 2002] ; c = [London *et al.*, 2007] ; d = [Antzelevitch *et al.*, 2007].

Concernant l'aspect génotype-phénotype, les profils ECG des patients mutés et non mutés peuvent être distingués par des temps de conduction plus longs pour les patients présentant des mutations *SCN5A* [Smits *et al.*, 2002]. Certaines mutations sont silencieuses à elles seules, mais lorsqu'elles sont présentes de façon composite à l'état hétérozygote, peuvent conduire à un phénotype SBr [Cordeiro *et al.*, 2006]. Par ailleurs, le criblage des apparentés montre une pénétrance faible des mutations *SCN5A* (~20%) qui complique la prise en charge clinique.

Récemment, des mutations des sous-unités calciques $Ca_v1.2$ (A39V ; G490R) et sa sous-unité régulatrice $Ca_v\beta_{2b}$ (S481L) ont été détectées chez des patients atteints de syndrome de Brugada parfois associé à un intervalle QT plus court que la normale [Antzelevitch *et al.*, 2007]. Il est encore prématuré d'affirmer la fréquence de ces mutations du canal calcique de type L, même s'il est suggéré par les auteurs qu'elle serait de 4,9% pour les patients SBr avec un intervalle QT normal (> 370 ms). Alors que les gènes *SCN5A* et *CACNA1C* étaient impliqués dans le SQT (types 3 et 8) par un mécanisme « gain de fonction », il s'agit dans le cas du SBr d'un mécanisme « perte de fonction » (Tableau 4).

Même si les mécanismes physiopathologiques ne sont pas résolus, les observations cliniques placent le ventricule droit au cœur de ce syndrome : l'élévation du segment ST est présente seulement dans les dérivations précordiales droites, les arythmies ectopiques ont pour origine le ventricule droit, et les arythmies ventriculaires sont plus aisément induites depuis le ventricule droit.

La théorie physiopathologique proposée par Yan et Antzelevitch [Yan & Antzelevitch, 1999] repose sur l'hétérogénéité cellulaire du myocarde. La paroi ventriculaire est constituée de 3 couches cellulaires aux propriétés de repolarisation variables : cellules épicrodiques, cellules M, et cellules endocardiques (de l'extérieur vers l'intérieur, Figure 9). Dans l'épicarde, le potentiel d'action (PA, annexe F-I.4.1, page 186) est plus court et le courant transitoire sortant I_{to} est prédominant par rapport au courant entrant calcique, surtout dans le ventricule droit [Di Diego *et al.*, 1996], se manifestant par une encoche en phase 1 du PA et responsable de l'aspect « *spike and dome* » (Figure 40, page 188). Cet aspect est également présent dans les cellules M où il est toutefois moins marqué. L'hétérogénéité spatiale de repolarisation crée un gradient à l'origine du point J sur l'ECG. En conditions physiologiques, il est quasiment inexistant sur l'ECG et le segment ST est isoélectrique car il n'y a pas de gradient de voltage transmural important entre les cellules des différentes couches ventriculaires pour les phases 1 et 2 du PA.

Une diminution du courant sodique entrant (les mutations *SCN5A* identifiées dans le SBr sont des mutations « perte de fonction ») crée un déséquilibre de la balance entre courants entrants et sortants dans l'épicarde du ventricule droit. L'accentuation de l'encoche

et la perte du dôme épicardique causerait un gradient de repolarisation accentué de l'endocarde à l'épicarde (**gradient transmural**) se manifestant à l'ECG par une élévation du point J et une sur-élévation du segment ST. L'aspect est **en selle** (types II et III) si la repolarisation des cellules épicardiques précède la repolarisation des cellules endocardiques et des cellules M ou **convexe** (type I) si l'encoche au niveau du PA épicardique est très prononcée et accompagnée d'une prolongation du PA, ce qui crée une onde T négative sur l'ECG de surface. La perte complète du dôme se traduit par une repolarisation précoce et un raccourcissement anormal de la durée du PA dans une partie des cellules épicardiques (**dispersion épicardique de repolarisation**) et pas dans les cellules endocardiques (**dispersion transmurale de repolarisation**). La dispersion épicardique crée une susceptibilité à développer des arythmies par un phénomène de ré-entrées en phase 2 du PA créant des extrasystoles dans les cellules ayant une période réfractaire plus courte (Figure 9, [Antzelevitch, 2001]).

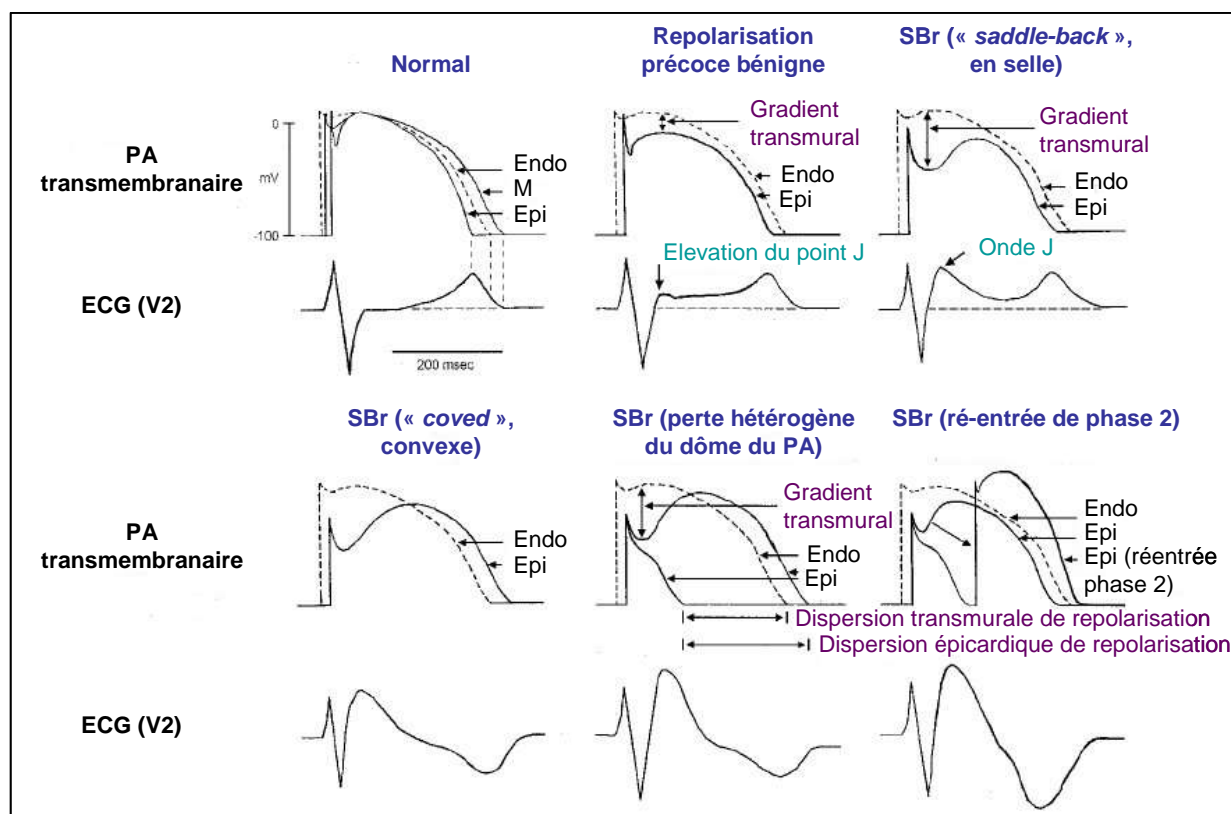


Figure 9 – Hypothèses sur la modification des PA dans le ventricule droit, expliquant la manifestation du syndrome de repolarisation précoce bénin et du SBr à l'ECG

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

Cette théorie a pu être appuyée par des expériences sur des préparations de myocarde ventriculaire droit de chien [Yan & Antzelevitch, 1999]. L'acétylcholine, neurotransmetteur du système nerveux parasympathique prédominant au repos, favorise la perte du dôme du PA épicaudique. Ce résultat est cohérent avec les circonstances des morts subites des patients SBr qui surviennent souvent la nuit ou au repos. Cette hypothèse a été appuyée par des expériences de cartographie chez un modèle de chien en fibrillation ventriculaire [Aiba *et al.*, 2006]. Les femmes seraient moins touchées par le SBr grâce à un courant I_{to} moins prédominant dans l'épicarde [Di Diego *et al.*, 2002 ; Fish & Antzelevitch, 2003]. Une autre hypothèse pour la prédominance masculine est l'effet des androgènes [Antzelevitch, 2003] et en particulier de la testostérone [Shimizu *et al.*, 2007]. Le traitement par la quinidine, un bloqueur non-spécifique du courant sortant I_{to} , est proposé pour rétablir l'équilibre entre les courants entrants (réduits dans le SBr) et sortants et prévenir les événements arythmiques. Son efficacité n'est pas encore totalement prouvée et il est conseillé de l'administrer en cas de nombreux chocs délivrés par le défibrillateur [Belhassen *et al.*, 2004]. Par ailleurs, l'identification de variants dans le gène *KCNH2* chez des patients non mutés *SCN5A* suggère un rôle modulateur du courant I_{Kr} dans le SBr [Verkerk *et al.*, 2005].

D'autres hypothèses physiopathologiques ont été avancées pour expliquer les mécanismes cellulaires du SBr. La première est un retard de conduction dans la paroi libre de la chambre de chasse du ventricule droit [Nagase *et al.*, 2002 ; Tukkie *et al.*, 2004]. La seconde est un dysfonctionnement du système nerveux autonome et de la balance sympathique-parasympathique, ce dernier étant prédominant au repos (tonus vagal) [Wichter *et al.*, 2002 ; Kies *et al.*, 2004]. En effet l'amplitude du segment ST est réduite par les agonistes adrénergiques, alors qu'elle est augmentée par les agonistes parasympathiques ou les antagonistes adrénergiques [Miyazaki *et al.*, 1996].

D'autre part, on définit classiquement le SBr comme une pathologie du cœur structurellement normal. Cependant, des biopsies endomyocardiques chez 18 patients SBr dont 4 mutés *SCN5A* ont montré des anomalies structurales (cardiomyopathies, infections, avec une augmentation de l'apoptose) contribuant aux manifestations des troubles du rythme. Ces anomalies histologiques n'étaient pas détectées par un examen non invasif. Cette étude suggère que les mutations *SCN5A* pourraient causer une dégénérescence et mort cellulaire programmée des cardiomyocytes [Frustaci *et al.*, 2005]. D'autres études avaient déjà évoqué qu'une cardiomyopathie sous-jacente pouvait être responsable d'un phénotype ressemblant au SBr [Corrado *et al.*, 1996 ; Tada *et al.*, 1998].

Plusieurs autres observations restent inexplicées, en particulier le ratio homme/femme très élevé (~8/1, [Rossenbacker & Priori, 2007]), l'incidence élevée en Asie du Sud, la pénétrance faible des mutations *SCN5A*, et les phénotypes variables survenant pour une même mutation.

De plus, le faible taux de mutation *SCN5A* chez les patients Brugada (~15-25%) indique que d'autres gènes à effet majeur sont probablement impliqués et restent à être identifiés. On peut difficilement remettre en cause le diagnostic par séquençage direct de *SCN5A* puisqu'à ce jour aucun réarrangement génomique n'a été mis en évidence dans ce gène [Koopmann *et al.*, 2007], mais on ne peut exclure des mutations dans les régions non-codantes.

Compte tenu de la faible pénétrance des mutations, en particulier chez les femmes, il est difficile d'identifier de grandes familles informatives. C'est pourquoi l'approche gène candidat est largement utilisée comme approche complémentaire pour ce syndrome. L'hypothèse la plus probable est que les mutations auraient un effet sur la densité, la conductance, la cinétique du courant I_{Na} , I_{to} , ou I_{Ca} . Les gènes qui modulent l'activité ou l'expression des récepteurs du système nerveux autonome, qui agissent directement sur la densité de courant et/ou altèrent l'expression des canaux à la membrane sont également des candidats.

I.2.4- Génétique des tachycardies ventriculaires catécholergiques

Cette entité clinique est caractérisée par des tachycardies ventriculaires typiquement bidirectionnelles et polymorphes qui surviennent en présence d'une stimulation adrénergique telles que l'exercice physique, le stress émotionnel, et certaines substances pharmacologiques [Reid *et al.*, 1975 ; Leenhardt *et al.*, 1995]. Le lien avec le système nerveux sympathique lui vaut l'appellation de tachycardie ventriculaire « catécholergique » (TVC). Elle touche plus particulièrement les enfants et engendre un risque élevé de syncope ou de mort subite. Les patients ont des intervalles QT normaux et les TV ne ressemblent pas aux torsades de pointes.

La part de cas familiaux est estimée à 30% [revue par Francis *et al.*, 2005]. A ce jour deux gènes majeurs ont été impliqués (Tableau 5), *RYR2* dans des formes dominantes (50-65% des cas) et *CASQ2* dans des formes récessives (< 5% des cas). Ils codent respectivement pour le récepteur à la ryanodine cardiaque (RYR2) et la calséquestrine-2, qui ont tous les deux un rôle critique dans la signalisation calcique et le couplage excitation-contraction au niveau des cardiomyocytes (Figure 37, page 184). RYR2 est localisé à la membrane du réticulum sarcoplasmique et 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. Les mutations créent un gain de fonction résultant en une augmentation de la libération de Ca²⁺ et notamment pendant la diastole. La calséquestrine-2 est une protéine du réticulum sarcoplasmique qui lie le calcium et prévient la libération diastolique de Ca²⁺. La mutation D307H [Lahat *et al.*, 2001] remplace un acide aspartique chargé négativement par une histidine chargée positivement ce qui exercerait un effet délétère sur la liaison des ions calcium chargés positivement.

La survenue des arythmies est probablement due au déclenchement de post-dépolarisations retardées (DAD, *Delayed After Depolarization*) liées aux anomalies de relargage du Ca²⁺ du réticulum sarcoplasmique, sous le contrôle de l'activité adrénergique. Plusieurs hypothèses sont évoquées pour les mécanismes cellulaires [revue par Wehrens, 2007]. Des modèles de souris hétérozygotes « *Knock-In* » ont été développés pour les mutations de *RYR2* R176Q [Kannankeril *et al.*, 2006] et R4496C [Cerrone *et al.*, 2005]. Comme les patients, ces souris ne développent pas d'arythmies au repos. L'exercice, le stress, ou l'administration de catécholamines induisent des TV bidirectionnelles chez les deux souris. De façon intéressante, un traitement préliminaire avec des bloqueurs des récepteurs β-adrénergiques ne prévient que partiellement l'induction des arythmies dans le modèle R4496C+/-, suggérant que d'autres voies sont impliquées dans l'initiation des arythmies dans les TVC.

Un locus sur le chromosome 7 a été décrit pour une forme récessive dans une famille consanguine (Tableau 5). Lorsqu'une mutation *RYR2* n'est pas identifiée, il est conseillé de cribler les gènes du syndrome d'Andersen (*KCNJ2*) et du SQTl, puisque de telles mutations pourraient mimer le phénotype clinique de TVC en provoquant des TV bidirectionnelles induites par l'exercice sans allongement de l'intervalle QT, en particulier chez les femmes [Tester *et al.*, 2006a]. Une précédente étude avait également montré une prépondérance des mutations *RyR2* chez les hommes (85% versus 17,5%) [Priori *et al.*, 2002]. L'implication du gène *ANK2* est également abordée compte tenu de son rôle dans l'homéostasie calcique et de mutations identifiées chez des patients au phénotype évocateur de TVC [Mohler *et al.*, 2004d].

Tableau 5 – Gènes et locus identifiés dans les tachycardies ventriculaires polymorphes catécholergiques (TVC)

Type	Locus	Gène	Protéine, fonction/courant	Effet des mutations	Transmission
TVC1	1q42.1-q43 ^a	<i>RYR2</i> ^{b,c}	Récepteur à la ryanodine cardiaque, relargage du Ca ²⁺ du RS/I _{Ca}	↑ Ca cytop	AD, Sp
TVC2	1p13.3-p11	<i>CASQ2</i> ^d	Calséquestrine-2, liaison au Ca ²⁺ dans le RS/I _{Ca}	↑ Ca cytop	AR
TVC3	17q23.1-q24.2	<i>KCNJ2</i> ^{e,f}	Kir2.1 (canal potassique α), repos, repolarisation/I _{K1}	↑ I _{K1}	Sp
TVC4 ?	7p14-p22 ^g	?	?	?	AR

RS : Réticulum sarcoplasmique, *AD* : Autosomique dominant, *AR* : Autosomique récessif, *Sp* : Sporadique, *cytop* : Cytoplasmique.

Références : a = [Swan *et al.*, 1999] ; b = [Laitinen *et al.*, 2001] ; c = [Priori *et al.*, 2001] ; d = [Lahat *et al.*, 2001] ; e = [Plaster *et al.*, 2001] ; f = [Donaldson *et al.*, 2004] ; g = [Bhuiyan *et al.*, 2007a].

Le gène *RYR2* est un autre exemple de la connexion entre les différentes cardiopathies puisque certains patients présentant un SQTl atypique ont des mutations dans ce gène [Tester *et al.*, 2005]. Les mutations *RYR2* sont également impliquées dans une forme de dysplasie arythmogène du ventricule droit (type 2, [Tiso *et al.*, 2001]), cependant cette classification est largement controversée. Enfin dernièrement une grande délétion génomique contenant l'exon 3 de *RYR2* a été associée à un large spectre de phénotypes cardiaques en plus des TVC : dysfonction du nœud sinusal et du nœud auriculo-ventriculaire, fibrillation auriculaire, paralysie auriculaire (arrêt de toute activité électrique de l'oreille), et cardiomyopathie dilatée [Bhuiyan *et al.*, 2007b].

Le diagnostic préventif est remarquable puisque la thérapie par les β-bloquants, parfois en association avec un défibrillateur, permet dans la plupart des cas d'éviter la mort subite alors que la mortalité en l'absence de traitement est très élevée (30-50% entre 20 et 30 ans).

I.2.5- Génétique de la fibrillation auriculaire

Caractérisée par une activité électrique rapide et irrégulière de l'oreillette, la fibrillation auriculaire (FA) est reconnue comme le trouble du rythme le plus fréquent. Elle est souvent la résultante d'une cardiopathie sous-jacente, mais dans 10 à 20% des cas elle est idiopathique. La perte de coordination de la contraction des oreillettes résulte en une diminution de remplissage des ventricules et une stagnation du sang dans les oreillettes, ce qui prédispose respectivement à l'insuffisance cardiaque et aux accidents thrombo-emboliques (accident vasculaire cérébral par migration du thrombus).

La description de cas familiaux dès 1936 puis du premier locus en 10q22-q24 [Brugada *et al.*, 1997], ainsi qu'une évidence pour une forte héritabilité à partir d'une étude sur des patients islandais [Arnar *et al.*, 2006], ont démontré l'importance des facteurs génétiques conjointement aux facteurs environnementaux dans la pathogenèse de la FA. Même si le gène du locus 10q22-q24 n'a toujours pas été identifié, d'autres gènes ont été impliqués dans des formes familiales (Tableau 6). En plus des gènes décrits dans les cas de phénotype auriculaire prédominant, des mutations pour des phénotypes associant des anomalies ventriculaires ont été trouvées dans les gènes *SCN5A*, *KCNH2* et *LMNA* [revue par Fatkin *et al.*, 2007]. Récemment, une mutation dans *SCN5A* (N1986K) a été identifiée dans une famille unique présentant un phénotype auriculaire isolé [Ellinor *et al.*, 2008]. De plus, une mutation dans le gène *KCNE5* chez un cas sporadique a été rapportée. La co-expression de *KCNE5* sauvage avec *KCNQ1* réduit le courant I_{Ks} . La mutation *KCNE5*-L65F fait disparaître cette réduction de courant et s'apparente à un gain de fonction de I_{Ks} , comme dans la forme FA1 [Ravn *et al.*, 2008].

Des mutations somatiques, présentes dans le tissu cardiaque mais pas dans les lymphocytes, ont été identifiées dans le gène *GJA5* codant pour la connexine-40 chez des patients présentant une fibrillation auriculaire idiopathique [Gollob *et al.*, 2006].

Récemment, une étude d'association pan-génomique a montré une association forte entre deux variants situés au niveau du locus 4q25 (le locus du gène *ANK2*) et la fibrillation auriculaire [Gudbjartsson *et al.*, 2007]. Ces données sont intéressantes étant donné le phénotype de la famille d'origine mutée pour le gène *ANK2*, où une fibrillation auriculaire paroxystique puis permanente est associée au phénotype *SQTL4* [Mohler *et al.*, 2003]. D'autres études d'association sur des cohortes de taille limitée de patients ont mis en évidence des variants significativement liés à la fibrillation auriculaire [revue par Fatkin *et al.*, 2007].

Tableau 6 – Gènes et loci identifiés dans la fibrillation auriculaire (FA)

Type	Locus	Gène	Protéine, fonction/courant	Effet des mutations	Transmission
FA1	11p15.5	KCNQ1 ^a	K _v LQT1 ou K _v 7.1 (canal potassique α), repolarisation/I _{Ks}	↑ I _{Ks}	AD
FA2	21q22.12	KCNE2 ^b	MiRP1 (canal potassique β), repolarisation/I _{Kr}	gain de fonction sur courant KCNQ1-KCNE2	AD
FA3	17q23.1-q24.2	KCNJ2 ^c	Kir2.1 (canal potassique α), repos, repolarisation/I _{K1}	↑ I _{K1}	AD
FA4	1q21.1	GJA5 ^d	connexine-40	↓ couplage intercellulaire	somatique
FA5	21q22.12	KCNE1 ^e	minK ou Isk (canal potassique β), repolarisation/I _{Ks}	↓	étude d'association
FA6	12p13	KCNA5 ^f	K _v 1.5 (canal potassique), repolarisation/I _{Kur}	↓ I _{Kur}	AD
FA7	4q25-q27 ^g	ANK2 ^h	ankyrine-B, ancrage/I _{Na/Ca}	multiple	AD
FA8	7q35-q36	KCNH2 ⁱ	HERG ou K _v 11.1 (canal potassique α), repolarisation/I _{Kr}	↑ I _{Kr}	AD
FA9	12p12.1	ABCC9 ^j	SUR2A (ATP-binding cassette)	↑ surcharge Ca ²⁺	Sp
	11q13-q14	KCNE3 ^k	MiRP2 (canal potassique β), repolarisation/I _{Ks}	↑ I _{Kr} ↑ I _{to}	Sp
	Xq22.3	KCNE5 ^l	MiRP4 (canal potassique β), repolarisation	↑ I _{Ks}	Sp
	10q22-q24 ^m	?	?	?	AD
	6q14-q16 ⁿ	?	?	?	AD
	5p13 ^o	?	?	?	AR
	10p11-q21 ^p	?	?	?	AD
	5p15 ^q	?	?	?	AD

AD : Autosomique dominant, *AR* : Autosomique récessif, *Sp* : Sporadique.

Références : a = [Chen et al., 2003] ; b = [Yang et al., 2004b] ; c = [Xia et al., 2005] ; d = [Gollob et al., 2006] ; e = [Lai et al., 2002] ; f = [Olson et al., 2006] ; g = [Schott et al., 1995] ; h = [Mohler et al., 2003] ; i = [Hong et al., 2005a] ; j = [Olson et al., 2007] ; k = [Lundby et al., 2008] ; l = [Ravn et al., 2008] ; m = [Brugada et al., 1997] ; n = [Ellinor et al., 2003] ; o = [Oberti et al., 2004] ; p = [Volders et al., 2007] ; q = [Darbar et al., 2008].

La contribution de la génétique dans la FA a longtemps été discutée [Allessie, 1997]. Cet exemple démontre qu'une maladie aux étiologies variées peut être abordée par une approche familiale qui aide à une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques par l'identification de facteurs génétiques. La part des facteurs génétiques et environnementaux n'est pas encore déterminée avec précision, même si des mutations d'un gène à effet majeur semblent être impliquées dans les formes familiales plus précoces et les facteurs de prédisposition communs (SNP) liés à la fibrillation auriculaire apparaissant avec le vieillissement.

I.2.6- Génétique de la dysfonction sinusale

La dysfonction sinusale (DS, *Sinus Node Dysfunction*, *Sick Sinus Syndrome*) est liée au mauvais fonctionnement du nœud sinusal, le « *pacemaker* » du cœur. L'anomalie a pour origine un défaut du potentiel d'action et se traduit par un rythme sinusal incompatible avec la physiologie cardiaque normale. Elle se manifeste par une bradycardie sinusale, arrêt sinusal, bloc sino-auriculaire, tachyarythmies chroniques, et des réponses inappropriées de la fréquence cardiaque à l'exercice ou au stress [revue par Dobrzynski *et al.*, 2007].

Même si l'augmentation de l'incidence de dysfonction sinusale avec l'âge laisse penser qu'elle est liée majoritairement à une dégénérescence du tissu fibreux et secondaire à d'autres anomalies cardiaques, le caractère héréditaire de la bradycardie sinusale a été évoqué dès 1972 [Sarachek & Leonard, 1972]. Il est aujourd'hui démontré qu'il existe en effet des cas idiopathiques, et que les canaux ioniques et leurs partenaires sont impliqués dans des formes familiales. Plusieurs mutations ont été identifiées, dans le gène codant pour HCN4 qui participe à la dépolarisation spontanée des cellules nodales (courant I_f , « *funny* »), et SCN5A pour une forme récessive avec des mutations composites (Tableau 7). Le gène ANK2 est impliqué dans le syndrome du QT long de type 4 dont le trait phénotypique majeur en plus de l'allongement de l'intervalle QT est la dysfonction sinusale [Mohler *et al.*, 2003]. Cet aspect sera évoqué plus en détail dans les résultats (paragraphe II.1.1, page 64).

Tableau 7 – Gènes identifiés dans la dysfonction sinusale (DS)

Locus	Gène	Protéine, fonction/courant	Effet des mutations	Transmission
15q24-q25	HCN4 ^{a,b}	HCN4 (canal cationique), dépolarisation spontanée/ I_f	↓ I_f	AD, Sp
3p21	SCN5A ^c	Na _v 1.5 (canal sodique α), dépolarisation/ I_{Na}	↓ I_{Na}	AR composite

AD : Autosomique dominant, *AR* : Autosomique récessif, *Sp* : Sporadique.

Références : a = [Schulze-Bahr *et al.*, 2003b] ; b = [Milanesi *et al.*, 2006] ; c = [Benson *et al.*, 2003].

Il faut noter que le modèle de souris *Scn5a*^{+/-} présente une dysfonction sinusale avec une fréquence cardiaque affectée et un bloc sino-auriculaire [Lei *et al.*, 2005]. Paradoxalement, le canal Na_v1.5 n'est pas exprimé au centre du nœud sinusal, contrairement à Na_v1.1 (SCN1A). Dans le nœud sinusal, le canal calcique majoritaire est Ca_v1.3 (CACNA1D), qui est un excellent gène candidat [Platzer *et al.*, 2000 ; Mangoni *et al.*, 2003] et pour lequel un projet a été initié au laboratoire en collaboration avec le docteur Eric Schulze-Bahr de l'Université de Münster (Allemagne). Je n'évoquerai pas dans ce manuscrit mes travaux concernant ce projet pour lequel les analyses fonctionnelles sont en cours.

I.2.7- Génétique des troubles de conduction

On définit comme trouble de conduction (TdC) une anomalie du système de conduction électrique du cœur (Figure 36, page 183) pouvant se positionner à différents niveaux et degrés définis par l'ECG. Il peut être de gravité variable allant d'un simple ralentissement (bloc incomplet) à une interruption complète de la dépolarisation des cellules (bloc complet). Les blocs auriculo-ventriculaires (BAV) peuvent siéger au niveau du nœud auriculo-ventriculaire (bloc nodal), du tronc du faisceau de His (bloc infra-hissien), ou des branches droites et gauches du faisceau de His (bloc de branche). Lorsque les ventricules sont isolés des oreillettes (BAV complet), les cellules douées d'automatisme du nœud auriculo-ventriculaire ou du faisceau de His prennent le relais, on parle d'échappement jonctionnel. La conséquence est une bradycardie d'où l'apparition de syncope qui peut conduire à l'implantation d'un stimulateur cardiaque (« *pacemaker* » ou « pile ») pour prévenir la mort subite. Plus le bloc complet siègera bas, plus le rythme jonctionnel sera faible et le BAV sévère. La prévalence élevée des TdC en particulier chez les personnes âgées [Eriksson *et al.*, 1998] en fait une cause majeure d'implantation.

L'étiologie est dans la majorité des cas inconnue. Les troubles de conduction peuvent être acquis ou secondaires à une cardiopathie ou une atteinte valvulaire, à une chirurgie cardiaque, plus rarement à une maladie inflammatoire, ou idiopathiques. Ils doivent aussi être distingués du syndrome de Wolff-Parkinson-White qui est dû à une voie de conduction anormale accessoire qui cause une pré-excitation ventriculaire [revues par Ehtisham & Watkins, 2005 ; Light, 2006].

Parmi les formes idiopathiques, on distingue les BAV congénitaux et la forme dégénérative, progressive, des troubles de conduction (« *Progressive Cardiac Conduction Defect* »). Cette forme qui s'aggrave avec l'âge est également connue comme la maladie de « Lenègre » [Lenegre, 1964] ou « Lev » [Lev, 1964]. L'atteinte commence très souvent par l'atteinte d'une des branches du faisceau de His et des fibres de Purkinje, se manifestant par un intervalle PR prolongé et un élargissement du QRS à l'ECG, et va évoluer progressivement vers un bloc complet. La manifestation la plus fréquente au départ est le bloc de branche droit. La maladie de Lenègre est caractérisée par une dégénérescence fibrotique diffuse du système de conduction atteignant principalement les parties distales des deux branches, alors que la maladie de Lev est décrite comme une fibrose du faisceau de His et des parties proximales des deux branches.

Même si la maladie de Lenègre est considérée comme une pathologie du vieillissement, plusieurs formes familiales ont été décrites et suggéraient l'intervention de facteurs héréditaires. En 1995, deux familles au phénotype similaire, une libanaise [Stephan,

1978 ; de Meeus *et al.*, 1995] et une sud-africaine [Brink & Torrington, 1977 ; Brink *et al.*, 1995] ont été liées à un locus en 19q13.3. Le gène n'a pas encore été publié (Tableau 8).

Le premier gène de TdC a été identifié en 1999 par notre équipe dans une forme familiale autosomique dominante dégénérative, il s'agit du gène *SCN5A*, déjà impliqué à l'époque dans le syndrome du QT long congénital et le syndrome de Brugada [Schott *et al.*, 1999] (Tableau 8). Il a été montré que l'haploinsuffisance additionnée au vieillissement est responsable du phénotype [Probst *et al.*, 2003]. Ce même gène a d'autre part été impliqué dans des formes congénitales de TdC [Tan *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 2002 ; Herfst *et al.*, 2003]. Une forme hétérozygote composite W156X/R225W est responsable d'une forme sévère de troubles du système de conduction [Bezzina *et al.*, 2003].

Tableau 8 – Gène et locus identifiés dans les troubles de conduction cardiaque progressifs isolés (TdC)

Type	Locus	Gène	Protéine, fonction/courant	Effet des mutations	Transmission
TdC1	19q13.3 ^{a,b}	?	?	?	AD
TdC2	3p21	<i>SCN5A</i> ^c	Na _v 1.5 (canal sodique α), dépolérisation/I _{Na}	↓ I _{Na}	AD

AD : Autosomique dominant.

Références : a = [Brink *et al.*, 1995] ; b = [de Meeus *et al.*, 1995] ; c = [Schott *et al.*, 1999].

Peu d'informations sont disponibles sur la proportion de troubles de conduction d'origine génétique et en particulier des formes familiales liées au gène *SCN5A*. La pénétrance est estimée à environ 75% chez les hommes et 50% chez les femmes à partir des données de la famille libanaise liée au locus du chromosome 19 [Stephan *et al.*, 1997]. Le fait que la pénétrance soit incomplète et que l'évolution soit souvent lente laisse supposer que les formes héréditaires ont été sous-estimées.

L'étude de la souris *Scn5a*^{+/-} a démontré qu'il s'agit d'un excellent modèle de maladie de Lenègre puisqu'elle présente un ralentissement de la conduction [Papadatos *et al.*, 2002] et une aggravation des troubles de conduction avec l'âge ainsi qu'une fibrose et une altération des jonctions communicantes [van Veen *et al.*, 2005 ; Royer *et al.*, 2005]. Sa caractérisation a prouvé qu'un défaut d'un canal ionique peut conduire à des réarrangements au niveau structural, dans ce cas précis la fibrose et l'expression de marqueurs de l'hypertrophie. Ces résultats ont confirmé les observations antérieures de Lenègre et Lev qui suspectaient la fibrose comme étant responsable de l'évolution lente et progressive vers les troubles de conduction « dégénératifs ». L'hétérogénéité phénotypique observée chez ces souris est investiguée au laboratoire par l'équipe de Flavien Charpentier.

D'autres gènes ont été identifiés pour des formes non isolées où l'anomalie du système de conduction est associée à une cardiopathie congénitale, cardiomyopathie, ou trouble neuromusculaire. On peut citer notamment *NKX2.5* (avec malformations congénitales [Schott *et al.*, 1998]) et *LMNA* (avec cardiomyopathie dilatée [Fatkin *et al.*, 1999]) [revues par Benson, 2004 ; Wolf & Berul, 2006].

1.2.8- Les syndromes chevauchants

Les données précédentes montrent qu'un même gène peut être impliqué dans plusieurs troubles du rythme, les mutations altérant certains aspects de la fonction du canal et ayant une répercussion électrophysiologique et phénotypique variable. De façon intéressante, une même mutation, dans une même famille, peut conduire à différents phénotypes co-existants. Je détaillerai ici les aspects concernant les mutations du gène du canal sodique cardiaque *SCN5A*, puis le syndrome ankyrine-B, protéine non canalaire impliquée au départ dans le syndrome du QT long congénital qui n'est plus aujourd'hui considéré comme le trait phénotypique majeur lié aux mutations du gène *ANK2*.

1.2.8.1- $Na_v1.5$, ses sous-unités β , et les canalopathies associées

Les canaux sodiques dépendants du potentiel ont un rôle fondamental dans les cellules excitables du système nerveux central, périphérique, et cardiaques [revues par Wood & Baker, 2001 ; Yu & Catterall, 2003]. Ils sont situés à la membrane plasmique et responsables de la phase de dépolarisation rapide (phase 0) du potentiel d'action. Leur rôle dans le potentiel d'action cardiaque est essentiel [revues par Tan *et al.*, 2003 ; Meadows & Isom, 2005]. Les canaux sodiques sont *a priori* des hétérotrimères, composés d'une sous-unité α « canalaire » sous l'influence de deux sous-unités β régulatrices « auxiliaires » (Figure 10).

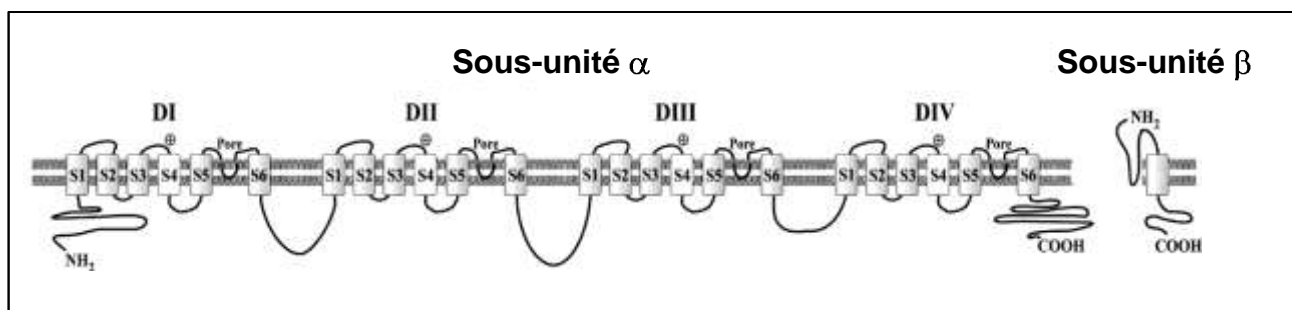


Figure 10 – Représentation schématique du canal sodique voltage-dépendant

La sous-unité α ($Na_v1.5$, *SCN5A* majoritaire au niveau cardiaque) est constituée de quatre domaines DI-DIV à six segments transmembranaires S1-S6, alors que la sous-unité β contient un segment transmembranaire ($Na_v\beta1-4$, *SCN1B*, *SCN2B*, *SCN3B*, *SCN4B*). Modifié d'après [Moric *et al.*, 2003].

1- Sous-unités α du canal sodique

La sous-unité α qui forme le pore du canal comprend quatre domaines (DI, DII, DIII, DIV) constitués chacun de 6 segments transmembranaires (S1-S6) (Figure 10).

Les sous-unités α sont codées par au moins 10 gènes. Celles dont l'expression a été détectée dans les cellules cardiaques humaines sont $\text{Na}_v1.5$ (*SCN5A*, 3p21), $\text{Na}_v1.1$ (*SCN1A*, 2q24.3), $\text{Na}_v1.3$ (*SCN3A*, 2q24), $\text{Na}_v1.4$ (*SCN4A*, 17q23-q25.3) et $\text{Na}_v2.1/2.3$ (*SCN6A/7A*, 2q21-q23).

Le canal $\text{Na}_v1.5$ (ou hH1) codé par le gène *SCN5A* est la sous-unité majoritaire dans les cardiomyocytes contractiles. C'est une protéine glycosylée d'environ 260 kDa constituée de 2 016 acides aminés et insensible à la tétrodotoxine [Gellens *et al.*, 1992]. En plus des sous-unités régulatrices β , elle interagit avec des protéines cytoplasmiques : ankyrine-G, FHF1B, calmoduline, Nedd4-like ubiquitine-protéine ligases, Fyn [revue par Abriel & Kass, 2005], dystrophines et syntrophines [Gavillet *et al.*, 2006], PTPH1 [Jespersen *et al.*, 2006], 14-3-3 [Allouis *et al.*, 2006] et MOG1 [Wu *et al.*, 2008]. Une revue récente détaille les aspects du rôle et de la régulation de $\text{Na}_v1.5$ qui est complexe puisque de nombreuses protéines entrent en jeu, et rassemble les données sur les modèles animaux existants [Abriel, 2007]. Une autre revue s'est intéressée au trafic et à l'expression des canaux sodiques [Herfst *et al.*, 2004].

2- Sous-unités β régulatrices du canal sodique

Les sous-unités régulatrices β sont également des glycoprotéines transmembranaires. Elles sont constituées d'une partie N-terminale extracellulaire de grande taille contenant un domaine immunoglobuline, un segment transmembranaire, et une partie C-terminale intracellulaire (Figure 10). Elles modifient les propriétés biophysiques et le transport du canal et ont un rôle dans l'adhésion cellulaire en interagissant avec les protéines du cytosquelette et les protéines de la matrice extracellulaire [revues par Isom, 2001 ; Hanlon & Wallace, 2002 ; Tseng *et al.*, 2007]. Quatre sous-unités ont été décrites à ce jour, et toutes sont exprimées dans le cœur (Tableau 9).

Les sous-unités $\text{Na}_v\beta1$ (*SCN1B*) et $\text{Na}_v\beta3$ (*SCN3B*) se lient de façon non-covalente aux sous-unités α alors que les sous-unités $\text{Na}_v\beta2$ (*SCN2B*) et $\text{Na}_v\beta4$ (*SCN4B*) s'associent aux sous-unités α par un pont disulfure.

Des études postérieures ont montré l'existence de transcrits alternatifs pour la sous-unité $\text{Na}_v\beta1$ chez le rat ($\beta1_A$, [Kazen-Gillespie *et al.*, 2000]) et un autre transcrit alternatif distinct chez l'homme ($\beta1_B$, [Qin *et al.*, 2003]), par rétention d'une partie intronique. Ce dernier code pour une protéine de 268 acides aminés (~30 kDa), seuls les 149 premiers

résidus étant communs à Na_vβ1. Elle est exprimée principalement dans le cerveau, la moelle épinière, les ganglions de la racine dorsale, et le muscle squelettique. Les études fonctionnelles dans les ovocytes de Xénope ont montré que sa co-expression avec Na_v1.2 augmente la densité de courant sans changer significativement la cinétique et les propriétés dépendantes du voltage, contrairement aux sous-unités Na_vβ1 et Na_vβ1_A.

Tableau 9 – Sous-unités β du canal sodique

Protéine	Gène	Locus	Expression	Caractérisation
Na _v β1	SCN1B	19q13.1	SNC, cœur, muscle squelettique	[Isom <i>et al.</i> , 1992 ; McClatchey <i>et al.</i> , 1993 ; Makita <i>et al.</i> , 1994]
Na _v β2	SCN2B	11q23	SNC, cœur	[Isom <i>et al.</i> , 1995 ; Eubanks <i>et al.</i> , 1997]
Na _v β3	SCN3B	11q23.3	SNC, cœur	[Morgan <i>et al.</i> , 2000]
Na _v β4	SCN4B	11q23.3	SNPe, SNC, cœur	[Yu <i>et al.</i> , 2003]

SNC : Système nerveux central, SNPe : Système nerveux périphérique.

La sous-unité Na_vβ1 phosphorylée est co-localisée avec la connexine-43, la N-cadhérine, et Na_v1.5 au niveau des disques intercalaires dans les myocytes ventriculaires [Malhotra *et al.*, 2004]. Son effet sur Na_v1.5 est controversé *in vitro* [revue par Balsler, 1999]. Peu d'études se sont focalisées sur son activité *in vivo*. Récemment la contribution de β1 au niveau cardiaque a été investiguée par l'étude de la souris « Knock-Out » *Scn1b*, et lui suggère un rôle critique dans l'excitabilité cardiaque [Lopez-Santiago *et al.*, 2007].

3- Implication dans les arythmies cardiaques

Les mutations du gène *SCN5A* sont responsables de plusieurs troubles du rythme par une altération à différents niveaux de la fonction de la protéine [revues par Moric *et al.*, 2003 ; Napolitano *et al.*, 2003 ; Saffitz, 2005]. Les conséquences fonctionnelles sont évaluées par la technique électrophysiologique de *patch-clamp* dans des systèmes d'expression cellulaires hétérologues (COS-7, CHO, HEK-293). Dans le cas du syndrome du QT long (SQTL), il s'agit de mutations « gain de fonction », avec un courant I_{Na} persistant retardant la repolarisation. Dans le syndrome du Brugada (SBr) et les troubles de conduction (TdC), il s'agit au contraire de mutations « perte de fonction », défaut d'expression du canal, augmentation de son inactivation ou prolongation de la période réfractaire avant sa réactivation. Aujourd'hui environ 80 mutations ont été identifiés pour le SQTL3, 100 pour le SBr, 20 pour les TdC, et 10 pour les DS dans tous les domaines du canal (*Inherited*

Arrhythmias Database [http://www.fsm.it/cardmoc/], Figure 11). Les mutations sont nommées à partir de l'isoforme « a » de *SCN5A* (NM_198056, NP_932173).

De façon plus surprenante, une même mutation peut conduire à des phénotypes variables, parfois dans une famille, ce qui fait de la canalopathie *SCN5A* un syndrome chevauchant. Voici quelques exemples des premières mutations décrites conduisant à plusieurs phénotypes :

- SBr, SQTL3 et TdC mineur [1795insD, Bezzina *et al.*, 1999]
- SBr et TdC [G1406R, Kyndt *et al.*, 2001]
- SQTL3 et TdC [deltaKPQ, Zareba *et al.*, 2001]
- SQTL3, SBr et TdC mineur [DeltaK1500, Grant *et al.*, 2002]
- SBr, TdC et DS [E161K, Smits *et al.*, 2005]
- TdC, DS et TV [L1821fs/10, Tan *et al.*, 2007]

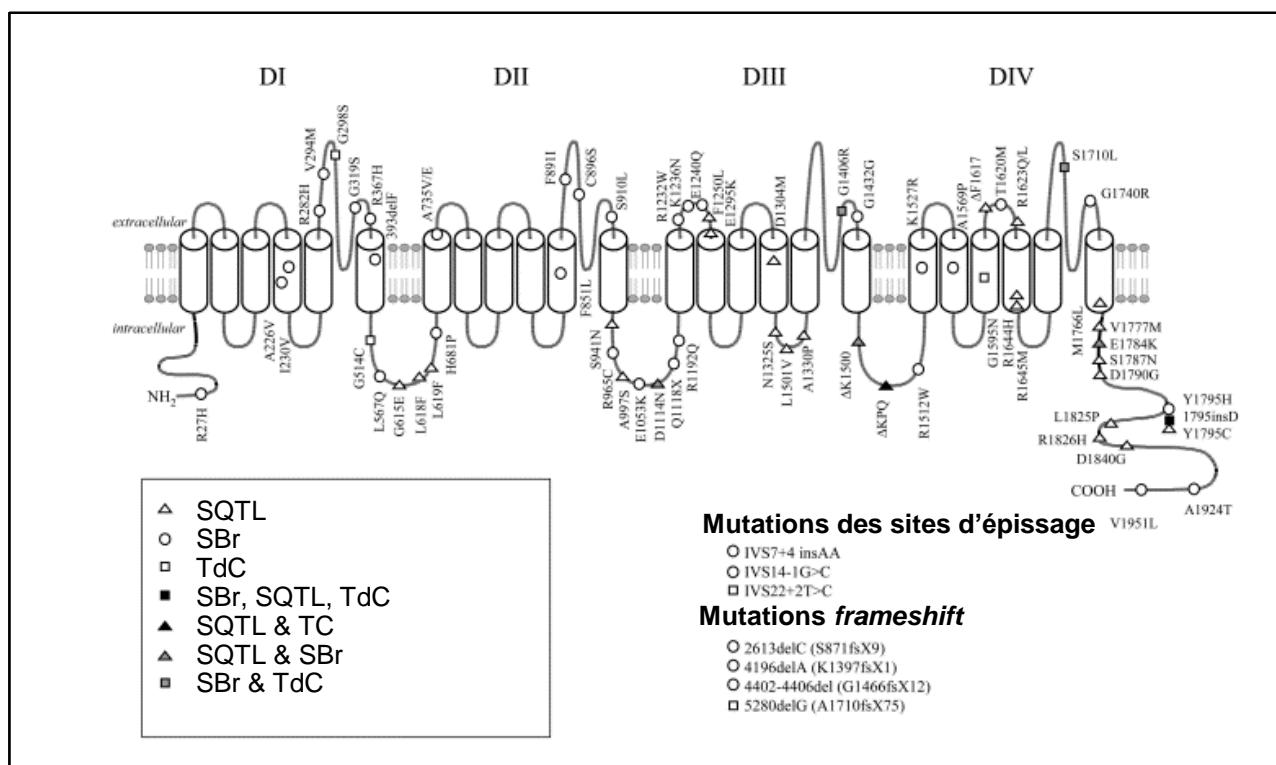


Figure 11 – Représentation schématique des mutations du gène *SCN5A* et leur localisation sur le canal $Na_v1.5$

Ces mutations sont impliquées dans le syndrome du QT long congénital de type 3, le syndrome de Brugada, les troubles de conduction, et des syndromes chevauchants. DI, II, III, IV : les quatre domaines à 6 segments transmembranaires de $Na_v1.5$. Modifié d'après [Tan *et al.*, 2003].

Des études de la mutation 1795insD par différentes approches, modèle informatique et modèle de souris hétérozygote « *Knock-In* » ont montré que la mutation à elle seule est suffisante pour causer plusieurs phénotypes [Clancy & Rudy, 2002 ; Remme *et al.*, 2006].

Les variations d'expression phénotypique pourraient être attribuées en partie à des effets génétiques modulateurs, à l'intérieur même du gène *SCN5A* ou dans d'autres gènes.

En 2006, l'équipe de Connie Bezzina a montré qu'un haplotype de six SNP dans le promoteur de *SCN5A* [Yang *et al.*, 2004a], fréquent dans la population asiatique (22%) mais absent chez les caucasiens et les africains, réduit la transcription de celui-ci et pourrait avoir un rôle dans l'expressivité du phénotype [Bezzina *et al.*, 2006]. Dans une autre publication, elle a montré que certains polymorphismes du promoteur de *SCN5A* font varier l'expression du gène *in vitro* [Yang *et al.*, 2007]. D'autre part, il a été montré qu'un polymorphisme fréquent de *SCN5A*, H558R, présent chez 20% de la population, pourrait avoir un effet protecteur pour le syndrome de Brugada ou les troubles de conduction. En effet, présent sur l'allèle non muté, il restaure le trafic de $Na_v1.5$ altéré par la mutation R282H [Poelzing *et al.*, 2006], ou diminue les effets de la mutation T512I sur le même allèle [Viswanathan *et al.*, 2003]. Ces exemples pourraient expliquer les défauts de pénétrance dans certains cas. La modulation de la sévérité du phénotype par un polymorphisme exonique, R1193Q, a été évoquée pour les troubles de conduction [Niu *et al.*, 2006]. Ces polymorphismes communs, comme S524Y, contribueraient également à la réponse aux traitements pharmaceutiques [Shuraih *et al.*, 2007]. Les études sont pour l'instant limitées même si elles montrent que des polymorphismes sont plus ou moins communs selon les ethnies [Ackerman *et al.*, 2004] et devraient être pris en compte dans le futur pour permettre une amélioration du diagnostic et de la prise en charge thérapeutique. Par exemple, le polymorphisme S1103Y commun chez les afro-américains est associé à un risque accru de MSC et mort subite du nourrisson dans cette population, alors qu'il est absent chez les caucasiens [Splawski *et al.*, 2002 ; Plant *et al.*, 2006]. Les futures études d'association à grande échelle permettront d'éclaircir l'importance de ces polymorphismes dans les canalopathies.

En plus du SBr, SQTL et TdC, les mutations *SCN5A* ont également été trouvées dans d'autres arythmies ou des anomalies structurales cardiaques. Elles sont impliquées dans des cas de FV idiopathiques [Akai *et al.*, 2000], mort subite du nourrisson [Wang *et al.*, 2007a], dysfonction sinusale [mutations récessives, Benson *et al.*, 2003], paralysie auriculaire associée à un SBr [Takehara *et al.*, 2004] ou non [avec variant rare dans la connexine-40, Groenewegen *et al.*, 2003], cardiomyopathie dilatée associée à TdC et anomalie du système de conduction [McNair *et al.*, 2004] ou FA [Olson *et al.*, 2005], SBr, TV monomorphe et anomalies structurales du ventricule droit [mutation homozygote, Frigo *et al.*, 2007], et SBr et

syncope à médiation neurale [Makita *et al.*, 2007]. Une nouvelle mutation suggère une association à un orage rythmique dans un contexte d'infarctus du myocarde [Hu *et al.*, 2007].

Ces syndromes chevauchants augmentent la difficulté pour les cliniciens à administrer un traitement adapté. En effet un traitement à la flécaïnide (antiarythmique de classe Ic) pour diminuer la durée de l'intervalle QT dans le cadre d'un SQTL de type 3 peut déclencher une sur-élévation du segment ST caractéristique du syndrome de Brugada et augmenter le risque de développer des arythmies ventriculaires [Priori *et al.*, 2000b].

Enfin, des mutations dans les protéines partenaires de Na_v1.5, ayant un rôle dans son activité, sa localisation subcellulaire, sa synthèse et sa dégradation, pourraient être à l'origine de pathologies liées à *SCN5A*. Tout récemment, une mutation dans le gène *SCN4B* codant pour la sous-unité régulatrice $\beta 4$ a été impliquée dans le SQTL [Medeiros-Domingo *et al.*, 2007].

1.2.8.2- Du syndrome du QT long de type 4 au syndrome ankyrine-B

1- Les ankyrines, protéines d'ancrages

L'ankyrine-B appartient à la famille multigénique des ankyrines, protéines adaptatrices intracellulaires d'ancrage (du grec *ankyra*). Chez les vertébrés, il existe trois classes d'ankyrine. L'**ankyrine-R** (« *Restricted distribution* »), l'**ankyrine-B** (« *Broadly expressed* »), et l'**ankyrine-G** (« *General expression* » ou « *Giant size* ») sont codées respectivement par les gènes *ANK1*, *ANK2*, et *ANK3* (Figure 12). Les trois ankyrines R, B et G sont ubiquitaires et co-exprimées notamment dans le cerveau, le muscle cardiaque, le muscle squelettique et le rein. Elles possèdent trois domaines : (i) un domaine de liaison à la membrane en partie N-terminale comprenant 24 *ANK repeats*, (ii) un domaine central de liaison à la spectrine et (iii) un domaine régulateur en C-terminal (Figure 12). Les *ANK repeats* sont des motifs de 33 acides aminés répétés en tandem et impliqués dans la reconnaissance des protéines. Ils sont présents dans de nombreuses protéines aux fonctions variées [revue par Mosavi *et al.*, 2004]. Le domaine C-terminal est plus divergeant, et détermine l'activité spécifique de chaque ankyrine dans les cardiomyocytes [Mohler *et al.*, 2002b]. Il comprend un domaine de mort peu étudié et des résidus clés dans une hélice amphipathique α qui est essentielle pour le fonctionnement de l'ankyrine-B [Mohler *et al.*, 2004b]. Ce domaine C-terminal aurait également un rôle dans la régulation du domaine de liaison à la membrane [Abdi *et al.*, 2006]. Le domaine de mort de l'ankyrine-G interagit avec Fas dans l'épithélium rénal où elle pourrait avoir un rôle de protéine adaptatrice dans la mort cellulaire [Del Rio *et al.*, 2004].

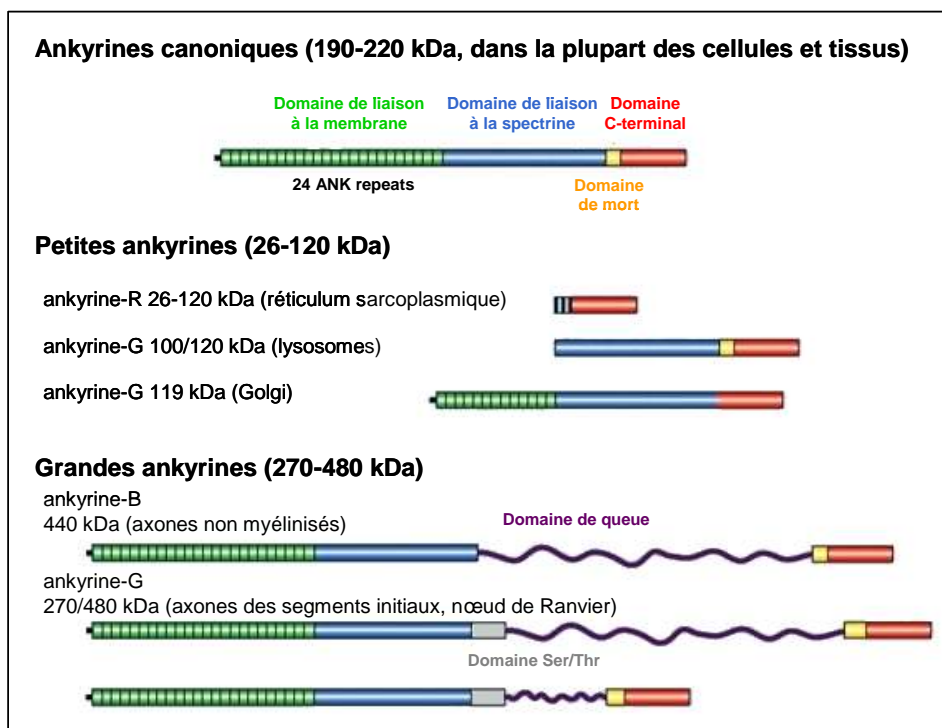


Figure 12 – Domaines fonctionnels et différentes isoformes des ankyrines R, B, G

Modifié d'après revue par [Mohler *et al.*, 2002a].

Les ankyrines ont pour rôle de cibler dans la cellule des protéines à des domaines membranaires spécialisés (membrane plasmique, membrane du réticulum endoplasmique/sarcoplasmique), en jouant l'intermédiaire entre ces protéines membranaires et les protéines du cytosquelette. Elles sont impliquées dans l'organisation du squelette membranaire, le transport ionique, le maintien de la polarité cellulaire et la régulation de l'adhésion cellule-cellule.

Dans le coeur, elles sont localisées au niveau des stries Z et plus particulièrement à proximité des T-tubules et du réticulum sarcoplasmique. Elles interagissent avec des canaux ioniques, échangeurs, transporteurs et pompes (canaux Na^+ voltage-dépendants, échangeurs Na/Ca [Cunha *et al.*, 2007] et anioniques AE 1-3, ATPases Na^+/K^+ et H^+/K^+), des récepteurs de relargage du calcium (RyR et récepteur à l'InsP(3)), le récepteur Sig-1R [Hayashi & Su, 2001], des molécules d'adhésion cellulaire (des familles CD44 et L1CAM), et des protéines du cytosquelette (β -spectrine [Mohler *et al.*, 2004e], tubuline, clathrine, vimentine), Figure 13 [revues par Rubtsov & Lopina, 2000 ; Bennett & Baines, 2001 ; Bennett & Chen, 2001 ; Mohler *et al.*, 2002a]. Récemment un nouveau partenaire de l'ankyrine-B a été identifié pour la partie C-terminale du domaine de liaison à la spectrine dans les cardiomyocytes : B56 α , sous-unité régulatrice de la protéine phosphatase 2A (PP2A), qui a un rôle de régulation par phosphorylation des protéines liées aux canaux ioniques et de modulation de la signalisation β -adrénergique [Bhasin *et al.*, 2007].

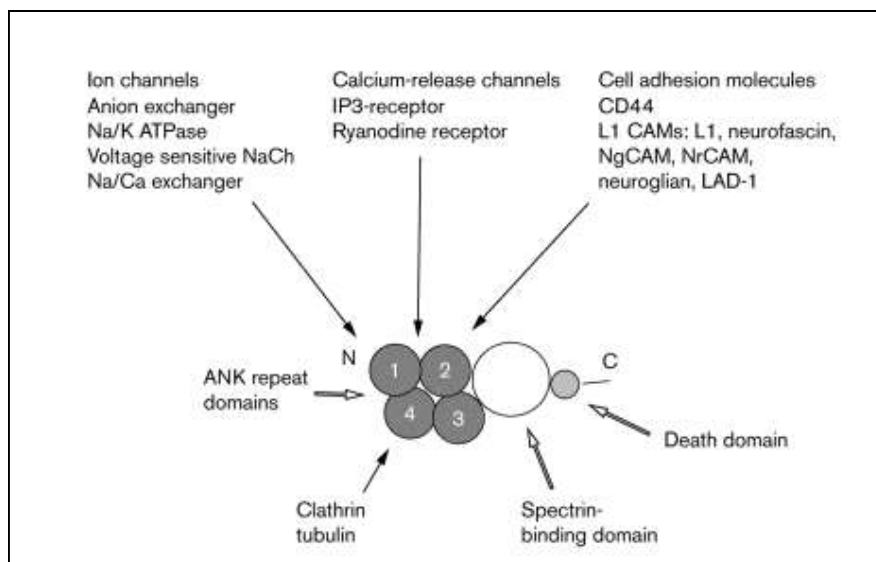


Figure 13 – Représentation schématique des domaines de l'ankyrine et ses interactions protéiques

D'après revue par [Bennett & Chen, 2001].

L'**ankyrine-R** (*ANK1*, 8p11) a été caractérisée dans les érythrocytes [Bennett & Stenbuck, 1979 ; Gallagher *et al.*, 1997], et est exprimée également dans les neurones et le muscle strié. Elle a été impliquée dans la sphérocytose héréditaire, une anémie hémolytique (OMIM 182900, [Lux *et al.*, 1990]).

L'**ankyrine-B** est codée par le gène *ANK2*. Situé sur le chromosome 4 en 4q25-q27, ce gène est inclus dans un segment de 334 kb sur le contig NT_016354, et est constitué de 46 exons. Etant donné sa grande taille, les exons sont répartis sur plusieurs clones génomiques. L'exon 1 est positionné sur le clone AC093879, les exons 2 à 23 sur le clone AC004057, et les exons 24 à 46 sur le clone AC093900. Les deux transcrits de référence, caractérisés dans le cerveau [Otto *et al.*, 1991], font 12 kb (NM_001148, GenBank) et 6 kb (NM_020977). Dans le cœur, l'isoforme majoritaire est la deuxième isoforme, dépourvue de l'exon 38 et qui code pour une protéine de 1 872 acides aminés (NP_066187, 220 kDa).

L'**ankyrine-G** (*ANK3*, 10q21) a été caractérisée dans le système nerveux [Kapfhamer *et al.*, 1995 ; Kordeli *et al.*, 1995]. Elle interagit directement avec le canal sodique cardiaque $Na_v1.5$ et est nécessaire pour son trafic à la membrane [Lowe *et al.*, 2008]. Il faut remarquer qu'une mutation du gène *SCN5A* (E1053K) associée à un syndrome de Brugada bloque l'interaction de la protéine $Na_v1.5$ avec l'ankyrine-G [Mohler *et al.*, 2004c].

2- Implication de l'ankyrine-B dans le SQTL de type 4

En 1995, les cliniciens nantais ont identifié une grande famille (25 patients) originaires de la région et qui présentait un syndrome du QT long atypique par rapport aux trois formes décrites à cette date. En effet il était associé à une dysfonction sinusale se manifestant par une bradycardie marquée chez 90% des patients dès la naissance et une fibrillation auriculaire conséquente chez l'adulte, ainsi qu'une morphologie particulière de l'onde T, sinusoidale (Figure 14). Après exclusion des régions 11p15.5, 7q35-q36 et 3p21-p24 (associées respectivement aux SQTL de type 1, 2, et 3), une analyse de liaison sur l'ensemble du génome a été réalisée. Une liaison a été trouvée avec la région 4q25-q27, le *LOD score* maximum étant de 7,05 pour le marqueur D4S402. La persistance des anomalies de la repolarisation chez les patients, malgré la normalisation du rythme sinusal, montrait que le QT long n'était pas conséquent à la bradycardie sinusale. L'hypothèse la plus probable compte tenu des anomalies de la repolarisation était l'implication d'un canal potassique. Mais dans la zone candidate de 18 cM, aucun gène codant pour un canal ionique n'était décrit [Schott *et al.*, 1995]. Aucune mutation n'a été identifiée dans les gènes candidats positionnels *CAMK2D* ou *TRPC3*.

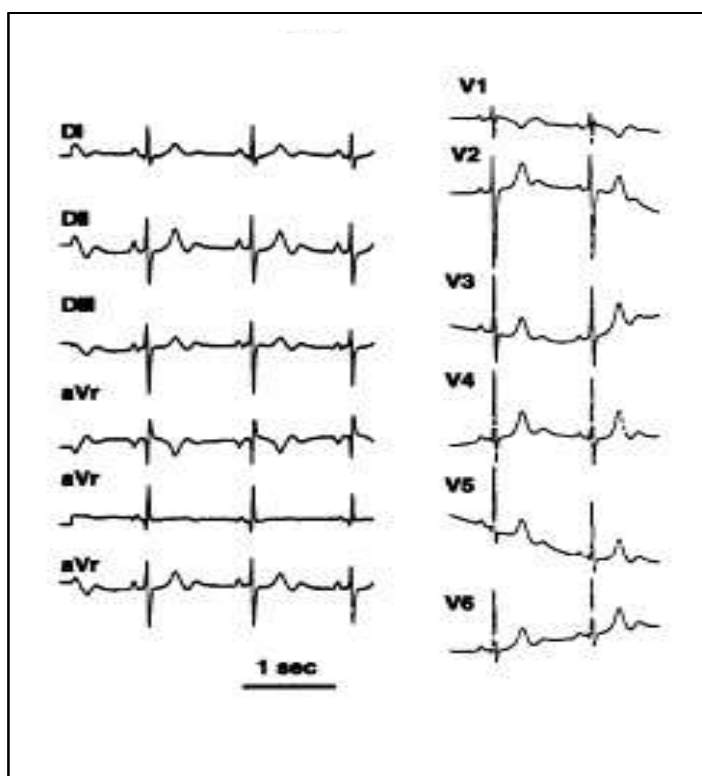


Figure 14 – ECG d'un patient de la première famille SQTL4

La repolarisation est caractérisée par une onde TU sinusoidale bien visible en DII et DIII. D'après [Schott *et al.*, 1995].

Quelques années plus tard, l'étude de la souris *Knock-Out* AnkB^{-/-} [Scotland *et al.*, 1998] a montré le rôle de l'ankyrine-B (*ANK2*) dans l'organisation des canaux à la membrane des cellules excitables, le ciblage des récepteurs impliqués dans le relargage du calcium du réticulum sarcoplasmique dans le cœur, et son implication dans la signalisation calcique [Tuvia *et al.*, 1999]. Une autre étude s'est focalisée sur le courant sodique et ses répercussions sur l'allongement de l'intervalle QT en réponse à une diminution de la fréquence cardiaque [Chauhan *et al.*, 2000]. Le gène *ANK2* situé dans la zone candidate a donc été séquencé et une mutation faux-sens E1425G près du domaine régulateur ségrégeait chez tous les patients de la famille.

Les études fonctionnelles ont été réalisées par Peter Mohler dans le laboratoire du professeur Vann Bennett à la Duke University (Caroline du Nord, Etats-Unis). Ils ont montré dans un modèle de cardiomyocytes néonataux de souris AnkB^{+/-} par complémentation (« *rescue* »), que la transfection d'un ADNc *ANK2* restaurait le phénotype sauf quand l'ADNc contenait la mutation E1425G. En effet les deux copies du gène sont nécessaires pour la signalisation normale du calcium, et la mutation ankyrine-B-E1425G mène à une perte de fonction [Mohler *et al.*, 2003]. La conséquence est une rupture de l'organisation cellulaire de la pompe sodium Na/K ATPase, l'échangeur Na/Ca, et le récepteur à l'InsP(3) par une altération de leur ciblage et dans une moindre mesure de leur quantité.

Plus tard, il a été montré que l'ankyrine-B interagit directement avec le récepteur à l'InsP(3) et que ces protéines forment un complexe macromoléculaire au niveau des T-tubules dans des domaines distincts des diades « récepteur à la dihydropyridine / récepteur à la ryanodine » (Figure 15, [Mohler *et al.*, 2004a ; Mohler *et al.*, 2005]). Le domaine d'interaction du récepteur à l'InsP(3) est situé dans sa partie N-terminale cytoplasmique [Kline *et al.*, 2008]. Ce « complexe ankyrine-B » est réduit dans les cardiomyocytes AnkB^{+/-} [Mohler *et al.*, 2005] ce qui pourrait expliquer l'élévation des transitoires calciques ([Ca²⁺]_i) observée dans les cardiomyocytes adultes de souris [Mohler *et al.*, 2003].

Aucun effet n'a été observé pour d'autres protéines comme la dystrophine, la connexine-43, Na_v1.5 ou K_vLQT1. Dans les cardiomyocytes adultes, l'altération de la signalisation calcique résulte en des extrasystoles et peut expliquer les arythmies observées chez les patients (Figure 16). De plus à l'image des deux patients de la famille ayant succombé à des morts subites par exercice physique et stress au réveil, les souris AnkB^{+/-} meurent dans les conditions de stress et exercice (8 souris sur 14 étudiées, 0 sur 6 pour les souris contrôles) [Mohler *et al.*, 2003].

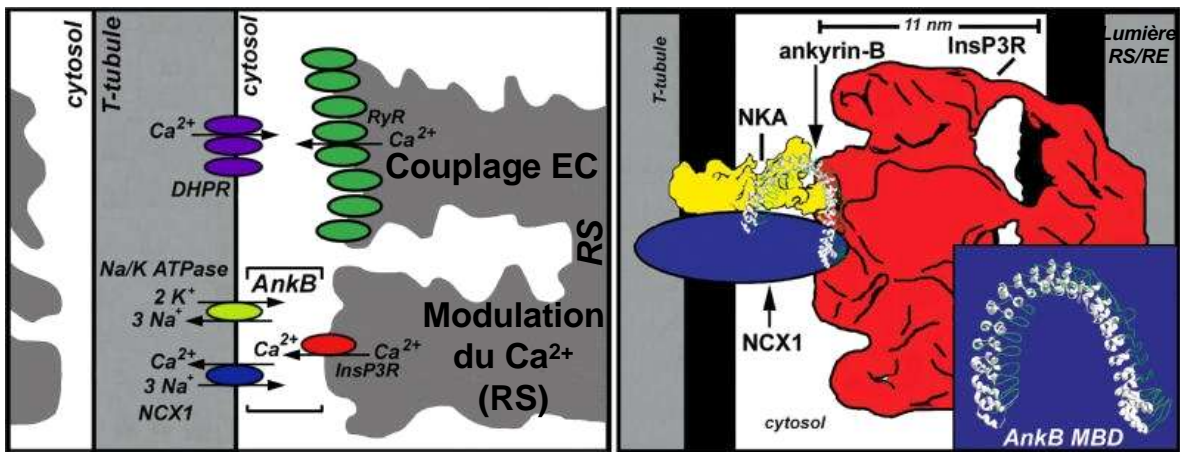


Figure 15 – Le « complexe ankyrine-B » cardiaque

A gauche : Le complexe ankyrine-B-NCX1-Na/K ATPase (NKA)-récepteur à l'InsP(3) est localisé à des sites membrane sarcoplasmique (RS)-T-tubules distincts des diades classiques DHPR ($Ca_v1.2$)-RyR responsables du couplage excitation-contraction (EC).

A droite : Représentation à l'échelle du complexe selon les dimensions approximatives des protéines représentées. RE : Réticulum endoplasmique. Modifié d'après [Mohler et al., 2005].

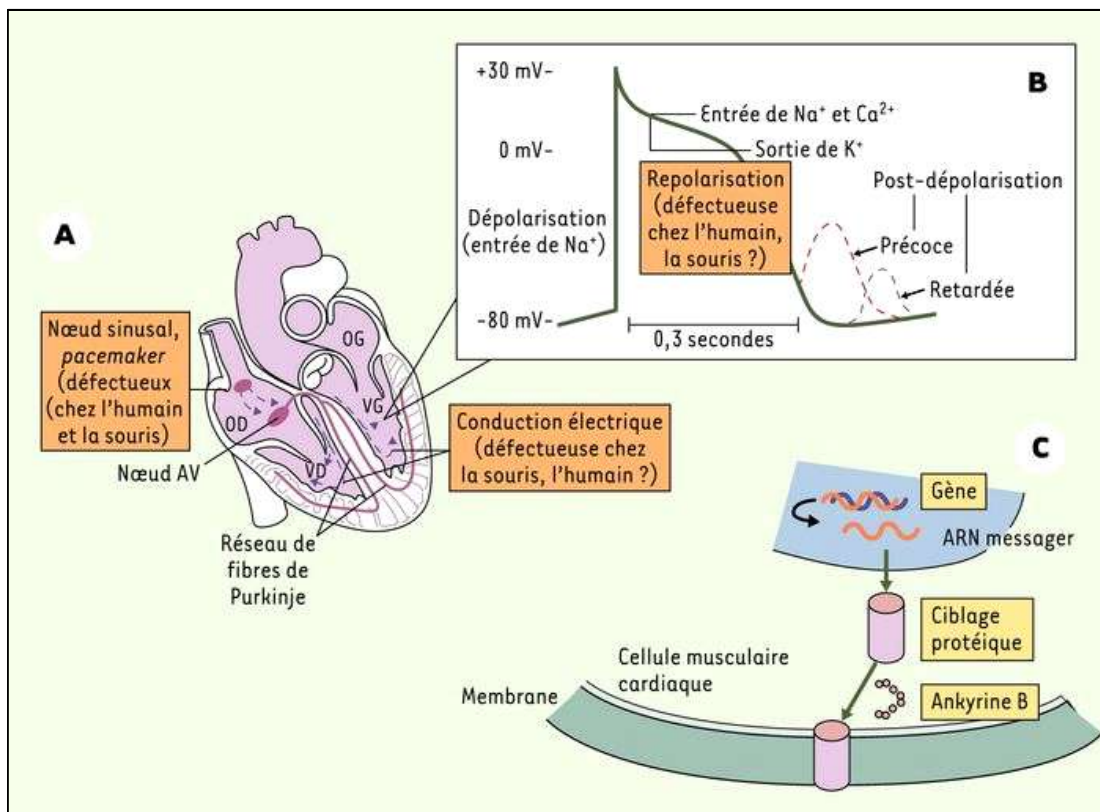


Figure 16 – Hypothèses sur les conséquences potentielles d'un défaut ankyrine-B dans l'activité électrique cardiaque

D'après [Pourrier & Nattel, 2004].

3- Le syndrome ankyrine-B

Après l'identification de la mutation E1425G du gène *ANK2* en 2003 dans le syndrome du QT long de type 4 à partir d'une grande famille française [Mohler *et al.*, 2003], quatre nouvelles mutations « perte de fonction » ont été identifiées un an plus tard par un criblage de 664 patients américains et européens. Ces patients présentaient des troubles du rythme cardiaque divers ou étaient des apparentés d'individus ayant succombé à des morts subites. Les huit patients mutés présentent différents degrés de trouble cardiaque, bradycardie, FV idiopathique, TVC, et risque de mort subite (Figure 17) [Mohler *et al.*, 2004d].

Les mutations, L1622I, T1626N, R1788W, et E1813K, sont toutes localisées dans le domaine C-terminal régulateur, qui confère sa spécificité à l'ankyrine-B dans les cardiomyocytes et qui en fait un « *hot spot* » pour les mutations du gène *ANK2*, à l'image du gène *RYR2* dont les mutations sont localisées dans certains exons [Wang *et al.*, 2007b].

Cette première étude génotype-phénotype a montré que le spectre phénotypique des mutations dans le gène *ANK2* est hétérogène et que les mutations *ANK2* exposent les patients à un risque accru de mort subite en présence ou absence d'un SQTL, ce qui en fait une entité clinique distincte, le « syndrome ankyrine-B » (OMIM 600919). Plusieurs revues ont discuté de l'importance de l'ankyrine-B dans le cœur et les arythmies [revues par Mohler & Bennett, 2005 ; Cunha & Mohler, 2006 ; Mohler, 2006].

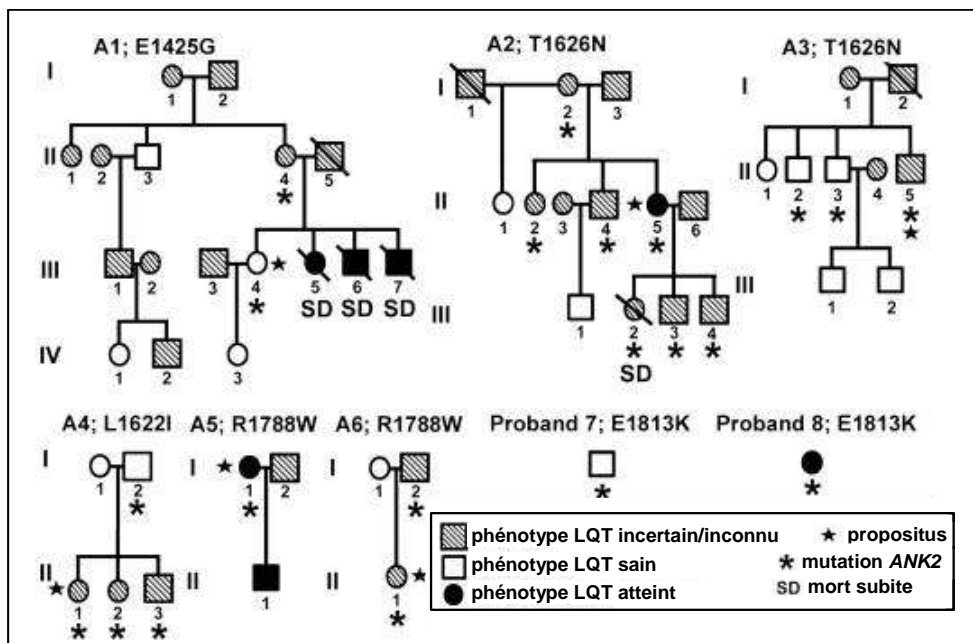


Figure 17 – Pedigree des propositus identifiés avec des mutations *ANK2* par un criblage à grande échelle de 664 patients

Les carrés représentent les hommes, les ronds les femmes. Les symboles barrés indiquent les individus décédés. Les mutations ne sont pas nécessairement associées à un SQTL mais peuvent être trouvées dans un contexte de mort subite familiale. Modifié d'après [Mohler *et al.*, 2004d].

Génétique des troubles du rythme héréditaires : objectifs de la thèse

Même si l'approche génétique a considérablement accéléré les avancées dans la compréhension des arythmies cardiaques et la prise en charge des patients, 30 à 45% des arythmies restent inexpliquées aujourd'hui. Les études actuelles tendent à comprendre les mécanismes moléculaires en cause dans les pathologies communes, cependant la complexité génétique des formes *a priori* monogéniques « mendéliennes » est démontrée [revue par Priori, 2004]. Elle nécessite de poursuivre la recherche de gènes morbides et de gènes modificateurs grâce notamment à la puissante approche familiale. Cette complexité est illustrée par les canalopathies *SCN5A* et le syndrome ankyrine-B qui a ouvert de nouvelles perspectives en montrant l'importance des protéines régulatrices des canaux ioniques dans ces pathologies.

Au cours de mon travail sur les troubles du rythme cardiaque, je me suis intéressée aux différents aspects de la génétique des troubles du rythme, associant l'étude des relations génotype-phénotype, la recherche de nouveaux gènes morbides, et l'identification des bases moléculaires d'un nouveau syndrome dont la composante génétique n'est pas encore démontrée.

Plus particulièrement j'ai travaillé pour l'aspect génotype-phénotype sur le syndrome ankyrine-B. Une première étude a consisté à préciser son rôle dans la dysfonction sinusale grâce à l'identification d'une grande famille liée au locus *ANK2*. Une seconde étude avait pour objectif d'identifier de nouvelles mutations du gène *ANK2* pour élargir le spectre phénotypique des mutations (projet #1). Un deuxième aspect de mon travail a consisté à explorer les gènes candidats pour un nouveau syndrome de fibrillation ventriculaire associée à une repolarisation précoce et caractériser une famille de mort subite qui semble liée à ce syndrome (projet #2). Enfin j'ai recherché de nouveaux gènes morbides pour le syndrome de Brugada (projet #3), les mutations du gène *SCN5A* expliquant seulement ~15-25% des cas.

II- Résultats et discussion

II.1- Projet #1 : Compréhension des relations génotype-phénotype dans le syndrome ankyrine-B

II.1.1- Etude #1a : Caractérisation d'une seconde grande famille liée au locus *ANK2*

II.1.1.1- Article 1 : Etude phénotypique de la famille Ma

Depuis l'identification de la première famille à l'origine de la description du syndrome du QT long de type 4 [Schott *et al.*, 1995] et de la première mutation dans le gène *ANK2* (E1425G) [Mohler *et al.*, 2003], d'autres mutations *ANK2* ont été identifiées dans des petits noyaux familiaux, mais aucune autre grande famille n'a été décrite. La famille Ma est une grande famille de 44 membres identifiée et suivie par le Docteur Vieyres, cardiologue à Angoulême. Le trait phénotypique majeur est une dysfonction sinusale associée à des anomalies de la repolarisation qui ne se traduisent pas nécessairement par un intervalle QT allongé mais la morphologie de l'onde T, sinusoïdale, est similaire à celle observée dans la première famille. Seize patients sont considérés atteints (dysfonction sinusale et/ou anomalie de la repolarisation et/ou fibrillation auriculaire). Les caractéristiques cliniques de la famille d'origine (« **Family 1** ») et de la famille Ma (« **Family 2** ») et des ECG typiques sont présentés dans l'**Article 1, page 71** (arbres généalogiques, **Figure 1** ; ECG, **Figure 2** et **Supplementary Figure 2** ; caractéristiques cliniques des patients, **Supplementary Table 1** et **Supplementary Table 2**).

En plus de la partie clinique et génétique, cet article souligne le rôle de l'ankyrine-B dans le fonctionnement du nœud sinusal, par des expériences de télémétrie chez la souris *AnkB^{+/-}*, de localisation par immunofluorescence dans les myocytes du nœud sinusal, de transcriptomique, de quantification protéique, et d'électrophysiologie. Les résultats montrent qu'une protéine clé du nœud sinusal comme le canal calcique $Ca_v1.3$ nécessite l'ankyrine-B pour être ciblée correctement à la membrane. Comme décrit précédemment dans les cardiomyocytes ventriculaires [Mohler *et al.*, 2003], l'expression membranaire de l'échangeur Na/Ca, du récepteur à l'InsP(3), et de l'ATPase Na/K, est également affectée dans les myocytes du nœud sinusal. Ces expériences au niveau cellulaire, réalisées par l'équipe de Peter Mohler chez la souris, expliquent la dysfonction sinusale observée chez les patients présentant la mutation *AnkB-E1425* et impliquent le gène *ANK2* comme un excellent gène candidat pour la dysfonction sinusale, avec le gène *HCN4*.

II.1.1.2- Article 1 : Etude génétique de la famille Ma

Le *LOD score* théorique maximum de la famille Ma (« family 2 ») a été estimé à 7,5 (pénétrance de 90%). Le génotypage de marqueurs microsatellites au niveau du locus du gène *ANK2* (protocole en annexe F-II.1.2.3, page 196) montre la ségrégation d'un haplotype avec la pathologie ($Z_{\max} = 5,9$ à $\theta=0$ pour le marqueur D4S1616). Les haplotypes sont représentés sur le pedigree de la famille Ma en **Figure 1, Article 1, page 71**.

Le séquençage direct du gène *ANK2* chez le propositus, la patiente II-6, a exclu une mutation dans les séquences codantes décrites dans les bases de données et les sites d'épissage (NCBI, Ensembl). Trois polymorphismes introniques hétérozygotes ont été identifiés lors du séquençage des exons 4 (rs45502093), 10 (rs3025734) et 33 (G/T, base de référence T, 29^e base après l'exon, SNP non répertorié).

D'autre part, six cas de communication inter-auriculaire ont été identifiés dans la famille par échographie, et j'ai donc séquencé le gène *Nkx2.5* impliqué dans cette malformation congénitale [Schott *et al.*, 1998]. Aucune mutation n'a été identifiée.

II.1.1.3- Recherche de la mutation au niveau du locus *ANK2*

Etant donnée la similarité du phénotype de la famille Ma avec la famille décrite à l'origine pour le *SQTL4* et la liaison forte au locus *ANK2*, le résultat négatif du séquençage suggère que la mutation potentielle dans le gène *ANK2* est plus complexe qu'une mutation ponctuelle exonique.

1- Description et séquençage de nouveaux exons du gène *ANK2*

Par RT-PCR à partir de transcrits cardiaques humains, j'ai identifié 5 exons non décrits du gène *ANK2* : 23bis, 26bis, 43bis, 45bis, 45ter (protocole en annexe F-II.3.4, page 206). L'exon 45ter crée un décalage du cadre de lecture qui produit un exon 46 plus long que j'ai nommé 46bis. De plus, j'ai observé un exon 1 alternatif, l'exon « 1bis », situé 145 kb en amont de l'exon 1 décrit dans les bases de données, et qui est précédé d'un exon « -1 » situé 86 kb en amont de l'exon 1bis, sur le clone AC017007 (Figure 18). Les séquences nucléotidiques et les prédictions de séquence protéique de ces nouveaux exons sont disponibles en annexe (Tableau 18, page 211). Ils sont exprimés différemment selon les tissus et sont trouvés dans des transcrits de la base de données du NCBI. Les possibilités de transcrits sont multiples et leur effet fonctionnel reste à être déterminé. Ces travaux vont faire prochainement l'objet d'une publication en collaboration avec l'équipe de Peter Mohler, qui portera sur l'organisation génomique du gène *ANK2* et la description des transcrits cardiaques. Il faut noter que les nouveaux exons décrits sont situés en partie dans le

domaine C-terminal régulateur de l'ankyrine-B qui lui confère sa spécificité et qui est le « hot spot » des mutations. Des variants dans ces nouveaux exons pourraient donc être impliqués dans les pathologies liées à l'ankyrine-B. Cependant dans la famille Ma, aucun variant n'a pu être mis en évidence.

Par ailleurs, j'ai mis en évidence un épissage alternatif élevé dans les transcrits cardiaques puisque certains exons (12, 17, 36 ; les quinze premières bases de l'exon 25) sont présents ou non et les exons 7 et 28 sont absents (Figure 18).

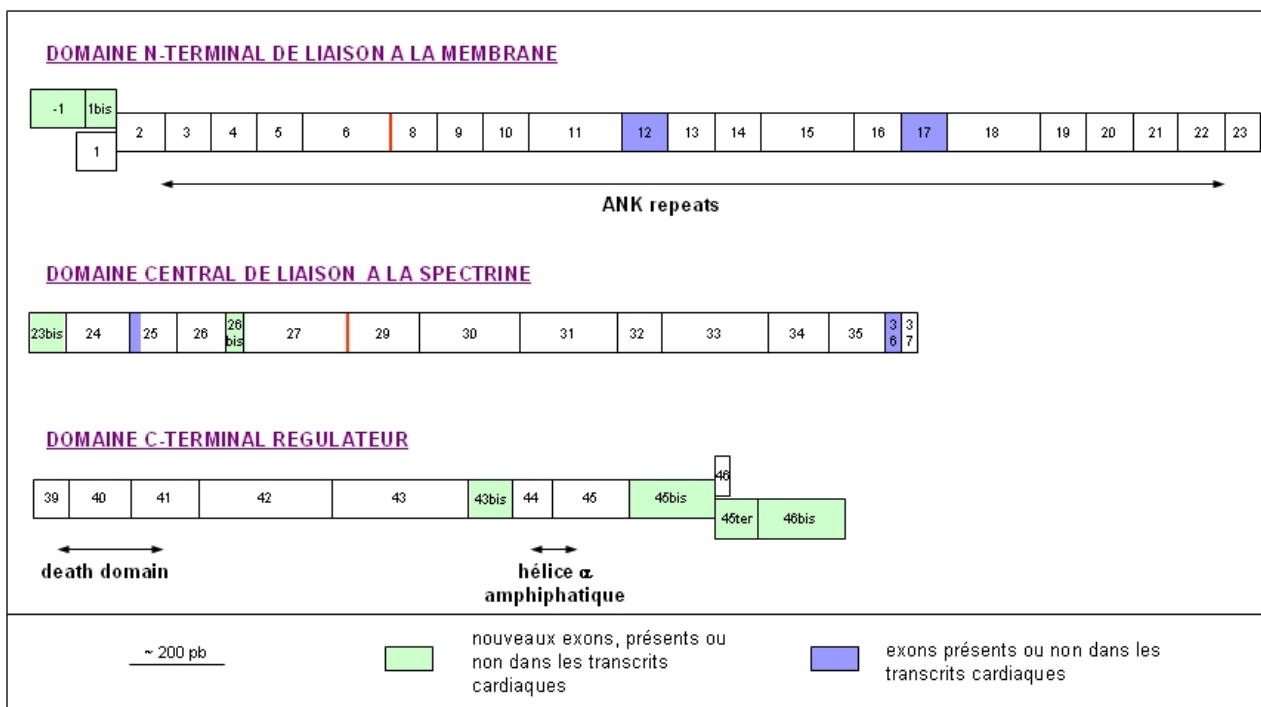


Figure 18 – Représentation schématique des exons des transcrits cardiaques du gène ANK2
Les barres rouges soulignent l'absence des exons 7 et 28 dans le tissu cardiaque.

2- Séquençage d'autres gènes du locus

La liste de l'ensemble des gènes de l'intervalle est présentée en annexe (Tableau 17, page 208). Ainsi les gènes *CAMK2D*, codant pour la protéine kinase calcium/calmoduline-dépendante ayant un rôle dans le couplage excitation-contraction dans le cœur [revue par Maier & Bers, 2007], *PITX2* ayant un rôle dans le développement cardiaque [revue par Franco & Campione, 2003], et *MYOZ2* impliqué dans les cardiomyopathies hypertrophiques [Osio *et al.*, 2007] ont été exclus par séquençage. J'ai également séquençé un cluster de miRNA situé à environ 400 kb en amont du gène *ANK2*. Une délétion de 4 pb dans le *MIRN302C* a été identifiée. Cependant elle est retrouvée à une fréquence de 4,9% sur 184 individus contrôles et ne serait donc pas causale.

II.1.1.4- Nouvel élément en faveur du gène ANK2 et étude des régions non-codantes

Plus récemment, une biopsie de muscle pectoral a été obtenue lors de l'implantation d'un stimulateur cardiaque chez un patient de la famille Ma. L'analyse du taux de protéine ankyrine-B montre une diminution nette de sa quantité (**Supplementary Figure 3, Article 1, page 71**), ce qui conforte l'hypothèse la plus probable d'un défaut au niveau du gène *ANK2*.

Nous avons donc commencé l'exploration de régions non-codantes du gène, et testé l'hypothèse d'un réarrangement, qui pourraient être à l'origine d'une diminution du taux de transcrit et donc de protéine.

1- Séquençage du promoteur proximal et de la région 3'UTR

Les régions en amont des deux premiers exons, l'exon 1 connu et l'exon -1 nouvellement identifié ont été séquencées (2 kb pour l'exon 1, 1 kb pour l'exon -1). La partie 3'UTR a également été exclue par séquençage de la région entière (GenBank NM_020977).

2- Séquençage des régions conservées

Pour identifier les régions conservées (ECR, *Evolutionary Conserved Regions*), l'outil bio-informatique ECR Browser a été utilisé [Ovcharenko *et al.*, 2004 ; Loots & Ovcharenko, 2004 ; Loots & Ovcharenko, 2007] [<http://ecrbrowser.dcode.org/>]. Les séquences des régions conservées qui ont été analysées sont disponibles en annexe (Tableau 19, page 212), et leur position par rapport au gène *ANK2* est représentée en Figure 19.

Plusieurs polymorphismes ont été identifiés et sont répertoriés dans le Tableau 10. En particulier, une délétion d'environ 480 pb a été identifiée au niveau de l'ECR-E chez le propositus. Cette région correspond à une région annotée automatiquement comme le LOC728937, étant une séquence similaire à la protéine S26 de la sous-unité ribosomale 40S. Cette délétion ségrège avec l'haplotype morbide, toutefois elle semble très fréquente puisque de nombreux individus de la famille sont homozygotes.

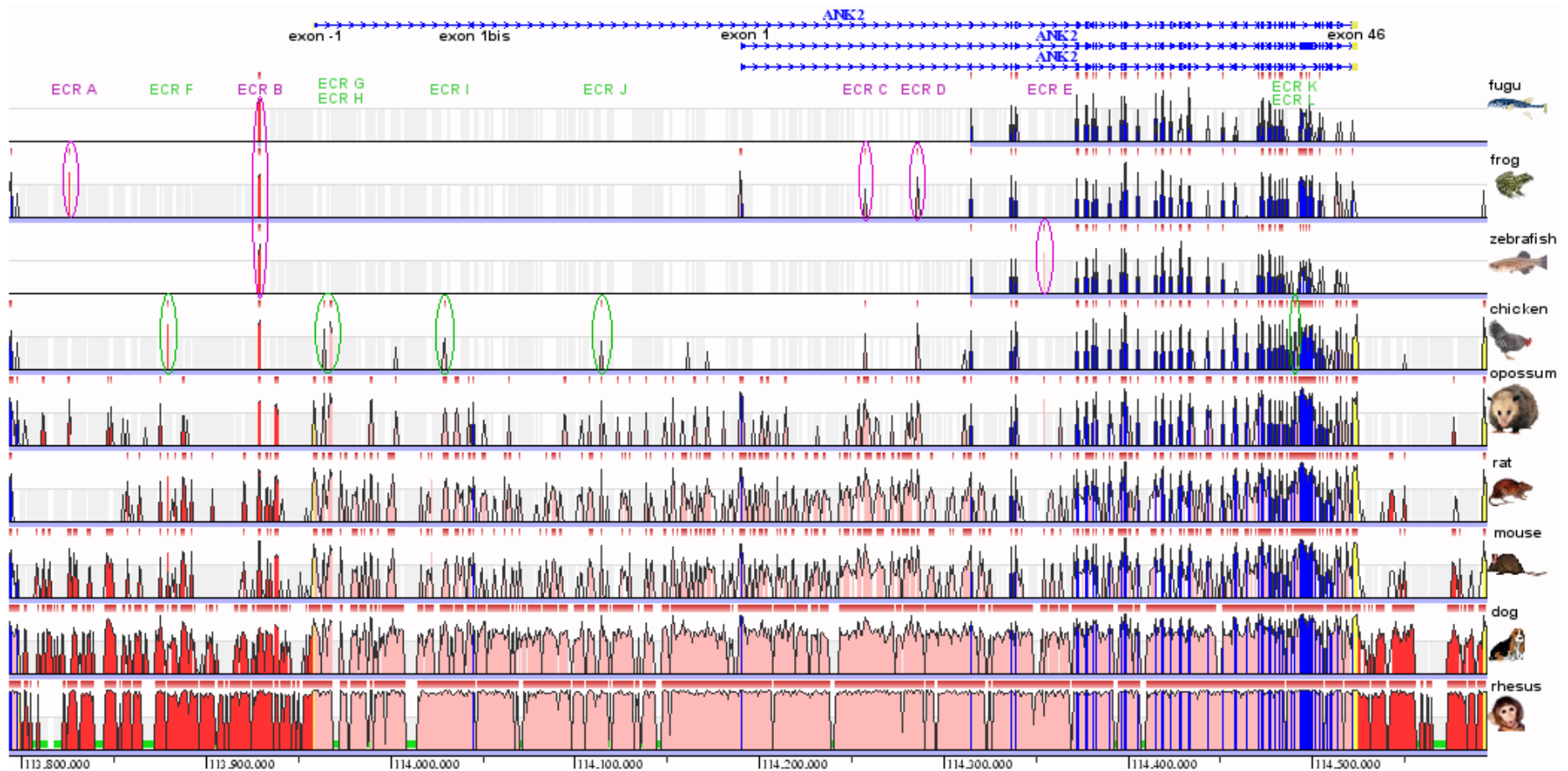


Figure 19 – Représentation des régions conservées (ECR, *Evolutionary Conserved Regions*) du gène *ANK2* entre différentes espèces et l'homme

Les paramètres pour la détection des ECR avec « ECR Browser » ont été fixés à une taille minimale de 100 pb avec un minimum d'identité de 75%. La région du chromosome 4 affichée correspond aux bases 113 793 317–114 594 334. En violet : ECR A-E, identifiées au moins chez le fugu (*Takifugu rubripes*), le xénope (*Xenopus tropicalis*) ou le zebrafish (*Danio rerio*). En vert : ECR F-L, identifiées chez le poulet (*Gallus gallus*). Les séquences des ECR criblées sont disponibles dans le Tableau 19, page 212.

Tableau 10 – Polymorphismes des ECR du gène ANK2 séquencés dans la famille Ma

ECR	Individu sain (mari du propositus)	Individu atteint (propositus)
B	-	A/A (C) rs6820364, C/C (T) rs11098171
C	A/G (A) rs2220208	G/G (A) rs2220208
E	G/T (G)	délétion ~480 pb
G	C/T (T)	-
H	-	A/A (G) rs7681443, G/G (A) rs6844637
J	-	A/G (G) rs2352221

Les numéros d'accèsion des SNP sont indiqués lorsqu'ils sont répertoriés dans la base de données du NCBI. La base entre parenthèses correspond à la base de référence du clone génomique. Les séquences des ECR sont disponibles dans le Tableau 19, page 212.

3- Recherche de réarrangements génomiques par CGH-array

Même si les polymorphismes hétérozygotes identifiés excluent une délétion entière du gène *ANK2*, on peut envisager qu'une délétion ou duplication de quelques exons pourrait expliquer le phénotype et l'incapacité à identifier une mutation par séquençage direct. L'évolution récente des techniques de détection de réarrangements a permis de rechercher chez la patiente IV-6 (**Figure 1, Article 1, page 71**) un événement de délétion ou duplication, à la fois dans le gène *ANK2*, et pour les autres gènes de l'intervalle de liaison. Nous avons choisi la technique de CGH-array et deux types de puces ont été utilisés (Figure 20, Agilent Technologies, principe et protocole en annexe F-II.2.3, page 203, Figure 48) :

- une puce à façon haute résolution : analyse de sondes au niveau du gène *ANK2* (~334 kb), ainsi que 640 kb en amont du gène (environ une sonde toutes les 300 bases),
- une puce pan-génomique : analyse de sondes sur l'ensemble de l'haplotype morbide de la famille Ma en 4q25-27 soit environ 17,5 Mb (environ une sonde toutes les 8,9 kb).

La visualisation des résultats avec le logiciel CGH Analytics semble exclure un réarrangement génomique (Figure 20). D'autres analyses sont en cours pour tenter d'identifier un réarrangement de petite taille à partir des puces à façon, en collaboration avec Nigel Carter et Richard Redon (Equipe de cytogénétique moléculaire, Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, Grande-Bretagne).

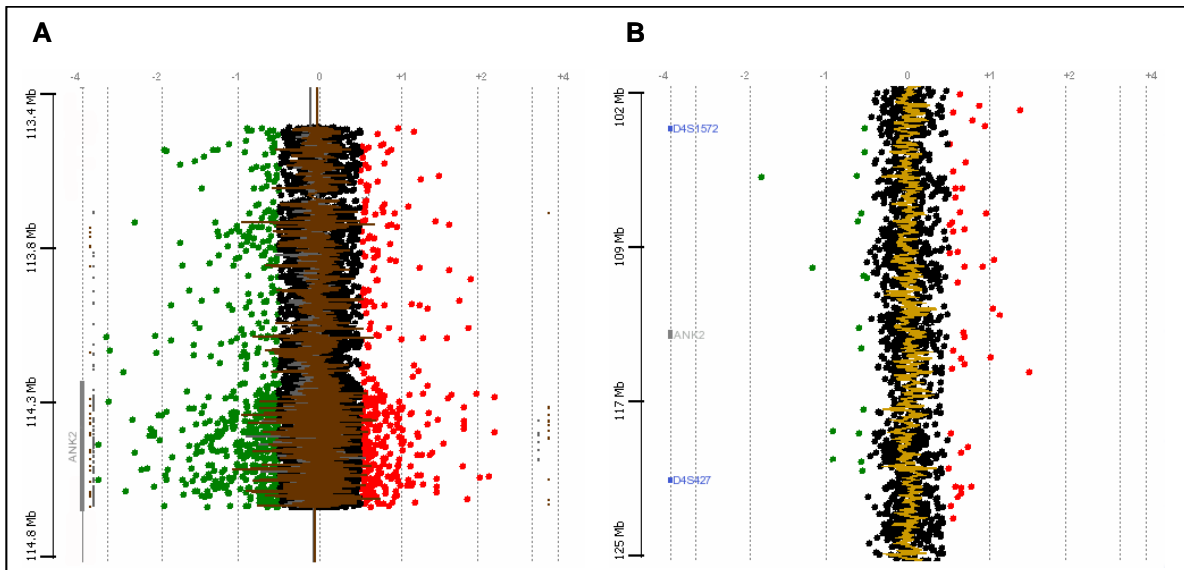


Figure 20 – Recherche de réarrangements génomiques dans le gène ANK2 et le locus 4q25-q27 dans la famille Ma par CGH-array

Le logiciel CGH Analytics 3.4 montre les ratios de fluorescence (\log_2) pour chaque sonde oligonucléotidique (points noirs, verts et rouges). Les sondes sont positionnées selon le Build 36 du NCBI. **A** : Au niveau du gène ANK2 (puce à façon), visualisation de la moyenne des variations en marron et en gris (expérience menée en « dye-swap »). **B** : Au niveau du locus 4q25-q27 (puce pan-génomique), visualisation de la moyenne des variations en jaune. Puces Agilent, principe et protocole en annexe F-II.2.3, page 203, Figure 48.

Article 1

Dysfunction in ankyrin-B-dependent ion channel targeting in human sinus node disease

Solena Le Scouarnec^{*1,2,3}, Naina Bhasin^{*4}, Claude Vieyres⁵, Thomas J. Hund⁴, Shane R. Cunha⁴, Olha Koval⁴, Céline Marionneau^{1,2,3}, Biyi Chen⁴, Yuejin Wu⁴, Sophie Demolombe^{1,2,3}, Long-Sheng Song⁴, Hervé Le Marec^{1,2,3,6}, Vincent Probst^{1,2,3,6}, Mark E. Anderson^{4,7}, Jean-Jacques Schott^{1,2,3,6}, Peter J. Mohler^{4,7}

*Contribution équivalente

Soumis

¹INSERM, U915, Nantes, France

²Université de Nantes, Faculté de Médecine, l'institut du thorax, Nantes, France

³CNRS, ERL3147, Nantes, France

⁴Department of Internal Medicine, Division of Cardiovascular Medicine, University of Iowa Carver College of Medicine, Iowa City, IA 52242, Etats-Unis

⁵Cabinet cardiologique, Angoulême, France

⁶CHU Nantes, l'institut du thorax, Service de cardiologie, Nantes, France

⁷Department of Molecular Physiology and Biophysics, University of Iowa Carver College of Medicine, Iowa City, IA 52242, Etats-Unis

ABSTRACT

The identification of nearly a dozen ion channel genes involved in the genesis of human atrial and ventricular arrhythmias has been critical for the diagnosis and treatment of fatal cardiovascular diseases. In contrast, very little is known about the genetic and molecular mechanisms underlying human sinus node dysfunction (SND). Here, we report a novel genetic and molecular mechanism for human SND. We mapped two families with highly penetrant and severe SND to the human *ANK2* (ankyrin-B) locus. Mice heterozygous for ankyrin-B phenocopy human SND, displaying severe bradycardia and rate variability. Ankyrin-B is essential for normal membrane organization of SAN myocyte channels and transporters and ankyrin-B is required for physiological cardiac pacing. Finally, dysfunction in ankyrin-B-based trafficking pathways causes abnormal SAN electrical activity and SND. Together, our findings define a novel form of human SND based on abnormal channel targeting in SAN, and highlight the critical role for local membrane organization for SAN excitability.

INTRODUCTION

Cardiac pacing is orchestrated by a small group of specialized excitable cells termed the sinoatrial node (SAN). The importance of SAN activity for vertebrate physiology is clearly illustrated by dysfunction in SAN activity in human disease. Sinus node dysfunction (SND) causes “sick sinus syndrome” that includes sinus bradycardia, sinus arrest or exit block, combinations of sinoatrial and atrioventricular nodal defects, and atrial tachyarrhythmias¹⁻³. SND may occur at all ages, but is most prevalent in the elderly (1 in 600 cardiac patients >65 years)⁴. In fact, SND is the reason for over half of permanent pacemakers (>200,000/year in US; >1 million worldwide)⁵ at an annual cost of nearly two billion dollars (US alone)⁶. Moreover, SND is an independent predictor of serious cardiovascular disease and death^{7,8}. While most common in adults with acquired heart disease, following surgical correction for congenital heart disease, or during anti-arrhythmic therapy, SND is also present in patients without identifiable cardiac abnormalities or associated conditions⁹⁻¹¹. These findings and observations from twin studies support the role of genetic factors in SND.

Genetic variants in a number of genes, mostly encoding ion channels, predispose a fraction of the population to atrial and ventricular arrhythmias¹². The identification of these variants has enabled early diagnosis and treatment of potentially fatal disease. In contrast, the genetic and molecular mechanisms underlying human SND are essentially unknown. Moreover, due to the experimental difficulty of working with primary SAN cells (low number, unique molecular, structural, electrical

properties compared with atrial/ventricular myocytes), our understanding of SAN cell biology is limited.

Ankyrins are adapter proteins required for targeting channels and transporters in diverse cells¹³⁻¹⁹. Dysfunction in ankyrin-based pathways has been linked with human disease including hemolytic anemia,¹³ and Brugada syndrome and type 4 long QT ventricular arrhythmias^{16,20}. Mice lacking ankyrin-gene products accurately phenocopy human disease, exhibiting hemolytic anemia and ventricular arrhythmia²¹.

We report a novel genetic and molecular mechanism for human SND based on the ankyrin-B pathway. We mapped two large families with highly penetrant and severe SND to the human *ANK2* locus (encodes ankyrin-B or AnkB), and demonstrate that the identified genetic variant represents a loss-of-function mutation in SAN myocytes. We demonstrate that AnkB is highly expressed in the SAN and AnkB activity is essential for the post-translational organization of SAN myocyte channels and transporters. Mice lacking AnkB expression phenocopy human *ANK2* SND, displaying sinus bradycardia and heart rate variability. Dysfunction in AnkB-based channel/transporter trafficking at the level of the single SAN myocyte leads to loss of normal myocyte calcium handling and automaticity. These results define *ANK2* as the most common known SAN disease gene, define a new class of “channelopathy” based on abnormal ion channel targeting in specialized SAN myocytes, and highlight the critical role for local membrane organization for SAN excitability.

RESULTS

ANK2 gene variants in human sinoatrial node dysfunction

In family 1 (**Fig.1a, Supplementary Table 1**), the index patient (IndIII-21) was identified because of SND and atrial fibrillation (AF). His son (IndIV-34), also affected by SND and AF, died suddenly at age 18 while being awakened. The first episode of sudden death in family 1 occurred in a 12-year-old boy (IndIV-26) after exercise. These events were the starting point for familial screening that allowed identification of 74 members (**Fig.1a**). Among them 25 were affected by SND. In these patients, the rhythm originated from the SAN in 7, the coronary sinus in 7, and junctional escape rhythm was recorded in 11 patients. Thirteen family members were affected by AF (paroxysmal 5; permanent 8; mean onset=40±18 years). SND led to pacemaker implantation in 14 patients (mean age for implantation=34±17 years). A typical ECG trace of SND in a child and an *in utero* echocardiogram of the same patient (IndV-3) are shown in **Fig.2a** and **Supplementary Fig.1**. Twenty-three individuals were also affected by abnormal ventricular repolarization characterized by a prominent sinusoidal TU wave leading to a prolonged QTU interval. Sequencing all available patients (24/26 presenting with SND or prolonged QTU interval, plus 23 unaffected and one undetermined (II-3)) identified 25 mutation carriers (AnkB-E1425G¹⁶) whereas all unaffected family members were non-carriers. The AnkB-E1425G mutation is located in the AnkB spectrin-binding domain and affects ankyrin-binding activity for membrane partners including NCX1, Na/K ATPase, and IP₃R^{16,22}. The heart rate was lower in ANK2 mutation carriers than in non-carriers (56±15 bpm vs 85±24 bpm; $P<0.001$). In 22 carriers, repolarization was characterized by a sinusoidal TU wave (mean QTU for 22 carriers=619±114 ms), consistent with the known role of AnkB mutations in ventricular long QT syndrome¹⁶. Clinical parameters for family 1 are in **Supplementary Table 1**.

In family 2 (**Fig.1b, Supplementary Table 2**), the index patient (IndII-6) was identified because of supra-ventricular and ventricular arrhythmias associated with SND leading to a pacemaker implantation (age 51). Familial screening allowed identification of 44 members (**Fig.1b, Supplementary Table 2**). Thirteen were affected by SND. In these patients, the rhythm was from the SAN in ten and from the coronary sinus in three. Three family members were affected by AF (paroxysmal 2; permanent 1; mean age for onset=48±12 years). SND led to pacemaker

implantation in six patients (mean age for implantation=30±18 years). Examples of abnormal ECG patterns are shown in **Fig.2b** (SND) and **Supplementary Fig.2** (AF). Twelve individuals were also affected by an abnormal sinusoidal repolarization with a prominent U wave and prolongation of the QTU interval, similar to our findings in family 1. Based on the presence of SND, AF, or abnormal repolarization, we classified 16 family members as affected. Echocardiography examination identified 5 cases of atrial septal defect. Given the phenotypic similarities between the two families, we genotyped six microsatellite markers at the ANK2 locus. Among the 36 members of family 2 included in the study, 20 were carriers of a common haplotype at the ANK2 locus whereas 16 were non-carriers (**Fig.1b**). The maximum lod score was obtained for marker D4S1616 and showed evidence for a strong linkage ($Z_{max}=5.9$, $\theta=0$). All patients considered as affected were carriers of the ANK2 disease haplotype. One patient (IndI-2) who was an obligate carrier of this disease haplotype, experienced sudden death while sleeping at age 43. No ECG is available and no autopsy was performed. Only four patients were non-penetrant. The similarities of the phenotype with the original kindred, with a marked SND and a LQT4-like morphology of the T wave, and an overwhelming linkage with ANK2 locus, are strongly in favor of an AnkB defect. While no ANK2 mutation has yet been identified in any ANK2 exons or splicing donor/acceptor site, immunoblot of a muscle biopsy obtained following pacemaker implantation of patient III-1 revealed a striking decrease in AnkB expression compared with samples from two unaffected individuals (**Supplementary Fig.3**). These data suggest that the family 2 ANK2 variant resides in promoter/enhancer sequence in uncharacterized 300 kb of ANK2 gene sequence upstream of ANK2 exon 1, and significantly reduces AnkB expression, similar to AnkB^{+/-} mice. Among the carriers of the ANK2 disease haplotype, the heart rate was lower than in non-carriers (57±14 bpm vs 77±15 bpm; $P<0.001$). In 12 carriers, ventricular repolarization was characterized by a sinusoidal TU wave (mean QTU for these 12 carriers:552±54 ms). Finally, heart rates were similar (56±15 bpm vs 57±14 bpm) between the carriers of families 1 and 2. Clinical parameters of family 2 are in **Supplementary Table 2**. Taken together, these data demonstrate that mutant human ANK2 alleles associated with reduced AnkB expression or AnkB loss-of-function are strongly associated with severe human SND.

AnkB is required for sinus node function

ECG lead II radiotelemetry was used to assess SAN function in conscious unrestrained mice heterozygous for AnkB (AnkB^{+/-} mice). AnkB^{+/-} mice backcrossed 18 generations displayed pronounced bradycardia compared with WT littermates at all ages (Fig.3a; 1,3,6,9 months), consistent with observations in human *ANK2* gene variant carriers. In addition to bradycardia, we observed striking variability in resting heart rate of AnkB^{+/-} mice compared with WT littermates (Fig.3a). Therefore, loss of an *ANK2* allele causes SND in mice, consistent with data from humans heterozygous for a mutant AnkB allele (Fig.1-2).

AnkB is enriched in sinoatrial node

Immunoblots of isolated human SAN lysates revealed expression of AnkB (Fig.3b). SAN proteins HCN4, Ca_v1.3, Ca_v3.1, NCX1, and connexins45 and 40 were observed in parallel SAN immunoblots (Fig.3b). Moreover, connexin43 expression was not observed in human SAN immunoblots (found in atria, but not SAN), demonstrating accurate dissection of SAN region from surrounding right atria. We observed AnkB expression in adult mouse SAN (Fig.3c). AnkB^{+/-} mice displayed significant reduction in SAN AnkB expression (Fig.3c; >50% reduction, n=3; p<0.01). Confocal imaging revealed that AnkB is expressed in the SAN as denoted by SAN marker proteins HCN4 and neurofilament (Fig.3d). Parallel immunostaining experiments of AnkB^{+/-} mice revealed significant reduction of SAN AnkB (Fig.3e). No changes in expression of HCN4 or neurofilament were observed in AnkB^{+/-} SAN (Fig.3d-e). Moreover, no gross abnormalities in SAN morphology were detected in AnkB^{+/-} mice.

AnkB is localized on the cell membrane of isolated SAN myocytes (Fig.3f). We also observed AnkB expression in a striated pattern corresponding to the SAN myocyte M-line (SAN myocytes do not have T-tubules²³). AnkB expression is reduced and heterogeneous in AnkB^{+/-} SAN myocytes (Fig.3g), compared to WT controls. Therefore, AnkB is enriched in SAN, is present at the SAN membrane surface, and is reduced in AnkB^{+/-} SAN myocytes.

AnkB is required for targeting SAN ion channels and transporters

Reduction/dysfunction of ankyrin activity in neurons, erythrocytes, epithelial cells, and ventricular myocytes affects expression and localization of ion channels and transporters²⁴⁻²⁸. Immunoblots of WT and AnkB^{+/-} SAN cells (Fig.4a) revealed reduced expression of Na/Ca exchanger

(NCX1) and Na/K ATPase (NKA, both reduced >40%, p<0.05, n=3, each n=3-5 mice/genotype). Additionally, IP₃ receptor (IP₃R) expression was reduced ~40% in AnkB^{+/-} SAN preps (Fig.4a). In contrast, Ca_v1.2, Ca_v1.3, RyR₂, HCN4, Ca_v3.1, Cx45, NHERF1, and NKAβ₁₋₂ expression levels were unchanged in AnkB^{+/-} SAN (Fig.4a). Connexin43 expression was not observed in SAN cell lysates (Fig.4a).

Loss of NCX1, NKA, and IP₃R expression in AnkB^{+/-} SAN myocytes is paralleled by abnormal localization of NCX1 (Fig.4b,c), NKA (Fig.4h,i), and IP₃R (Fig.4j,k) in isolated AnkB^{+/-} SAN. Unexpectedly, we also observed striking differences in cellular distribution of Ca_v1.3 in AnkB^{+/-} SAN. Ca_v1.3 expression in AnkB^{+/-} SAN myocytes was limited to an internal perinuclear distribution, in contrast to the homogenous membrane distribution in WT cells (Fig.4n-q). We observed no difference in the localization of other SAN membrane proteins including RyR₂ (Fig.4f,g), Ca_v1.2 (Fig.4l,m), Ca_v3.1 (Fig.4r,s), HCN4 (Fig.4t,u), and connexin40 (Fig.4d,e). Abnormal expression/targeting of Ca_v1.3, NCX1, IP₃R, and NKA in AnkB^{+/-} SAN myocytes is likely the result of a post-translational event, as no significant difference in the mRNA levels of these transcripts or other key cardiomyocyte transcripts was identified by TaqMan Low Density Arrays (Supplementary Tables 3-4). Together, these data support a role for AnkB in the post-translational targeting and protein stability of Ca_v1.3, NCX1, IP₃R, and NKA membrane proteins in SAN. In support of this role, ankyrins have previously been demonstrated to be essential for the post-translational stability of membrane proteins in other cell types^{29,30}.

Human *ANK2* SND variant E1425G is a loss-of-function mutation in SAN

Abnormal SAN ion channel/transporter phenotypes are due to monogenic loss of AnkB as exogenous viral expression of AnkB into AnkB^{+/-} SAN myocytes normalized the distribution of AnkB-associated proteins (NCX1 in Supplementary Fig.4a-c). Moreover, replacement with AnkB harboring the human E1425G mutation was unable to rescue abnormal NCX1 targeting in AnkB^{+/-} SAN, even though the mutant AnkB (E1425G) was properly expressed and localized in AnkB^{+/-} SAN cells (Supplementary Fig.4d). These data indicate that the full complement of AnkB is necessary for the membrane expression of Ca_v1.3, NCX1, NKA, and IP₃R in SAN myocytes, and that the E1425G mutation, causing clinical SAN dysfunction in family 1 patients, abolishes this activity.

AnkB is required for I_{NCX} and $I_{Ca,L}$

Based on the loss of membrane localization of NCX1 and $Ca_v1.3$ we observed in $AnkB^{+/-}$ SAN cells, we predicted that NCX1 (I_{NCX}) and $Ca_v1.3$ ($I_{Ca,L}$) currents would be diminished compared to WT SAN cells. I_{NCX} was significantly reduced in $AnkB^{+/-}$ SAN myocytes (**Fig.5a**, reduced ~50% at nearly all positive voltages, $n=10$; $p<0.05$), consistent with reduced expression and abnormal localization of NCX1 in $AnkB^{+/-}$ SAN (**Fig.4**). Total Ca^{2+} current (I_{Ca}) density was reduced ~50% in $AnkB^{+/-}$ SAN myocytes at nearly all voltages (**Fig.5b**; $n=8$, $p<0.05$), similar to I_{NCX} . In SAN I_{Ca} is comprised of T-type, low voltage-activated ($I_{Ca,T}$) and L-type, high voltage-activated ($I_{Ca,L}$) currents³¹. In contrast to total I_{Ca} , we observed no significant difference in $I_{Ca,T}$ density ($Ca_v3.1,3.2$) between WT and $AnkB^{+/-}$ SAN (**Fig.5c**). In contrast, $I_{Ca,L}$ in $AnkB^{+/-}$ SAN was significantly reduced (>60% reduced, $n=10$; $p<0.05$) compared with WT SAN myocytes (**Fig.5d**). Finally, I_f current was similar in WT and $AnkB^{+/-}$ cells (**Fig.5e**, $n=8$). Therefore, our functional data strongly support a role for AnkB in the targeting and activity of specific SAN channels and transporters.

AnkB is required for SAN calcium homeostasis

Cytosolic calcium handling is critical for normal SAN function and cellular Ca^{2+} entry by $I_{Ca,L}$ is necessary for generation of normal cardiac pacemaker activity in the SAN³². Inactivation of $Ca_v1.3$ in mice leads to significant reduction in SAN $I_{Ca,L}$ (reduced ~70%), reduced SAN rate, and spontaneous SAN arrhythmias³³. Recent findings also demonstrate the importance of NCX1 activity for SAN function^{34,35}. Knockout of NCX1 in mice is lethal at 11 days post-coitum, at least in part due to lack of a beating heart³⁶⁻³⁸. Therefore, abnormal NCX1 and $Ca_v1.3$ expression and function in $AnkB^{+/-}$ SAN cells (**Fig.4**, **Fig.5a,d**) are likely to contribute to the mechanism of SND in $AnkB^{+/-}$ mice and in patients. Since NCX is a major pathway for cellular Ca^{2+} removal, we predicted that loss of NCX1 should lead to loss of normal SAN Ca^{2+} homeostasis in $AnkB^{+/-}$ mice.

We examined potential defects calcium handling in $AnkB^{+/-}$ SAN myocytes using confocal imaging of spontaneous calcium transients. Recordings were obtained

from freshly dissected SAN tissue explants and isolated cells. Isolated WT SAN myocytes exhibited synchronous calcium transients (**Fig.6a**). Single $AnkB^{+/-}$ SAN myocytes and $AnkB$ SAN explants displayed pronounced reduction in rate compared with WT cells (**Fig.6a**; $+/-4.4\pm0.3$ Hz; $AnkB^{+/-}$: 2.6 ± 0.8 Hz ($n=10$ /genotype from five animals/genotype, $p<0.05$). Moreover, $AnkB^{+/-}$ SAN myocytes displayed striking heterogeneity in rate (**Fig.6a,b**), in agreement with human and mouse data. Fourier transform of rate data revealed a single rate frequency for WT SAN cells (4.3 Hz; **Fig.6b**). In contrast, $AnkB^{+/-}$ cells displayed enhanced rate variability, seen as multiple prominent frequencies, both lower than WT rates (~2.2 Hz/~2.9 Hz). Finally, $AnkB^{+/-}$ SAN myocytes reduced frequency of calcium release remained delayed and irregular even in the presence of β -adrenergic stimulation (**Fig.6c-d**, $n=8$, $p<0.05$). Isoproterenol application to $AnkB^{+/-}$ SAN myocytes increased SAN rate, but not to levels observed in isoproterenol-treated WT cells (**Fig.6c,d**). In fact, $AnkB^{+/-}$ SAN myocytes treated with isoproterenol displayed increased rate variability following treatment (**Fig.6c,d**). Therefore, a full-complement of AnkB is required for SAN calcium homeostasis. Moreover, abnormal NCX1 and $Ca_v1.3$ membrane expression likely underlie abnormal calcium handling phenotypes.

AnkB is required for SAN electrical activity

Observed dysfunction in I_{NCX} and $I_{Ca,L}$ (**Fig.5**), as well as likely aberrant Na/K ATPase and IP_3R membrane function (**Fig.4**) predict that $AnkB^{+/-}$ SAN cells display abnormal electrical activity. We measured action potentials in single isolated WT and $AnkB^{+/-}$ SAN cells using the perforated patch technique to preserve SAN cell homeostasis and signaling pathways. Spontaneous cell membrane potential oscillations (afterpolarizations) were observed in a significant percentage of single $AnkB^{+/-}$ SAN myocytes (~18% of $AnkB^{+/-}$ cells, **Supplementary Fig.5**). Spontaneous afterdepolarizations were only rarely observed in WT myocytes (3% myocytes). Together, our data demonstrate the requirement of AnkB for SAN electrical activity.

DISCUSSION

The genetics of human SND are poorly defined. Loss-of-function variants in the human *ANK2* are the cause of the congenital type 4 long QT syndrome^{16,39,40}. Variant carriers display resting ECG abnormalities and risk of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, syncope, and sudden cardiac death^{16,39,40}. Our new findings link *ANK2* to a second cardiovascular disease, human SND. SND is nearly completely penetrant in individuals with *ANK2* linkage and is observed for all ages, including *in utero*. AnkB is the only non-ion channel protein implicated in human SND and the first example of SND disease based on dysfunction in intracellular calcium regulation. Therefore, our new results define a new SAN disease based on abnormal ion channel and transporter targeting, and highlight the critical role for local membrane organization for SAN excitability.

The small number of genes linked with human SND may reflect the absolute requirement of SAN function for vertebrate survival. This requirement has likely resulted in the evolution of redundant molecular pathways to regulate SAN excitability (i.e. HCN4, NCX1, Ca_v1.2/Ca_v1.3, RyR₂/RyR₃). The unique severity and penetrance of human *ANK2* SND likely reflects the essential role of AnkB for orchestrating the membrane function of *multiple* SAN ion channel and transporters within a single functional pathway. Thus, the “single hit” mutation in *ANK2* orchestrates a “multi-hit” loss of NCX1, Na/K ATPase, Ca_v1.3, and IP₃R.

Aberrant SAN electrical activity and altered Ca²⁺ transients observed in AnkB^{+/-} SAN cells can likely be attributed to aberrant membrane expression of Ca_v1.3 and NCX1 (Fig.4) and corresponding reduction of both I_{NCX} and

I_{Ca,L}^{33-35,37,38} (Fig.5). Moreover, NCX1 activity is likely additionally further inhibited in AnkB^{+/-} SAN node cells by increased cytosolic [Na⁺] resulting from reduction of NKA. Definitive roles for SAN IP₃Rs have not been well established. However, periodic IP₃R activity underlies initiation of pacemaking and differentiation of embryonic cardiomyocytes^{41,42}. Therefore, the combined molecular dysfunction of the AnkB-based targeting pathway likely creates a complex electrical phenotype due to improper membrane targeting of multiple proteins.

ANK2 dysfunction may play a role in the genesis of SND and sudden death in the general human population. Recent findings linked a major locus for resting heart rate in the general population to human chromosome 4q⁴³. The locus site was mapped near *D4S2394* ([LOD] score=3.9)⁴³, a site that overlaps the location of *ANK2*. It is noteworthy that a heart rate locus in rat has been mapped to a homologous gene region that contains the rat *Ank2* gene (chromosome 2, D2Rat62-247, LOD=2.9)^{44,45}. Our new findings suggest that both loci represent heart rate inconsistency due to variability in *ANK2*.

In summary, our findings define a new genetic basis for human SND and reinforce the importance of ankyrin-based targeting pathways for regulating the physiology of excitable cells. As SND is an independent risk factor for mortality⁷, these new findings identify an unexpected cardiovascular disease susceptibility gene in *ANK2*. Moreover, these findings suggest the exciting potential of ankyrin-pathways as targets for future therapies for diseases of excitable cells.

METHODS

Clinical investigation. The study was conducted according to the French guidelines for genetic research and was approved by the ethical committee of Nantes University Hospital. Informed written consent was obtained from each family member who agreed to participate in the study and blood samples were collected for genetic analysis. Clinical investigation included a review of medical history, a physical examination, a 12-lead electrocardiogram (ECG), and an echocardiography. Diagnosis was established independently by two clinicians and heart rate, QT, QTU durations were measured at rest

on the first recorded ECG when available. QTc were calculated using Bazett's formula. QTU was measured at the end of the U wave in patients presenting a sinusoidal aspect of the repolarization. Sinus node dysfunction was defined by 1) a heart rate under 50 bpm at rest in adults or a lower than expected heart rate for the age in children or 2) by an abnormal rhythm (junctional escape or coronary sinus rhythm). The clinical status of the family members was defined as affected if they were affected by either sinus node dysfunction or atrial fibrillation or an abnormal ventricular repolarization with a prominent U wave.

Genetic analysis. Family 1 genetic analysis has been previously published¹⁶. For family 2, DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes with standard methods. All family members included in the study were genotyped and sequenced using a 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Mutation analysis was conducted by direct sequencing of the AnkB gene. All 46 exons of the AnkB gene were amplified using intronic primers¹⁶. We carried out two-point linkage analysis with the SUPERLINK program in the easyLINKAGE software package. For linkage calculations, we assumed dominant inheritance with a disease-allele frequency of 0.01% and penetrance was set at 90%.

Mouse ECG recordings. ECG recordings of ambulatory animals were obtained using radiotelemetry (DSI) with transmitters implanted in the peritoneum five days before recordings. Continuous 24-h recordings were collected for each mouse. Heart rates of ambulatory animals were determined by averaging resting heart rates (n=6 for each mouse) over 2-h of WT and AnkB^{+/-} conscious mice taken at a similar time each day. Heart rates for eight mice from each genotype were monitored for each age (1 month, 3 month, 6 month, 9 month).

Lentiviral expression. 220 kD AnkB-GFP was subcloned by PCR into the lentiviral shuttle vector pCDH1-MCS1/2 (System Biosciences, Mountain View, CA) using the restriction sites NheI and Swal. PCR-based site-directed mutagenesis was performed to change residue 1425 from glutamic acid to glycine. Two 10 cm plates of HEK293TN cells were transfected with pPACKH1 lentivector packaging kit (System Bioscience) and 10 µg of WT or E1425G AnkB-GFP overnight using Effectene (Qiagen). The cells were maintained in a minimal volume of DMEM/2% FCS for another 48 hours. The media was drawn off and concentrated by centrifugation using Centriplus columns (Millipore) for 3 hours at 4°C. Relative transduction efficiencies were evaluated by GFP expression in HEK293 cells following a 24 hour period of infection.

Antibodies. Primary antibodies used for experiments included affinity-purified AnkB (monoclonal and polyclonal), ankyrin-G (polyclonal) and GFP (polyclonal) Ig. Rabbit anti-Ca_v1.2, rabbit anti-Ca_v1.3, rabbit anti-Ca_v3.1, and rabbit anti-HCN4 were purchased from Alomone Labs. Rabbit anti-IP₃R, mouse anti-NKA α1, mouse anti-NKA β1 and mouse anti-RyR₂ were purchased

from Affinity BioReagents. Rabbit anti-NCX1 was purchased from Swant, mouse anti-NCX1 was purchased from Fitzgerald Industries, mouse anti-neurofilament was purchased from the Developmental Studies Hybridoma Bank, and rabbit anti-NKA α2/3 was purchased from Millipore. Gap junction protein antibodies included rabbit anti-connexin 40 (Chemicon), rabbit anti-connexin 43 (Zymed), mouse anti-connexin 43 (Chemicon), and rabbit anti-connexin 45 (Zymed). Secondary antibodies included goat anti-rabbit and goat anti-mouse Alexa Fluor 488 and 568 (Molecular Probes).

Immunoblots. Equal quantities of protein lysate obtained from AnkB^{+/-} and WT heart tissues (pooled from multiple mouse hearts/genotype) or human heart tissues were analyzed by SDS-PAGE (3-8% Tris-acetate gels) and immunoblotted following protocols as previously described¹⁶. Parallel immunoblots were performed using an unrelated protein antibody (NHERF1, Sigma) to demonstrate equal protein loading. Blots were developed using HRP-conjugated donkey anti-rabbit and donkey anti-mouse secondary antibodies (Jackson ImmunoReagents) and ECL (Pierce).

Immunofluorescence. Freshly isolated or cultured sinoatrial cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and fixed in 2% paraformaldehyde. Cells were blocked/permeabilized in PBS containing 0.075% Triton X-100, 2 mg/ml BSA and 3% fish gelatin, and incubated in primary antibody overnight at 4°C. Following PBS washes, cells were incubated in secondary antibody (Alexa 488, 568; 633; Molecular Probes) for 2 hours at room temperature and mounted using Vectashield (Vector) and #1 coverslips. Images were collected on Zeiss 510 Meta confocal microscope (10x power, 0.3 NA; 20x power 0.8 NA, 40x power oil, 1.3 NA; and 63 power oil 1.40 NA (Zeiss), pinhole equals 1.0 Airy Disc) using Carl Zeiss Imaging software. Images were imported into Adobe Photoshop for cropping and linear contrast adjustment.

RNA preparation. Under general anesthesia with etomidate (30 mg/kg ip), mice were sacrificed by cervical dislocation and the beating hearts were quickly excised. A thin strip of sinoatrial node (SAN) tissue (~ 1 x 0.8 mm), limited by the crista terminalis, the atrial septum, and the orifices of the venae cavae, was cut from the right atrium as previously described⁴⁶, and flash frozen in liquid nitrogen for further RNA isolation. Total RNA from pools of two SANs were isolated and DNase treated using the RNeasy

Fibrous Tissue Micro Kit (Qiagen) following manufacturer's instructions. The quality of total RNA was assessed by polyacrylamide gel micro-electrophoresis (Agilent 2100 Bioanalyzer). Genomic DNA contamination was assessed by PCR amplification of total RNA samples without prior cDNA synthesis; no genomic DNA was detected.

II.1.1.1- **TaqMan quantitative RT-PCR.** TaqMan Low Density Arrays (TLDA, Applied Biosystems) were completed in a two-step RT-PCR process as described previously⁴⁶. Briefly, first strand cDNA was synthesized from 200 ng of total RNA using the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). PCR reactions were carried out in TLDA using the ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). The 384 wells of each array were pre-loaded with 96 x 4 pre-designed FAM-labeled fluorogenic TaqMan probes and primers. The probes were labeled with the fluorescent reporter dye 6-carboxyfluorescein (FAM[®], Applera Corporation) on the 5' end and with a non-fluorescent quencher on the 3'

end. The genes selected for analysis were ones encoding 67 ion channel pore-forming (α) and accessory (β) subunit proteins as well as proteins involved in ion channel regulation, nine proteins involved in calcium homeostasis, four transcription factors, specific markers of cardiac areas, vessels, neuronal tissue, fibroblasts, inflammation and hypertrophy, and four endogenous control genes used for normalization. The genes assayed are listed in **Supplementary Table 3**. Two ng of cDNA from each sample was combined with 1X TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems) and loaded into each well. The TLDA were thermal-cycled at 50°C for 2 minutes and 94.5°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 97°C for 30 seconds and 59.7°C for 1 minute. Data were collected with instrument spectral compensations using the Applied Biosystems SDS

2.2.1 software and analyzed using the comparative threshold cycle (C_T) relative quantification method. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene was used as an endogenous control to normalize the data. Genes with C_T values >30 were eliminated for lack of detection or reproducibility. Results in WT and transgenic animals are expressed as relative mRNA expression level as compared with GAPDH. Values are means \pm S.E.M. from 2 pools of 2 SANs in each group. Statistical analysis was performed using the Student's *t* test.

SAN preparation and electrophysiological recordings. SAN pacemaker cells were isolated from age- and sex- matched WT or AnkB^{+/-} C57BL/6 adult mice donors of either sex as described⁴⁷. Briefly, beating hearts were removed following IP injection of 2.5% Avertin solution. The SAN region (bordered by crista terminalis, interatrial septum, superior and inferior vena cava) was excised in pre-warmed (35°C) Tyrode solution (containing in mM: NaCl, 140; HEPES, 5; Glucose, 5.5; KCl, 5.4; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 1). SAN tissue strips were then transferred to pre-warmed calcium-free Tyrode solution and cut into approximately 10 small pieces. These SAN pieces were transferred to pre-warmed digestion solution (containing in mM: NaCl, 140; HEPES, 5; Glucose, 5.5; KCl, 5.4; CaCl₂, 0.2; MgCl₂, 0.5; KH₂PO₄, 1.2; Taurine, 50; BSA, 1 mg/ml;

Collagenase, 229 U/ml; Elastase, 1.9 U/ml; Protease, 0.9 U/ml) and incubated for approx. 35 minutes in a 35 °C water bath with manual agitation every 5 minutes. The digestion solution was replaced with pre-warmed KB solution (containing in mM: Glutamic acid K, 100; HEPES, 5; Glucose, 20; KCl, 25; K aspartate, 10; MgSO₄, 2; KH₂PO₄, 10; Taurine, 20; Creatine, 5; EGTA, 0.5; BSA, 1 mg/ml) and gently triturated using a pipette with an inner diameter of 3 mm. The SAN myocytes were readapted to normal, extracellular Ca²⁺ concentration by the addition of a solution containing NaCl (10 mM) and CaCl₂ (1.8 mM) followed by Tyrode's solution with BSA (1 mg/ml). The SAN myocytes were then kept in storage solution (containing in mM: NaCl, 100; Glutamic acid K, 14; KCl, 35; CaCl₂, 1.3; MgCl₂, 0.7; KH₂PO₄, 2; Taurine, 2; BSA, 1 mg/ml) until used for electrophysiology experiments. For I_{NCX} recording, we utilized a standard protocol⁴⁸. Whole-cell recordings were obtained at RT with the use of standard patch-clamp techniques. Membrane current was assessed by use of an Axopatch-200B amplifier and a CV-203BU head stage (Axon Instruments). Experimental monitoring, data acquisition, and data analysis were accomplished with the use of the software package PClamp 8.0 with the Digidata 1320A acquisition system (Axon Instruments). Patch pipettes were pulled from thin-walled glass capillary tubes and heat polished. The electrode resistance ranged from 2 to 4 M Ω . The external solution contained the following (in mmol/L): NaCl 145, MgCl₂ 1, HEPES 5, CaCl₂ 2, CsCl 5, and glucose 10 (pH 7.4, adjusted with NaOH). The internal solution contained the following (in mmol/L): CsCl 65, NaCl 20, Na₂ATP 5, CaCl₂ 6, MgCl₂ 4, HEPES 10, and tetraethyl ammonium chloride 20, EGTA 21 (pH 7.2, adjusted with CsOH). Membrane currents were elicited with the use of standard voltage ramp protocol. From a holding potential of -40 mV, a 100-ms step depolarization to +50 mV was followed by a descending voltage ramp (from +50 mV to -100 mV at 100 mV/s). The protocol was applied every 12 seconds. I_{NCX} was measured as the Ni-sensitive current. Ni²⁺ (5 mmol/L) was added to define the fraction of current that derives from NCX (the difference between total current and post-Ni²⁺ current). Membrane capacitance was read directly from the membrane test of PClamp 8.0 before compensating for series resistance and membrane capacitance. For calcium current recordings, electrophysiological recordings were acquired at room temperature, using an Axopatch 200A patch-clamp amplifier (Axon Instruments, Union City, CA, USA). Electrodes were fashioned from borosilicate glass capillaries (World Precision Instruments, B150-F4) were

filled with an internal solution containing (mM): 150 cesium methane sulphonate (Cs-MeSO₃), 5 CsCl, 10 Hepes, 10 EGTA, 1 MgCl₂, 4 MgATP (pH 7.2, adjusted with CsOH). Typically, pipettes had resistances of 3-4 M Ω , before series resistance compensation of 60-75 %. For formation of gigaohm seals and initial break-in to the whole-cell voltage clamp configuration, cells were perfused with normal Tyrode solution containing (mM): 138 NaCl, 4 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 0.33 NaH₂PO₄, 10 Hepes, and 10 glucose (pH 7.4, adjusted with NaOH). Following successful break-in the perfusing medium was switched to an external recording solution containing (mM): 137 N-methyl-D-glucamine aspartate (NMG-Asp), 10 Glucose, 10 Hepes, 1.8 CaCl₂, 0.5 MgCl₂, 25 CsCl (pH 7.4, adjusted with NMG). Signals were filtered at 2 kHz. Data traces were acquired at a repetition interval of 2 sec from -70 to +60 at -80 mV holding potential. To determine the contribution of L- and T-types currents into common Ca²⁺ current we applied standard I/V protocols started from -80 mV (at -80 mV holding potential) and from -40 mV (at -40 mV holding potential) for T- and L-types correspondently. We held the potential at -40 mV to inactivate T-type of Ca²⁺ -current and then looked for any remaining transient inward current to 0 mV, near the peak of the L-type Ca²⁺-current –voltage relationship.

Spontaneous action potentials of SAN cells were recorded under perforated-patch conditions by using amphotericin at 35 \pm 1 $^{\circ}$ C. SANs were identified by their morphology and spontaneous activity. The extracellular Tyrode solution containing (mM) NaCl, 140; KCl, 5.4; CaCl₂, 1.8; MgCl₂, 1.0; Hepes-NaOH, 5.0; and D-glucose, 5.5; (adjusted to pH=7.4 with NaOH). The composition of the pipette solution was (mM): K aspartate, 130; NaCl, 10; ATP-Mg²⁺ salt, 2.0; creatine phosphate, 7.0; GTP-Na⁺ salt, 0.1; CaCl₂, 0.04; Hepes-KOH, 10; (adjusted to pH=7.2 with

KOH). Amphotericin (Sigma) was added to the pipette solution at a final concentration of 200 μ g/ml. SR calcium measurements were performed as described⁴⁹. Briefly, prior to measurement, the SR was loaded with calcium by a train of 10 voltage clamp command pulses (0.5 Hz) for eliciting I_{Ca}. The myocytes were held at -80 mV and depolarized to -40 mV for 50 ms to inactivate Na⁺ current and then further depolarized to 0 mV for 300 ms after which coordinated SR calcium release was induced by applying a spritz of 20 mM caffeine at a holding potential of -80 mV.

SAN preparation for calcium imaging and

biochemistry. Mice were anaesthetized with Avertin 2 mg/kg, i.p. A dissecting microscope was used to remove each heart, and each heart was pinned to a clay surface to excise the right atrium. The right atrium was opened to expose the crista terminalis, the intercaval area and the interatrial septum. The preparation was trimmed, leaving only the SAN region. For calcium imaging, the SAN preparation was loaded with the membrane-permeant fluorescent Ca²⁺ indicator, Fluo-3 AM (10 μ mol/L), in Tyrode solution for 30 min. Fluorescent signals, excited by the 488 nm line of Argon laser, were recorded in line-scan mode (1.93 ms per line) using a Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope. The power spectrum analysis of Ca²⁺ transients were performed using pClamp 10 software. For biochemistry experiments, whole SAN preparations were flash frozen for subsequent processing.

Statistical analysis. Data were analyzed using either paired two-tailed *t*-tests or two-way analysis of variance, and *P* values <0.05 were considered significant. Data are expressed as means \pm standard deviation.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the National Institutes of Health (HL084583 and HL62494 to PJM; HL079031, HL62494, and HL 70250 to MEA, HL090905 (LSS), the American Heart Association (0635056N to LSS), the Pew Scholars Trust (PJM), a Fondation Leducq Trans-Atlantic network of Excellence grant (05 CVD 01, Preventing Sudden Death) and a grant from Association Française contre les Myopathies (JJS).

REFERENCES

1. Mangrum, J.M. & DiMarco, J.P. The evaluation and management of bradycardia. *N Engl J Med* **342**, 703-709 (2000).
2. Kusumoto, F.M. & Goldschlager, N. Cardiac pacing. *N Engl J Med* **334**, 89-97 (1996).
3. DiFrancesco, D. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu Rev Physiol* **55**, 455-472 (1993).
4. Dobrzynski, H., Boyett, M.R. & Anderson, R.H. New insights into pacemaker activity: promoting understanding of sick sinus syndrome. *Circulation* **115**, 1921-1932 (2007).
5. Gregoratos, G., *et al.* ACC/AHA guidelines for implantation of cardiac pacemakers and antiarrhythmia devices: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Pacemaker Implantation). *J Am Coll Cardiol* **31**, 1175-1209 (1998).
6. Lamas, G.A., *et al.* The mode selection trial (MOST) in sinus node dysfunction: design, rationale, and baseline characteristics of the first 1000 patients. *Am Heart J* **140**, 541-551 (2000).
7. Palatini, P., Casiglia, E., Julius, S. & Pessina, A.C. High heart rate: a risk factor for cardiovascular death in elderly men. *Archives of internal medicine* **159**, 585-592 (1999).
8. Kristal-Boneh, E., Silber, H., Harari, G. & Froom, P. The association of resting heart rate with cardiovascular, cancer and all-cause mortality. Eight year follow-up of 3527 male Israeli employees (the CORDIS Study). *European heart journal* **21**, 116-124 (2000).
9. Schulze-Bahr, E., *et al.* Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *J Clin Invest* **111**, 1537-1545 (2003).
10. Milanese, R., Baruscotti, M., Gnecci-Ruscone, T. & DiFrancesco, D. Familial sinus bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel. *N Engl J Med* **354**, 151-157 (2006).
11. Sarachek, N.S. & Leonard, J.L. Familial heart block and sinus bradycardia. Classification and natural history. *The American journal of cardiology* **29**, 451-458 (1972).
12. Lehnart, S.E., *et al.* Inherited Arrhythmias: A National Heart, Lung, and Blood Institute and Office of Rare Diseases Workshop Consensus Report About the Diagnosis, Phenotyping, Molecular Mechanisms, and Therapeutic Approaches for Primary Cardiomyopathies of Gene Mutations Affecting Ion Channel Function. *Circulation* **116**, 2325-2345 (2007).
13. Lux, S.E., *et al.* Hereditary spherocytosis associated with deletion of human erythrocyte ankyrin gene on chromosome 8. *Nature* **345**, 736-739. (1990).
14. Srinivasan, Y., Elmer, L., Davis, J., Bennett, V. & Angelides, K. Ankyrin and spectrin associate with voltage-dependent sodium channels in brain. *Nature* **333**, 177-180. (1988).
15. Bennett, V. Immunoreactive forms of human erythrocyte ankyrin are present in diverse cells and tissues. *Nature* **281**, 597-599. (1979).
16. Mohler, P.J., *et al.* Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* **421**, 634-639 (2003).
17. Ango, F., *et al.* Ankyrin-based subcellular gradient of neurofascin, an immunoglobulin family protein, directs GABAergic innervation at purkinje axon initial segment. *Cell* **119**, 257-272 (2004).
18. Agre, P., Casella, J.F., Zinkham, W.H., McMillan, C. & Bennett, V. Partial deficiency of erythrocyte spectrin in hereditary spherocytosis. *Nature* **314**, 380-383 (1985).
19. Marks, A.R. Arrhythmias of the heart: beyond ion channels. *Nat Med* **9**, 263-264. (2003).
20. Mohler, P.J., *et al.* Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17533-17538 (2004).

21. Mohler, P.J. & Bennett, V. Defects in ankyrin-based cellular pathways in metazoan physiology. *Front Biosci* **10**, 2832-2840 (2005).
22. Mohler, P.J., Davis, J.Q. & Bennett, V. Ankyrin-B Coordinates the Na/K ATPase, Na/Ca Exchanger, and InsP(3) Receptor in a Cardiac T-Tubule/SR Microdomain. *PLoS Biol* **3**, e423 (2005).
23. Bogdanov, K.Y., Vinogradova, T.M. & Lakatta, E.G. Sinoatrial nodal cell ryanodine receptor and Na(+)-Ca(2+) exchanger: molecular partners in pacemaker regulation. *Circ Res* **88**, 1254-1258. (2001).
24. Bennett, V. & Chen, L. Ankyrins and cellular targeting of diverse membrane proteins to physiological sites. *Current Opinion in Cell Biology* **13**, 61-67 (2001).
25. Bennett, V. Of mice and men: the mice were right. *J Clin Invest* **95**, 921-922. (1995).
26. Drenckhahn, D., Schluter, K., Allen, D.P. & Bennett, V. Colocalization of band 3 with ankyrin and spectrin at the basal membrane of intercalated cells in the rat kidney. *Science* **230**, 1287-1289. (1985).
27. Bennett, V., Davis, J. & Fowler, W.E. Brain spectrin, a membrane-associated protein related in structure and function to erythrocyte spectrin. *Nature* **299**, 126-131 (1982).
28. Agre, P., Orringer, E.P. & Bennett, V. Deficient red-cell spectrin in severe, recessively inherited spherocytosis. *N Engl J Med* **306**, 1155-1161 (1982).
29. Mohler, P.J., *et al.* Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor localization and stability in neonatal cardiomyocytes requires interaction with ankyrin-B. *J Biol Chem* **279**, 12980-12987 (2004).
30. Cunha, S.R., Bhasin, N. & Mohler, P.J. Targeting and stability of na/ca exchanger 1 in cardiomyocytes requires direct interaction with the membrane adaptor ankyrin-B. *J Biol Chem* **282**, 4875-4883 (2007).
31. Maltsev, V.A., Vinogradova, T.M. & Lakatta, E.G. The emergence of a general theory of the initiation and strength of the heartbeat. *Journal of pharmacological sciences* **100**, 338-369 (2006).
32. Kodama, I., *et al.* Regional differences in the role of the Ca²⁺ and Na⁺ currents in pacemaker activity in the sinoatrial node. *Am J Physiol* **272**, H2793-2806 (1997).
33. Mangoni, M.E., *et al.* Functional role of L-type Cav1.3 Ca²⁺ channels in cardiac pacemaker activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5543-5548 (2003).
34. Sanders, L., Rakovic, S., Lowe, M., Mattick, P.A. & Terrar, D.A. Fundamental importance of Na⁺-Ca²⁺ exchange for the pacemaking mechanism in guinea-pig sino-atrial node. *J Physiol* **571**, 639-649 (2006).
35. Bogdanov, K.Y., *et al.* Membrane potential fluctuations resulting from submembrane Ca²⁺ releases in rabbit sinoatrial nodal cells impart an exponential phase to the late diastolic depolarization that controls their chronotropic state. *Circ Res* **99**, 979-987 (2006).
36. Koushik, S.V., *et al.* Targeted inactivation of the sodium-calcium exchanger (Ncx1) results in the lack of a heartbeat and abnormal myofibrillar organization. *Faseb J* **15**, 1209-1211. (2001).
37. Wakimoto, K., *et al.* Targeted disruption of Na⁺/Ca²⁺ exchanger gene leads to cardiomyocyte apoptosis and defects in heartbeat. *J Biol Chem* **275**, 36991-36998. (2000).
38. Reuter, H., *et al.* The Na⁺-Ca²⁺ exchanger is essential for the action of cardiac glycosides. *Circ Res* **90**, 305-308. (2002).
39. Mohler, P.J., *et al.* Defining the cellular phenotype of "ankyrin-B syndrome" variants: human ANK2 variants associated with clinical phenotypes display a spectrum of activities in cardiomyocytes. *Circulation* **115**, 432-441 (2007).
40. Mohler, P.J., *et al.* A cardiac arrhythmia syndrome caused by loss of ankyrin-B function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9137-9142 (2004).
41. Mery, A., *et al.* Initiation of embryonic cardiac pacemaker activity by inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent calcium signaling. *Mol Biol Cell* **16**, 2414-2423 (2005).

42. Sasse, P., *et al.* Intracellular Ca²⁺ oscillations, a potential pacemaking mechanism in early embryonic heart cells. *J Gen Physiol* **130**, 133-144 (2007).
43. Martin, L.J., *et al.* Major quantitative trait locus for resting heart rate maps to a region on chromosome 4. *Hypertension* **43**, 1146-1151 (2004).
44. Jaworski, R.L., *et al.* Heart rate and blood pressure quantitative trait loci for the airpuff startle reaction. *Hypertension* **39**, 348-352 (2002).
45. Alemayehu, A., Breen, L., Krenova, D. & Printz, M.P. Reciprocal rat chromosome 2 congenic strains reveal contrasting blood pressure and heart rate QTL. *Physiological genomics* **10**, 199-210 (2002).
46. Marionneau, C., *et al.* Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J Physiol* **562**, 223-234 (2005).
47. Mangoni, M.E. & Nargeot, J. Properties of the hyperpolarization-activated current (I_f) in isolated mouse sino-atrial cells. *Cardiovasc Res* **52**, 51-64 (2001).
48. Wei, S.K., *et al.* Muscarinic modulation of the sodium-calcium exchanger in heart failure. *Circulation* **115**, 1225-1233 (2007).
49. Zhang, R., *et al.* Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nat Med* **11**, 409-417 (2005).

FIGURES

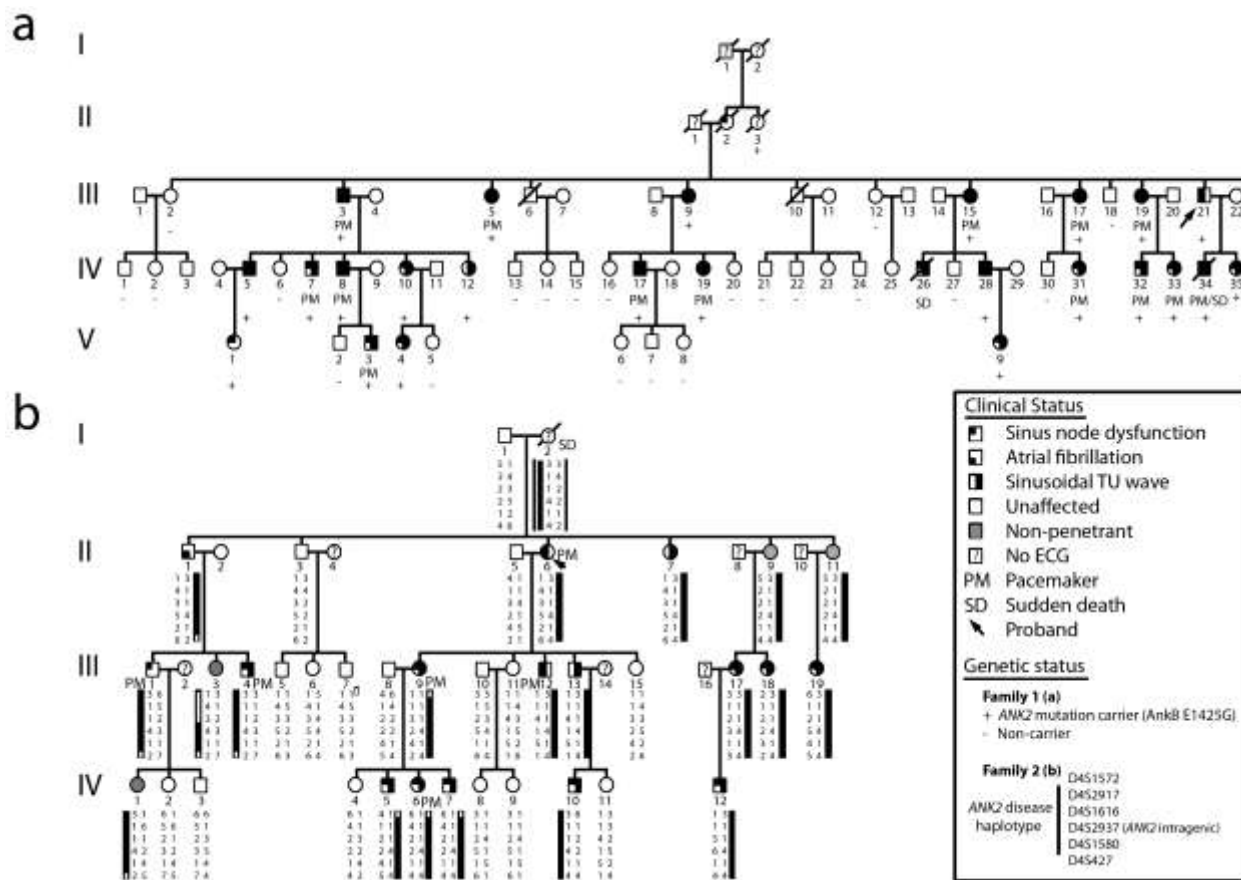


Figure 1. Sinoatrial node dysfunction in human kindreds with ANK2 gene loss-of-function variants. (a) Family 1: Affected patients carry an AnkB-E1425G mutation depicted by a plus, whereas non-carriers are depicted by a minus. Others individuals did not undergo genetic testing. Note that at least 23 of the 25 variant carriers (92%) display sinus node dysfunction. (b) Family 2: Affected patients carry a common haplotype depicted by a black bar at the ANK2 locus. Markers D4S1572 and D4S427 delimitate the disease haplotype to a 16.5 cM interval (recombinations for patients III-9 and II-1, respectively). Squares represent males and circles represent females. For detailed clinical data of the patients, see **Supplementary Tables 1-2**.

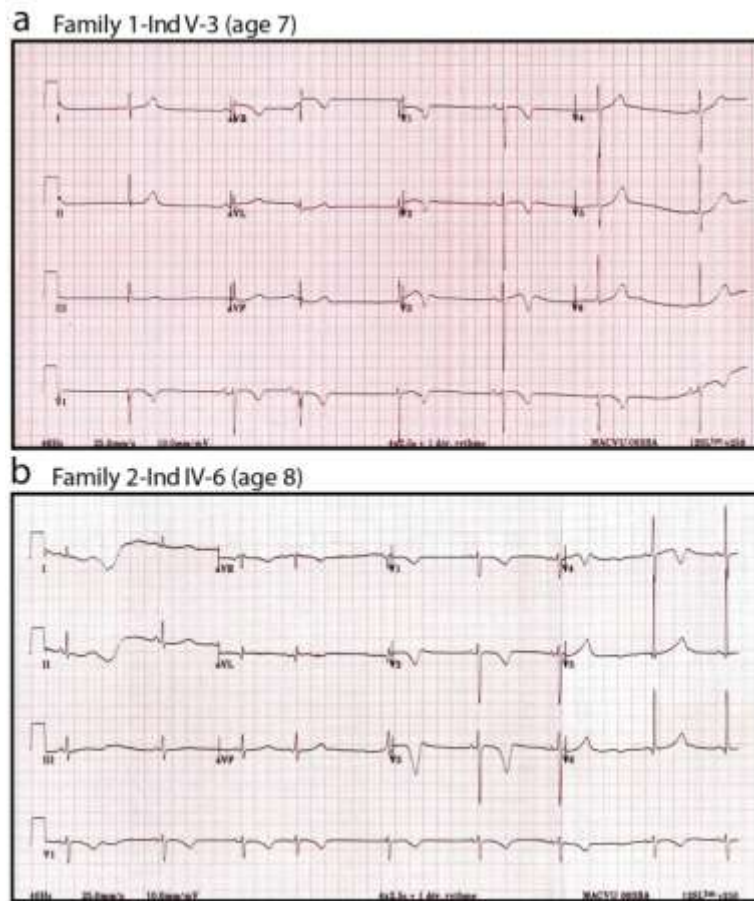


Figure 2. Sinus node dysfunction in carriers of human ANK2 variant loss-of-function variants. (a) Family 1. ECG of patient V-3 recorded at 7 years showing severe sinus node dysfunction with a junctional escaped rhythm (heart rate 42 bpm), QT interval prolongation, and T wave inversion. (b) Family 2. ECG from patient IV-6 at 8 year showing severe sinus node dysfunction (heart rate 50 bpm), QT interval prolongation, and T wave inversion.

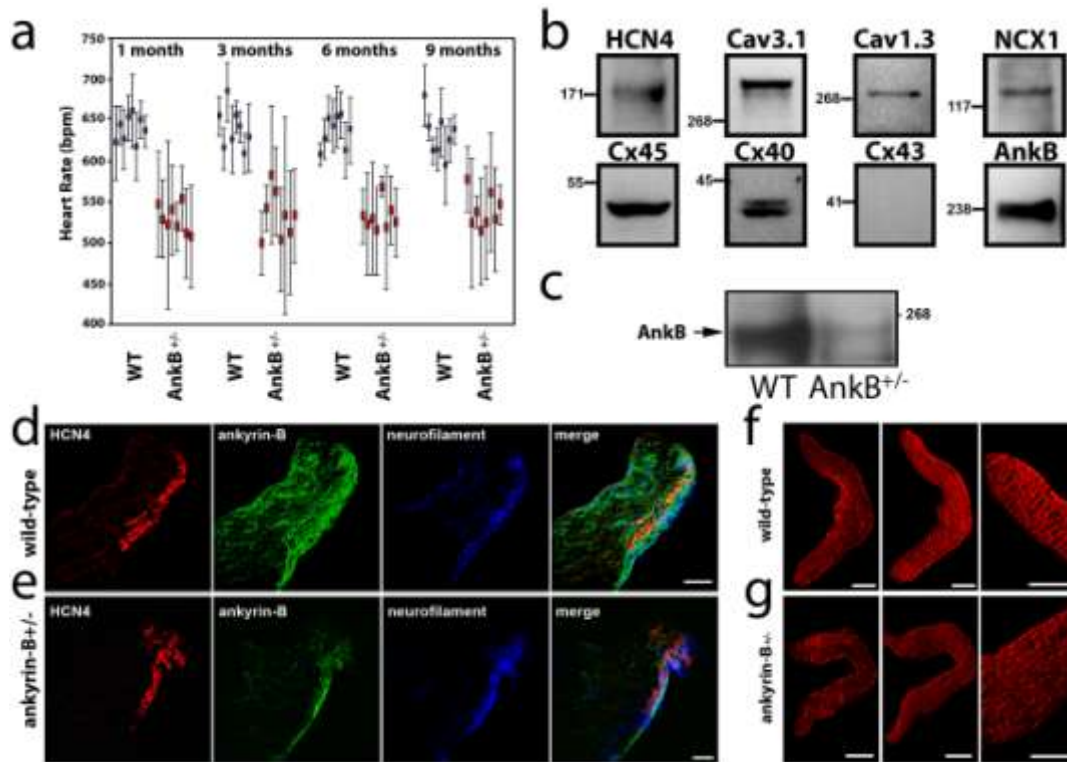


Figure 3. Ankyrin-B is expressed in human and mouse sinoatrial node and AnkB^{+/-} mice display severe sinus node dysfunction. (a) Adult AnkB^{+/-} mice exhibit significant bradycardia and extreme heart rate variability at all ages measured compared with age matched WT littermates. Data represents mean \pm SD for eight mice from each genotype at each age. Data from each mouse were generated by averaging the mean of six measurements from different days. (b) Immunoblots of human SAN tissue for SAN resident proteins HCN4, Cav3.1, Cav1.3, NCX1, and Cx45. Note that Cx43 (not expressed) is not a SAN resident protein. We observed decreased expression of AnkB in all SAN preps. (c) AnkB is expressed in sinoatrial node (SAN) of the WT mouse heart and is significantly reduced in AnkB^{+/-} adult mice. Equal protein loading was assessed by blotting for unrelated protein (not shown, NHERF1). (d-e) AnkB is expressed in the mouse sinoatrial node. WT and AnkB^{+/-} mouse sections were immunolabeled for AnkB and SAN markers HCN4 and neurofilament and imaged using identical protocols. Panel g indicates loss of AnkB expression in AnkB^{+/-} mice. Scale bar equals 10 microns. (f-g) Expression of AnkB in isolated WT and AnkB^{+/-} sinoatrial node myocytes. Note decreased expression and abnormal localization of AnkB in AnkB^{+/-} SAN myocytes (immunolabeled with affinity-purified AnkB Ig). Left panel is single XY confocal scan. Center and right panels are three-dimensional images of the full height of the individual myocyte. Scale bars equal ten microns.

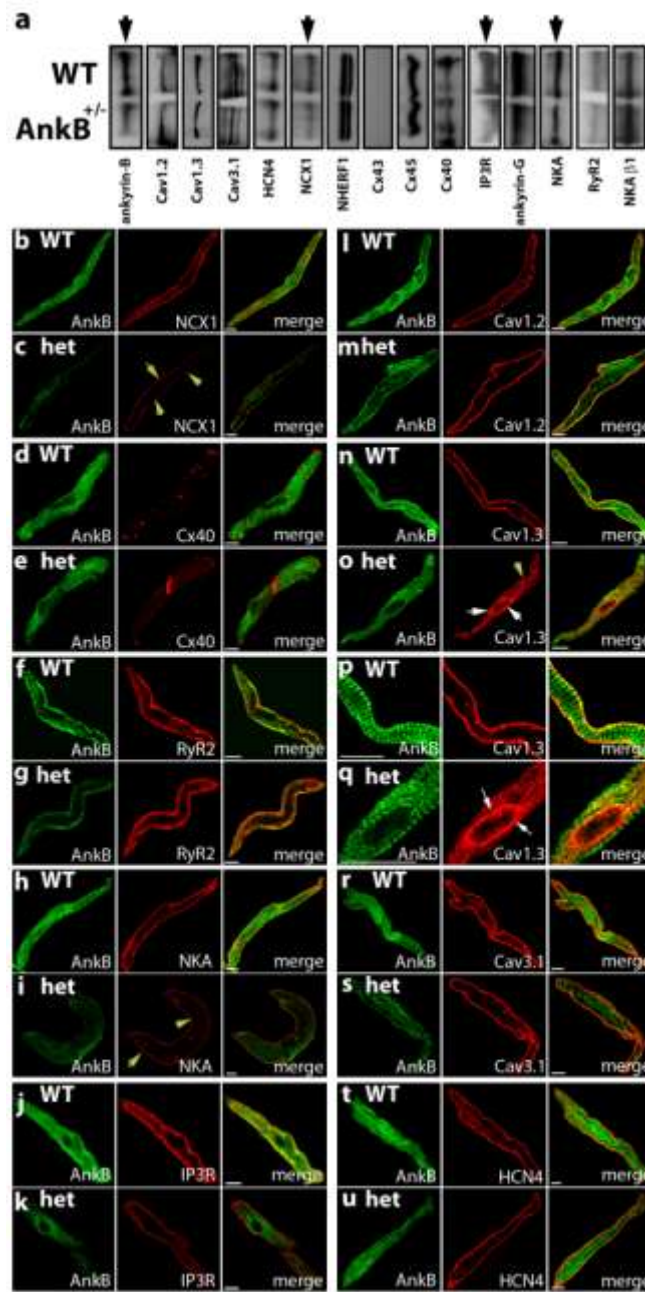


Figure 4. NCX1, IP3R, Na/K ATPase, and Cav1.3 membrane expression is affected in AnkB^{+/-} SAN myocytes.

(a) Reduced NCX1, IP3R, and Na/K ATPase protein levels in AnkB^{+/-} SAN as assessed by immunoblot. No difference in expression of other SAN proteins was observed in AnkB^{+/-} SAN preps. Blots are representative images of three pooled samples of SAN. Each pool consisted of at least three individual SAN. Molecular weights are denoted in kilodaltons. (b-u) Confocal imaging of SAN myocytes isolated from WT and AnkB^{+/-} mice. SAN myocytes were immunolabeled and imaged using identical protocols. Note that NCX1 (b-c), IP3R (l-k), and Na/K ATPase (h,i) immunolabeling is generally reduced across the myocyte, while Cav1.3 immunostaining is concentrated near the peri-nuclear region of AnkB^{+/-} SAN myocytes (n-q). WT and AnkB^{+/-} SAN myocytes displayed no difference in the expression or localization of connexin 40 (e-f), ryanodine receptor type 2 (f-g), Cav1.2 (l-m), Cav3.1 (r-s), and HCN4 (t-u). Scale bars equal ten microns.

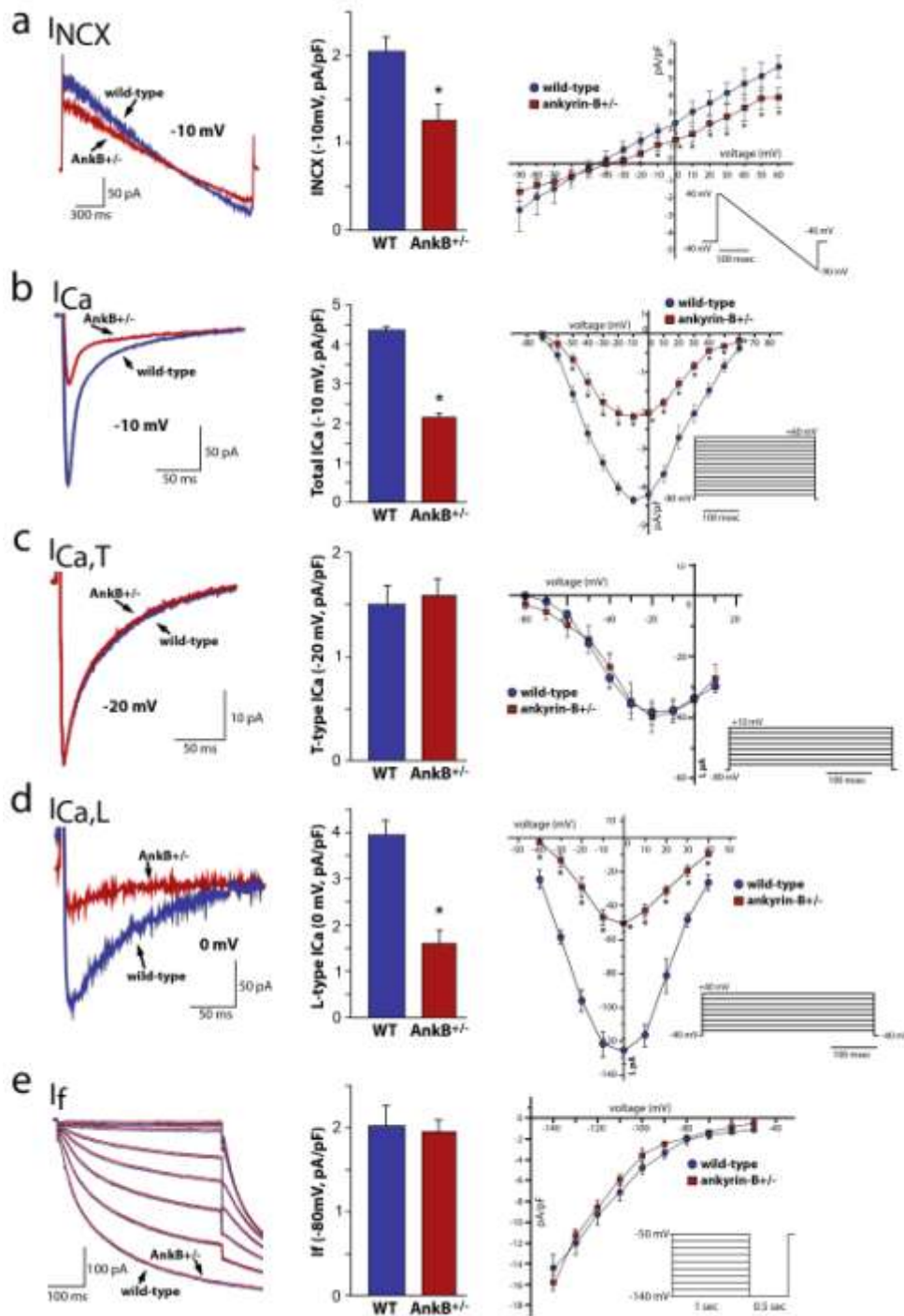


Figure 5. Reduced I_{NCX} and $I_{Ca,L}$ in *AnkB*^{+/-} SAN myocytes. Reduction of *AnkB* leads to reduced NCX1 and L-type calcium currents. (a) I_{NCX} density is significantly lower in isolated *AnkB*^{+/-} SAN cells compared to WT at voltages greater than 0 mV ($n=12$, $p < 0.05$). Raw trace and bar graph represent current at -10 mV. (b) I_{Ca} density is reduced significantly in isolated

AnkB^{+/-} SAN cells compared to WT cells at all voltages tested (n=10, p<0.05). Raw trace and bar graph represent current at -10 mV. (c-d) T-type calcium current is unchanged between WT and AnkB^{+/-} SAN myocytes (n=10, NS) while L-type calcium current is dramatically reduced in AnkB^{+/-} SAN myocytes (n=10, p<0.05). Raw traces and bar graphs represent current at -20 (I_{Ca,T}) and 0 mV (I_{Ca,L}). (e) WT and AnkB^{+/-} SAN myocytes display similar I_f current (n=10, NS). Bar graph represents current at -80 mV.

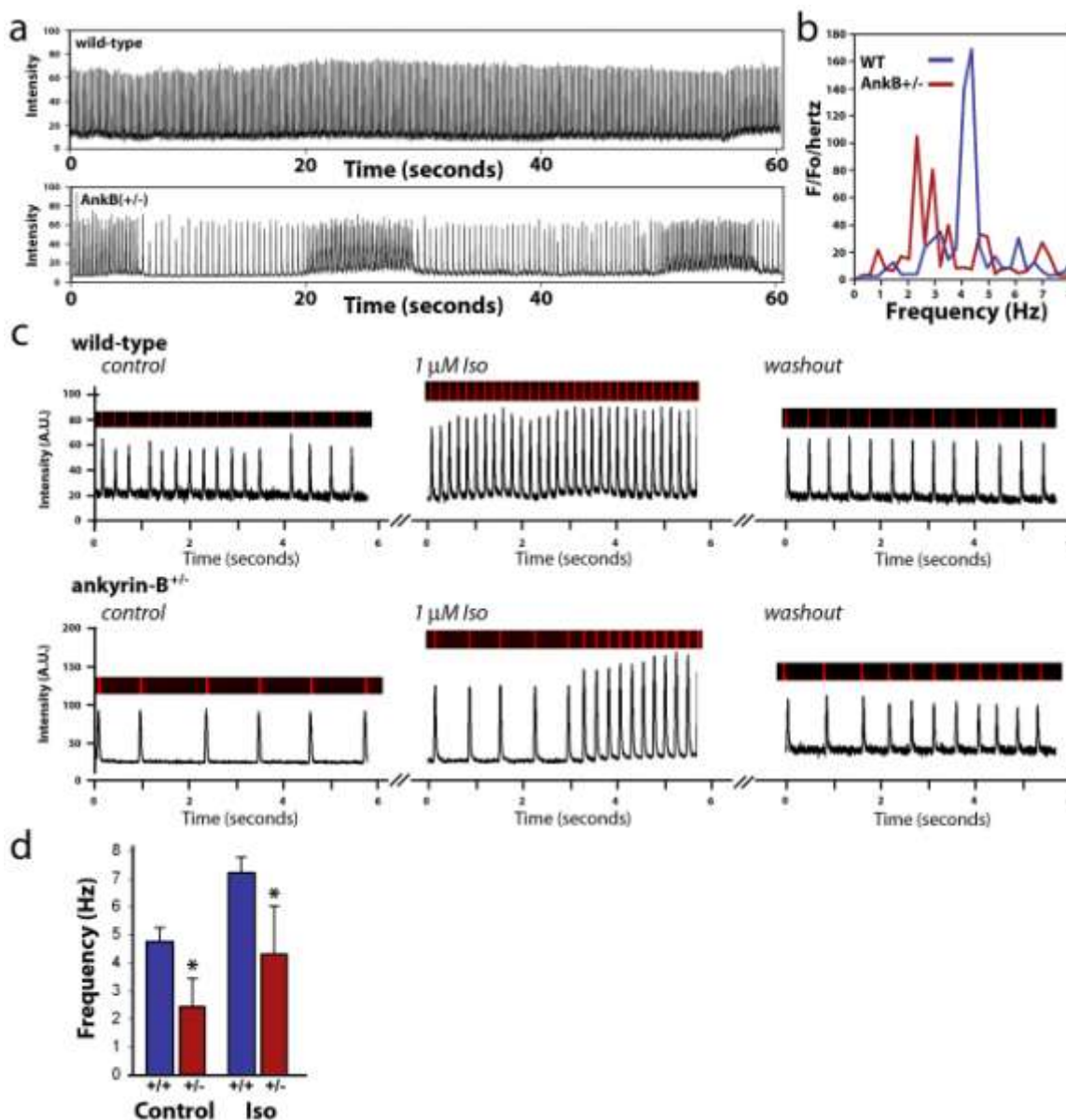
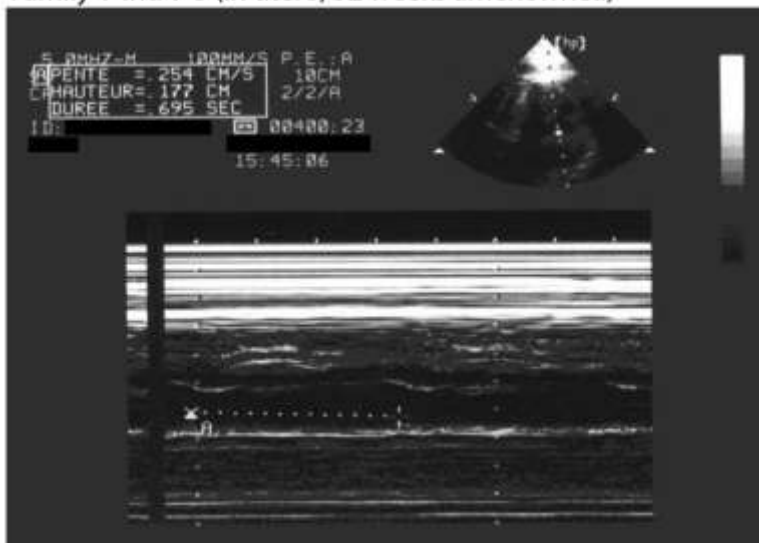


Figure 6. AnkB is required for SAN calcium homeostasis. (a) Rate and frequency of calcium transients from isolated SAN myocytes of WT and AnkB^{+/-} mice were measured using Fluo-3AM and confocal imaging. Note reduced rate and extreme rate variability in AnkB^{+/-} SAN myocyte. (b) Fourier transformation of pooled data from eight independent

experiments from rate and frequency measurements in **a**. Note that $AnkB^{+/-}$ SAN explants display reduced cycle length at least two dominant frequencies. **(c)** Calcium transients of WT and $AnkB^{+/-}$ mouse SAN. $AnkB^{+/-}$ cells display increased cycle length and inconsistent response to isoproterenol. **(d)** Mean data from isoproterenol experiments (n=8 of each genotype, $p<0.05$).

SUPPLEMENTARY FIGURES

Family 1-Ind V-3 (in utero, 32 weeks amenorrhea)

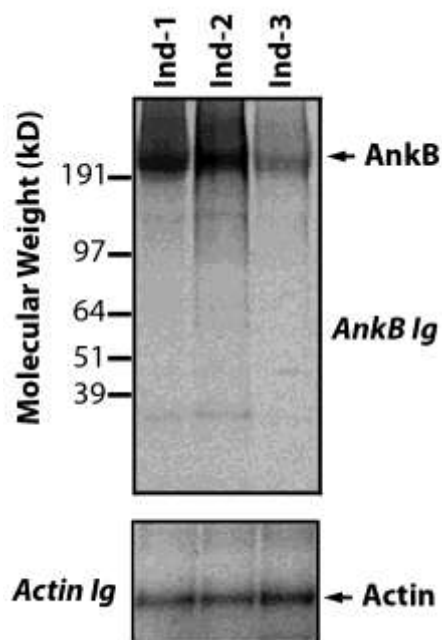


Supplementary Figure 1. Ultrasound recording of a human fetus (family 1, patient V-3) revealing significant bradycardia with a heart rate of 86.3 bpm (compared to 125-160 bpm).

Family 2-Ind II-6 (age 55)



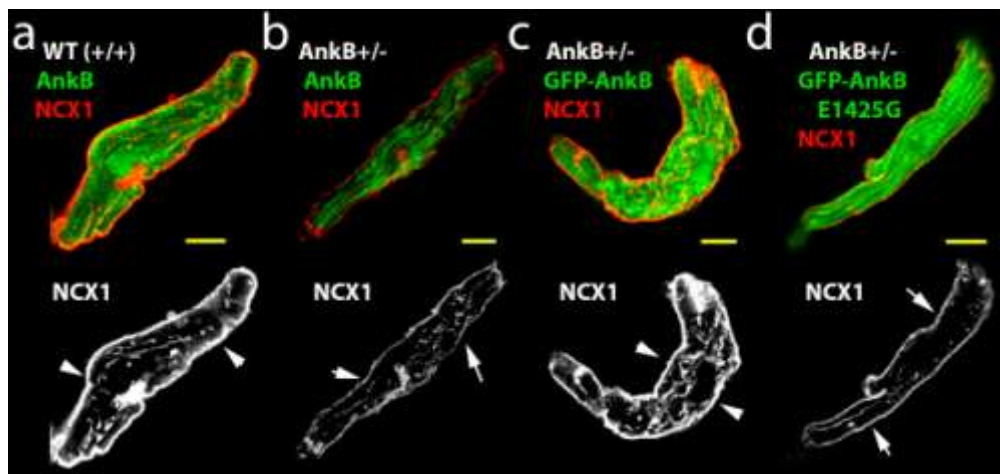
Supplementary Figure 2. ECG showing an atrial fibrillation in patient II-6 (family 2) at 55 years-old, implanted with a pacemaker for sinus node dysfunction.



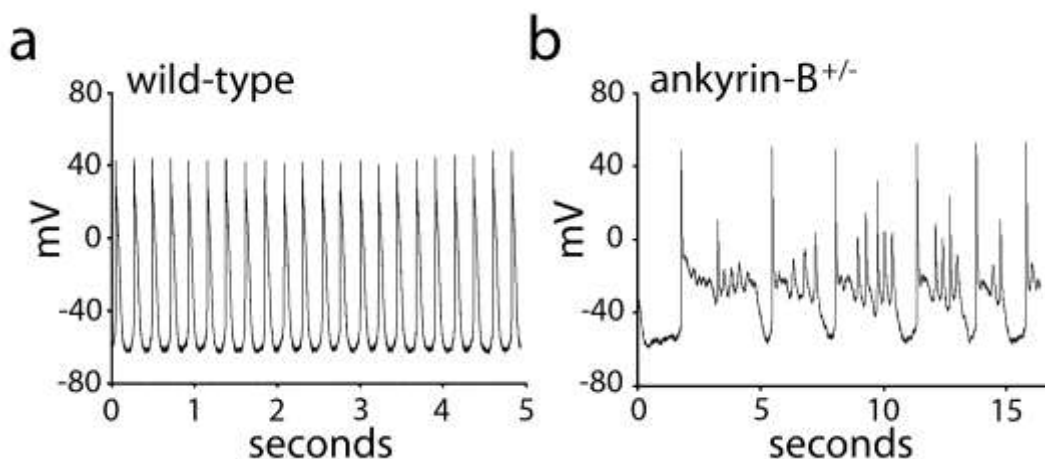
Supplementary Figure 3. Decreased ankyrin-B expression in human with mutant *ANK2* allele.

Immunoblot of 50 micrograms of whole tissue lysate from pectoral muscle of two control individuals and patient with mutant *ANK2* allele. Note significant decrease in 220 kD

ankyrin-B expression in individual with mutant *ANK2* allele. Actin was used as a marker for equal loading.



Supplementary Figure 4. Viral expression of AnkB rescues NCX1 expression to normal in $AnkB^{+/-}$ SAN myocytes. Expression of AnkB and NCX1 in wild-type (a) and $AnkB^{+/-}$ SAN myocytes (b). Note decreased NCX1 membrane staining (white arrows) in $AnkB^{+/-}$ SAN myocytes. (c) Lentiviral expression of GFP-AnkB restores to normal the membrane expression of NCX1 in $AnkB^{+/-}$ SAN myocytes. (d) Human AnkB E1425G is a loss-of-function variant in SAN. While normally expressed and localized as endogenous AnkB, GFP-AnkB E1425G does not rescue aberrant NCX1 membrane expression phenotype in $AnkB^{+/-}$ SAN myocytes. Scale bar for all panels equals 20 microns.



Supplementary Figure 5. AnkB^{+/-} SAN cells display abnormal electrical activity. Action potentials recorded from single isolated SAN myocytes of WT and AnkB^{+/-} mice. In addition to increased action potential cycle length, we observed afterdepolarizations in SAN myocytes from a significant number of AnkB^{+/-} mice (~18%) versus WT mice (3%).

SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary Table 1. Clinical characteristics of the ANK2 mutation carriers of family 1 (AnkB-E1425G mutation).

no.	Current age	Pacemaker (age at implant)	Atrial fibrillation (age at diagnosis)	Patient age (ECG year)	RR (bpm)	Sinus node dysfunction	QT (ms)	QTc (ms)	TU (ms)	Repolarization	Symptoms
I-2*	† at 75	no		70 (1975)	5	yes (CSR)	480 (LBBB)	460 (LBBB)		normal	
II-3	79	yes (64)	paroxysmal (58), permanent (60)	60 (1988)	2	yes (CSR)	360	335	00	sinusoidal TU wave	palpitations, pre-syncope
II-5	77	yes (57)	permanent (72)	40 (1970)	0	yes (JER)	460	420	00	sinusoidal TU wave	syncope
II-9	74	no	permanent (63)	37 (1970)	5	yes (JER)	530	460	10	sinusoidal TU wave	palpitations
II-15	70	yes (56)	paroxysmal (56)	53 (1990)	0	yes (JER)	460	420	40	sinusoidal TU wave	palpitations
II-17	68	yes (41)	paroxysmal (41)	53 (1992)	5	yes	400	346	00	sinusoidal TU wave	palpitations, syncope
II-19	65	yes (49)	paroxysmal (48), permanent (59)	48 (1990)	0	yes	460	376	80	sinusoidal TU wave	palpitations, syncope
II-21	64	no	paroxysmal (23), permanent (28)	34 (1977), AF	8	yes	400	484	20	normal	palpitations
V-5	51	no	permanent (42)	36 (1992)	8	yes (JER)	435	389	75	sinusoidal TU wave	palpitations
V-7	48	yes (34)		34 (1993)	3	yes (JER)	380	389	60	sinusoidal TU wave	
V-8	46	yes (31)	paroxysmal (31)	31 (1992)	4	yes (JER)	465	440	85	sinusoidal TU wave	palpitations
V-10	39	no		29 (1997)	2	yes (CSR)	440	368	00	sinusoidal TU wave	
V-12	36	no		23 (1994)	5	no	440	421	40	sinusoidal TU wave	

V-17	3	4	yes (27)	paroxysmal (27)	11 (1975)	5	yes	440	421	00	sinusoidal TU wave	palpitations, pre-syncope
V-19	2	4	yes (23)	paroxysmal (23)	23 (1988)	2	yes (CSR)	440	410	00	sinusoidal TU wave	palpitations, pre-syncope
V-26*	at 12	†	no		11 (1973)	2	yes (JER)	420	391	00	sinusoidal TU wave	SD at 12 (exercise)
V-28	8	3	no	permanent (21)	10 (1979)	0	yes (JER)	520	475	00	sinusoidal TU wave	palpitations
V-31	4	3	yes (22)		22 (1995)	1	yes	400	331	60	sinusoidal TU wave	palpitations
V-32	9	3	yes (24)		9 (1977)	8	yes (JER)	400	358	40	sinusoidal TU wave	
V-33	3	3	yes (18)		33 (2007)	5	yes (JER)	440	381	80	sinusoidal TU wave	palpitations, pre-syncope
V-34	at 18	†	yes (16)	paroxysmal (14), permanent (16)	11 (1982)	0	yes (JER)	440	402	80	sinusoidal TU wave	palpitations, syncope, SD at 18 (being awakened)
V-35	5	3	no		10 (1982)	4	yes (CSR)	360	426	80	sinusoidal TU wave	palpitations
-1	7	1	no		7 (1997)	8	yes (CSR)	360	383		normal	syncope
-3 [§]	1	1	yes (8)		7 (2003)	2	yes	480	402	00	sinusoidal TU wave	pre-syncope
-4		6	no		at birth (2001)	2	yes	400	468	80	sinusoidal TU wave	
-9		8	no		at birth (1999)	0	yes (CSR)	320	392	00	sinusoidal TU wave	

*unsequenced affected patients. AF, atrial fibrillation; HR, heart rate; CSR, coronary sinus rhythm; JER, junctional escape rhythm; LBBB, left bundle branch block; SD, sudden death.

[§]ECG is shown in **Fig.2**.

Supplementary Table 2. Clinical characteristics of the *ANK2* mutation carriers of family 2 (*ANK2* disease haplotype).

Proband	Current age	Pacemaker (age at implant)	Atrial fibrillation (age at diagnosis)	Patient age (ECG year)	Resting HR (bpm)	Sinus node dysfunction	QT (ms)	QTc (ms)	TU (ms)	Repolarization	Symptoms
I-1	64	no	paroxysmal (58)	59 (2002)	60	no	380	380	20	normal	
I-6 ^s	60	yes (51)	paroxysmal (50), permanent (52)	55 (2002), AF	71	yes	320	348		normal	
I-7	58	no		53 (2002)	61	no	380	383	00	sinusoidal TU wave	
I-9	55	no		50 (2002)	55	no	420	437	20	normal	
I-11	51	no		46 (2002)	66	no	380	399	60	normal	
II-1	43	yes (43)		43 (2007)	73	yes	520	386	00	normal	syncope
II-3	42	no		37 (2002)	60	no	380	380		normal	
II-4	37	yes (8)		32 (2002)	78	yes	400	318	40	sinusoidal TU wave	
II-9	42	yes (40)		37 (2002)	71	yes	440	364	80	sinusoidal TU wave	asthenia
II-12	38	yes (29)	paroxysmal (35)	33 (2002)	78	yes	420	376	60	normal	asthenia
II-13	36	no		31 (2002)	75	no	370	414	40	sinusoidal TU wave	
II-17	33	no		28 (2002)	61	yes (CSR)	370	373	00	sinusoidal TU wave	syncope
II-18	29	no		24 (2002)	79	yes	440	398	60	sinusoidal TU wave	pre-syncope
II-19	24	no		19 (2002)	70	yes (CSR)	440	402	00	sinusoidal TU wave	
	1	no		10	59	no	350	433		normal	

V-1	0			(2007)	2						
V-5	2	no		16	4	yes	360	325	60	sinusoidal TU wave	
V-6 [§]	1	yes (8)		8	5	yes	500	456	20	sinusoidal TU wave	asthenia
V-7	9	no		5	6	yes	400	410	00	sinusoidal TU wave	
V-10	1	no		10	5	yes	400	386	60	sinusoidal TU wave	
V-12	8	no		8	4	yes (CSR)	460	394	60	sinusoidal TU wave	
I-1	6	no	paroxysmal (58)	59	6	no	380	380	20	normal	
I-6 [§]	6	yes (51)	paroxysmal (50), permanent (52)	55	7	yes	320	348		normal	
I-7	5	no		53	6	no	380	383	00	sinusoidal TU wave	
I-9	5	no		50	6	no	420	437	20	normal	
I-11	5	no		46	6	no	380	399	60	normal	
II-1	4	yes (43)		43	3	yes	520	386	00	normal	syncope

AF, atrial fibrillation; HR, Heart rate; CSR: coronary sinus rhythm.

[§]ECG are shown in **Fig.2** and **Supplementary Fig.2**.

Supplementary Table 3. SAN genes analyzed by Taqman Low Density Arrays.

Gene Symbol	Protein	NCBI Gene Ref	Chrom osome	Assay ID	Target Exons
		NM_011		Mm0080345	
Abcc8	SUR1	510	7	0_m1	19
		NM_011		Mm0044163	
Abcc9	SUR2	511	6	8_m1	31
	cardiac α	NM_009		Mm0047727	
Actc1	actin	608	2	7_g1	2
		NM_178		Mm0061832	
Ank2	Ankyrin B	655	3	5_m1	17
Atp1a	α 1 Na/K-	NM_144		Mm0052325	
1	ATPase	900	3	5_m1	10
Atp1a	α 2 Na/K-	NM_178		Mm0061789	
2	ATPase	405	1	9_m1	20
Atp1b	β 1 Na/K-	NM_009		Mm0043761	
1	ATPase	721	1	2_m1	2
Atp2a		NM_009		Mm0043763	
2	SERCA2a	722	5	4_m1	20
Cacn		NM_009		Mm0043791	
a1c	Cav1.2	781	6	7_m1	8
		NM_028		Mm0055138	
a1d	Cav1.3	981	14	4_m1	29
		NM_009		Mm0048654	
a1g	Cav3.1	783	11	9_m1	9
		NM_021		Mm0044536	
a1h	Cav3.2	415	17	9_m1	15
		NM_009		Mm0048660	
a2d1	Cav α 2 δ 1	784	5	7_m1	33
		NM_020		Mm0045782	
a2d2	Cav α 2 δ 2	263	9	5_m1	3
		NM_009		Mm0048661	
a2d3	Cav α 2 δ 3	785	14	3_m1	3
		NM_031		Mm0051894	
b1	Cav β 1	173	11	0_m1	1
		NM_023		Mm0065909	
b2	Cav β 2	116	2	2_m1	12
		NM_007		Mm0043223	
b3	Cav β 3	581	15	3_m1	1
		NM_133		Mm0051921	
g7	Cav δ 7	189	7	6_m1	1
		NM_009		Mm0048665	
1	Calm1	790	12	5_m1	2
Clcn2	CIC-2	NM_009	16	Mm0043824	22

		900		5_m1	
		NM_173		Mm0043256	
Clcn3	CIC-3	876	8	6_m1	4
		NM_009		Mm0048703	
Cnn1	Calponin 1	922	9	2_m1	1
Col1a	α 1	NM_007		Mm0080166	
1	Procollagen 1	742	11	6_g1	49
		NM_010		Mm0043910	
Gja1	Cx43	288	10	5_m1	1
		NM_008		Mm0043361	
Gja4	Cx37	120	4	0_s1	8
		NM_008		Mm0043361	
Gja5	Cx40	121	3	9_s1	6
		NM_010		Mm0046883	
Hcn1	Hcn1	408	13	2_m1	3
		NM_008		Mm0046853	
Hcn2	Hcn2	226	10	8_m1	3
		NM_019		Mm0044493	
Itpr2	IP3R-2	923	6	7_m1	4
		NM_010		Mm0043997	
Kcna1	Kv1.1	595	6	7_s1	1
		NM_008		Mm0043458	
Kcna2	Kv1.2	417	3	4_s1	2
		NM_021		Mm0044524	
Kcna4	Kv1.4	275	2	1_s1	4
		NM_145		Mm0052434	
Kcna5	Kv1.5	983	6	6_s1	19
		NM_013		Mm0049662	
Kcna6	Kv1.6	568	6	5_s1	14
		NM_008		Mm0049279	
Kcnb1	Kv2.1	420	2	1_m1	1
		NM_019		Mm0049806	
Kcnd2	Kv4.2	697	6	5_m1	4
		NM_019		Mm0049826	
Kcnd3	Kv4.3	931	3	0_m1	4
		NM_013		Mm0046537	
Kcnh2	mERG	569	5	0_m1	1
Kcnip		NM_030		Mm0051891	
2	KCHIP2	716	19	4_m1	1
		NM_010		Mm0044005	
1	Kir6.2	602	7	0_s1	13
		NM_010		Mm0044005	
2	Kir2.2	603	11	8_s1	6
		NM_008		Mm0043461	
Kcnj2	Kir2.1	425	11	6_m1	1

		NM_008		Mm0043461	
Kcnj3	Kir3.1	426	2	8_m1	2
		NM_008		Mm0043462	
Kcnj8	Kir6.1	428	6	0_m1	2
		NM_010		Mm0080703	
Kcnk3	TASK	608	5	6_m1	1
		NM_032		Mm0044625	
Kcnn1	SK1	397	8	9_m1	4
		NM_080		Mm0044651	
Kcnn2	SK2	465	18	4_m1	7
		NM_080		Mm0044651	
Kcnn3	SK3	466	3	6_m1	2
		NM_008		Mm0043464	
Kcnq1	KvLQT1	434	7	1_m1	11
		NM_080		Mm0060055	
Myh7	β MHC	728	14	5_m1	39
		NM_010		Mm0044038	
Myl2	MLC2V	861	5	4_m1	4
		NM_010		Mm0044037	
Myl4	MLC1A	858	11	8_m1	2
Nedd		NM_031		Mm0045958	
4l	Nedd4-2	881	18	4_m1	18
		NM_008		Mm0065778	
5	Nkx2.5	700	17	3_m1	1
		NM_008		Mm0043530	
Nppb	BNP	726	4	4_g1	1
		NM_146		Mm0045073	
Pias3	KChAP	135	3	9_m1	5
		NM_023		Mm0045226	
Pln	PLB	129	10	3_m1	1
		NM_023		Mm0046587	
Ryr2	RYR2	868	13	7_m1	59
		NM_011		Mm0044121	
Scn1b	Nav β 1	322	7	0_m1	3
		NM_133		Mm0050010	
Scn4a	Nav1.4	199	11	3_m1	10
		NM_021		Mm0045197	
Scn5a	Nav1.5	544	9	1_m1	11
		NM_009		Mm0080195	
Scn7a	Nav2.1	135	2	2_m1	24
Slc8a		NM_011		Mm0044152	
1	NCX1	406	17	4_m1	9
		NM_009		Mm0043691	
Tbx2	T-box 2	324	11	5_m1	6
Tbx3	T-box 3	NM_198	5	Mm0080977	16

		052		9_s1	
		NM_011		Mm0080352	
Tbx5	T-box 5	537	5	1_m1	8
	Skeletal	NM_021		Mm0050242	
Tnni1	troponin I	467	1	6_m1	4
	Cardiac	NM_009		Mm0043716	
Tnni3	troponin I	406	7	4_m1	5
		NM_011		Mm0049590	
Uchl1	UCHL1	670	5	0_m1	4

Supplementary Table 4. Post-transcriptional loss of expression of multiple ion channels/transporters in *AnkB^{+/-}* SAN. TaqMan Low Density Array (TLDA) on pools of sinoatrial nodes isolated from WT and *AnkB^{+/-}* mice reveal no significant change in mRNA levels of major cardiac mRNAs (see **Supplementary Table 3** for specific details on mRNAs tested).

Gene Symbol	Protein	Gene Name	het vs wt
Abc			
c8	SUR1	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8	-11.67
Abc			
c9	SUR2	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9	-10.82
Act	cardiac α		
c1	actin	actin, alpha, cardiac	4.87
Ank			
2	Ankyrin B	ankyrin 2, brain	-31.25
Atp	α 1 Na/K-		
1a1	ATPase	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 1 polypeptide	10.05
Atp	α 2 Na/K-		
1a2	ATPase	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 2 polypeptide	17.89
Atp	β 1 Na/K-		
1b1	ATPase	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 1 polypeptide	6.08
Atp			
2a2	SERCA2a	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	12.23
Cac			
na1c	Cav1.2	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit	6.41
Cac			
na1d	Cav1.3	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit	6.55
Cac			
na1g	Cav3.1	calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1G subunit	6.66
Cac			
na1h	Cav3.2	calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1H subunit	12.32
Cac	Cava2 δ 1	calcium channel, voltage-dependent, alpha2/delta subunit 1	4.16

na2d1				
	Cac			
na2d2	Cava2 δ 2	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 2		8.61
	Cac			
na2d3	Cava2 δ 3	calcium channel, voltage dependent, alpha2/delta subunit 3		22.75
	Cac			
nb1	Cav β 1	calcium channel, voltage-dependent, beta 1 subunit		-11.63
	Cac			
nb2	Cav β 2	calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit		-10.49
	Cac			
nb3	Cav β 3	calcium channel, voltage-dependent, beta 3 subunit		-16.25
	Cac			
ng7	Cav δ 7	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 7		15.21
	Cal			
m1	Calm1	calmodulin 1		-4.98
	Clc			
n2	CIC-2	chloride channel 2		-2.97
	Clc			
n3	CIC-3	chloride channel 3		11.62
	Cnn			
1	Calponin 1	calponin 1		-2.59
	Col	α 1 Procoll-		
1a1	1	procollagen, type I, alpha 1		5.50
	Gja			
1	Cx43	gap junction membrane channel protein alpha 1		-9.59
	Gja			
4	Cx37	gap junction membrane channel protein alpha 4		3.89
	Gja			
5	Cx40	gap junction membrane channel protein alpha 5		0.47
	Hcn			
1	Hcn1	hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated K+ 1		-14.68
	Hcn			
2	Hcn2	hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated K+ 2		23.77
	Itpr			
2	IP3R-2	inositol 1,4,5-triphosphate receptor 2		0.70
	Kcn			
a1	Kv1.1	voltage-gated K channel, shaker-related subfamily, member 1		21.50
	Kcn			
a2	Kv1.2	voltage-gated K channel, shaker-related subfamily, member 2		26.16
	Kcn			
a4	Kv1.4	voltage-gated K channel, shaker-related subfamily, member 4		-13.81
	Kcn			
a5	Kv1.5	voltage-gated K channel, shaker-related subfamily, member 5		-3.28
	Kcn			
a6	Kv1.6	voltage-gated K channel, shaker-related, subfamily, member 6		-5.79

	Kcn			
b1	Kv2.1	voltage gated K channel, Shab-related subfamily, member 1		1.24
	Kcn			
d2	Kv4.2	voltage-gated K channel, Shal-related family, member 2		2.71
	Kcn			
d3	Kv4.3	voltage-gated K channel, Shal-related family, member 3		24.94
	Kcn			
h2	mERG	voltage-gated K channel, subfamily H (eag-related), member 2		-7.64
	Kcn			
ip2	KChIP2	Kv channel-interacting protein 2		-3.44
	Kcn			
j11	Kir6.2	potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 11		2.76
	Kcn			
j12	Kir2.2	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 12		7.29
	Kcn			
j2	Kir2.1	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2		8.94
	Kcn			
j3	Kir3.1	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3		18.34
	Kcn			
j8	Kir6.1	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8		2.60
	Kcn			
k3	TASK	potassium channel, subfamily K, member 3		-13.36
	Kcn			
n1	SK1	ca-activated K channel, subfamily N, member 1		6.60
	Kcn			
n2	SK2	ca-activated K channel, subfamily N, member 2		-11.05
	Kcn			
n3	SK3	ca-activated K channel, subfamily N, member 3		31.12
	Kcn			
q1	KvLQT1	potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 1		-5.58
	My			
h7	β MHC	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta		4.60
	Myl			
2	MLC2V	myosin, light polypeptide 2, regulatory, cardiac, slow		20.67
	Myl			
4	MLC1A	myosin, light polypeptide 4		-11.31
	Ned			
d4l	Nedd4-2	neural precursor cell expressed, dev down-regulated gene 4-like		-2.50
	Nkx			
2-5	Nkx2.5	NK2 transcription factor related, locus 5 (Drosophila)		-8.59
	Npp			
b	BNP	natriuretic peptide precursor type B		-46.38
	Pia			
s3	KChAP	protein inhibitor of activated STAT 3		-0.21
	Pln			
	PLB	phospholamban		0.79

	Ryr			
2		RYR2	ryanodine receptor 2, cardiac	5.65
	Scn			
1b		Navβ1	sodium channel, voltage-gated, type I, beta polypeptide	-7.10
	Scn			
4a		Nav1.4	sodium channel, voltage-gated, type IV, alpha polypeptide	-10.16
	Scn			
5a		Nav1.5	sodium channel, voltage-gated, type V, alpha polypeptide	-13.04
	Scn			
7a		Nav2.1	sodium channel, voltage-gated, type VI, alpha polypeptide	3.22
	Slc			
8a1		NCX1	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1	25.33
	Tbx			
2		T-box 2	T-box 2	2.72
	Tbx			
3		T-box 3	T-box 3	28.64
	Tbx			
5		T-box 5	T-box 5	-4.06
	Tnn	sk troponin		
i1	I		troponin I, skeletal, slow 1	35.60
	Tnn	card		
i3		troponin I	troponin I, cardiac	24.29
	Uch			
l1		UCHL1	ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1	-3.22

II.1.2- Etude #1b : Identification de nouvelles mutations du gène *ANK2*

II.1.2.1- Article 2 : Objectifs

Le gène *ANK2* a été initialement impliqué dans le syndrome du QT long congénital de type 4 et la mort subite cardiaque par notre équipe à partir d'une famille française (mutation E1425G, [Mohler *et al.*, 2003]). Cette découverte a ouvert de nouvelles perspectives puisqu'il code pour une protéine d'ancrage, non canalaire, l'ankyrine-B, alors que les gènes précédemment décrits dans les arythmies cardiaques codaient tous pour des canaux ioniques. Un premier criblage d'une grande cohorte de patients présentant diverses arythmies cardiaques avait permis d'élargir le spectre phénotypique des mutations du gène *ANK2*, définissant le « syndrome ankyrine-B » (mutations L1622I, T1626N, R1788W, E1813K, [Mohler *et al.*, 2004d]). Ces mutations sont regroupées dans la partie C-terminale de la protéine et en particulier dans le domaine régulateur spécifique à l'ankyrine-B.

Pour identifier de nouvelles mutations et améliorer nos connaissances sur la fréquence des variants *ANK2* et son implication éventuelle dans d'autres troubles du rythme cardiaque, j'ai criblé cette région chez des patients français présentant des types d'arythmies variés. Parmi ces 282 patients criblés au laboratoire de recherche à Nantes, 94 ont été pris en charge par le CHU de Nantes (47 SBr, 42 SQTL non mutés, 5 mort subite du nourrisson), et 188 par l'hôpital parisien Lariboisière (77 SBr, 36 SQTL, 5 FA, 11 SQTL acquis, 20 TVC, 3 TVC/FV, 1 TVC/SQTL, 1 TVC/TdP, 4 TdP, 1 Andersen, 2 DAVD, 3 BAV, 24 arythmies non définies).

Chez ces 282 patients, les exons 35 à 46, ainsi que les nouveaux exons de la partie C-terminale, 43bis, 45bis, 45ter et 46bis (paragraphe II.1.1.3.1, page 65, Figure 18, page 66) ont été analysés par DHPLC puis séquençage des variants (principe et protocole en annexe F-II.2.2, page 201, Figure 47). D'autre part, 163 patients américains présentant diverses arythmies ont été analysés pour les exons 35 à 46.

J'ai également criblé les exons 13 à 23 (domaine N-terminal de liaison à la membrane, Figure 18, page 66) chez les 47 patients SBr suivis au CHU de Nantes inclus dans le projet. Cette région correspond au site d'interaction de l'ankyrine-G avec $\text{Na}_v1.5$ (*SCN5A*) qui est impliquée dans plusieurs arythmies cardiaques dont le SBr. D'ailleurs, une mutation du gène *SCN5A* empêche l'interaction avec l'ankyrine-G et est responsable d'un SBr [Mohler *et al.*, 2004c]. Même s'il n'a pas été démontré à ce jour que l'ankyrine-B a une interaction directe avec $\text{Na}_v1.5$, l'identité est forte entre ce domaine de liaison à la membrane des ankyrines B et G.

Les exons 1 à 46 (à l'exception de l'exon 38) ont été criblés dans un panel de 190 individus contrôles (panel Coriell), *a priori* sains, issus de quatre ethnies, pour évaluer la fréquence des variants *ANK2* dans la population générale.

La seconde partie du projet qui avait pour objectif d'expliquer la variété des phénotypes observés chez les patients en étudiant plus précisément l'activité des variants « perte de fonction » dans les cardiomyocytes a été menée par Peter Mohler (Vanderbilt University, Nashville, Tennessee ; University of Iowa, Etats-Unis).

Les résultats de ce projet ont fait l'objet d'un article paru dans la revue *Circulation* (**Article 2, page 109**) précédé d'un éditorial de Gordon Tomaselli « *A failure to adapt : Ankyrins in congenital and acquired arrhythmias* » [Tomaselli, 2007].

II.1.2.2- Article 2 : Résultats

Aucune mutation n'a été identifiée dans les exons 13 à 23 chez les 47 patients SBr, et l'article est restreint aux résultats concernant le criblage des exons répertoriés dans les bases de données de la partie C-terminale du gène *ANK2* (exons 35 à 46) pour les 445 propositus atteints (282 français, 163 américains) et les 190 contrôles. La liste des polymorphismes identifiés chez les 282 patients français est regroupée dans le Tableau 20 (page 214). En particulier, des variants non-synonymes ont été mis en évidence dans les nouveaux exons. Leur effet sera à déterminer dès lors que le rôle fonctionnel de ces nouveaux exons sera démontré.

Sept nouveaux variants faux-sens ont été identifiés chez l'ensemble des cas index étudiés (contrôles et patients). Parmi ces sept nouveaux variants, quatre ont un effet « perte de fonction » puisqu'ils ne restaurent pas le phénotype sauvage des cardiomyocytes de souris *AnkB^{+/-}* par complémentation lorsqu'ils sont présents dans l'ADNc transfecté (mutations T1404I, V1516D, T1552N, V1777M). Les mutations T1552N (2/190) et V1777M (1/190) ont été identifiées chez les individus contrôles, et les mutations T1404I (1/445) et V1516D (4/445) chez les patients. En plus des 5 mutations précédemment connues, le nombre de mutations « perte de fonction » du gène *ANK2* est donc porté à neuf.

Ces nouvelles mutations sont associées à des phénotypes variés chez les patients, et élargissent encore le spectre phénotypique du « syndrome ankyrine-B ».

Quels sont les mécanismes cellulaires à l'origine de la variabilité des phénotypes observés chez les porteurs de mutations *ANK2*, allant de l'absence de phénotype à la mort subite ? Pour répondre à cette question et déterminer s'il existe un spectre de sévérité *in*

in vitro de ces mutations, les 9 variants « perte de fonction » identifiés précédemment et par ce projet ont été ré-exprimés dans des cardiomyocytes néonataux de souris sauvages. Les caractéristiques analysées ont été les suivantes : le taux de contraction spontanée des cardiomyocytes, le taux de relargage du Ca^{2+} , la localisation et l'expression protéique de partenaires de l'ankyrine-B (récepteur à l'InsP(3), Na/K ATPase, échangeur Na/Ca). Les résultats démontrent un spectre des défauts fonctionnels *in vitro* de la protéine mutée dans les cardiomyocytes sauvages, allant de l'absence d'effet (T1404I, T1552N, V1777M, E1813K), à une dysfonction mineure (L1622I, T1626N), jusqu'à un effet sévère (E1425G, V1516D, R1788W). Les variants à effet sévère n'ont pas été trouvés dans le panel d'individus contrôles, et semblent associés à des phénotypes plus marqués chez les patients. En particulier, la mutation E1425G était la première mutation identifiée dans la famille française de SQTL4.

Article 2

Defining the cellular phenotype of “Ankyrin-B syndrome” variants: human *ANK2* variants associated with clinical phenotypes display a spectrum of activities in cardiomyocytes

Peter J. Mohler¹, Solena Le Scouarnec², Isabelle Denjoy^{3,4}, John S. Lowe¹, Pascale Guicheney^{3,5}, Lise Caron², Iwona M. Driskell¹, Jean-Jacques Schott², Kris Norris⁶, Antoine Leenhardt⁴, Richard B. Kim⁶, Denis Escande², Dan M. Roden⁶

Circulation (2007), 115:432-441

¹Department of Internal Medicine, University of Iowa College of Medicine, Iowa City, Etats-Unis

²Inserm U533, l'institut du thorax, Nantes, France

³Inserm U582, Institut de myologie, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France

⁴AP-HP, Service de cardiologie, Hôpital Lariboisière, Université Denis Diderot, Paris, France

⁵Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

⁶Departments of Medicine and Pharmacology and Oates Institute for Experimental Therapeutics, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee, Etats-Unis

Defining the Cellular Phenotype of “Ankyrin-B Syndrome” Variants

Human *ANK2* Variants Associated With Clinical Phenotypes Display a Spectrum of Activities in Cardiomyocytes

Peter J. Mohler, PhD; Solena Le Scouarnec, MS; Isabelle Denjoy, MD; John S. Lowe, BS;
Pascale Guicheney, PhD; Lise Caron, PhD; Iwona M. Driskell, MS;
Jean-Jacques Schott, PhD; Kris Norris, RN; Antoine Leenhardt, MD; Richard B. Kim, MD;
Denis Escande, MD, PhD; Dan M. Roden, MD

Background—Mutations in the ankyrin-B gene (*ANK2*) cause type 4 long-QT syndrome and have been described in kindreds with other arrhythmias. The frequency of *ANK2* variants in large populations and molecular mechanisms underlying the variability in the clinical phenotypes are not established. More importantly, there is no cellular explanation for the range of severity of cardiac phenotypes associated with specific *ANK2* variants.

Methods and Results—We performed a comprehensive screen of *ANK2* in populations (control, congenital arrhythmia, drug-induced long-QT syndrome) of different ethnicities to discover unidentified *ANK2* variants. We identified 7 novel nonsynonymous *ANK2* variants; 4 displayed abnormal activity in cardiomyocytes. Including the 4 new variants, 9 human *ANK2* loss-of-function variants have been identified. However, the clinical phenotypes associated with these variants vary strikingly, from no obvious phenotype to manifest long-QT syndrome and sudden death, suggesting that mutants confer a spectrum of cellular phenotypes. We then characterized the relative severity of loss-of-function properties of all 9 nonsynonymous *ANK2* variants identified to date in primary cardiomyocytes and identified a range of in vitro phenotypes, including wild-type, simple loss-of-function, and severe loss-of-function activity, seen with the variants causing severe human phenotypes.

Conclusions—We present the first description of differences in cellular phenotypes conferred by specific *ANK2* variants. We propose that the various degrees of ankyrin-B loss of function contribute to the range of severity of cardiac dysfunction. These data identify *ANK2* variants as modulators of human arrhythmias, provide the first insight into the clinical spectrum of “ankyrim-B syndrome,” and reinforce the role of ankyrin-B-dependent protein interactions in regulating cardiac electrogenesis. (*Circulation*. 2007;115:432-441.)

Key Words: arrhythmia ■ calcium ■ cell biology ■ cytoskeleton ■ genetics ■ ion channels

Cardiac contraction events are tightly controlled by the coordinate activities of a large collection of ion channels and transporters. Proper physiological function of each cardiac ion channel and transporter is strictly governed by defined biophysical properties and precise expression and localization within appropriate excitable membrane domains. Over the past 10 years, many of the molecular components responsible for regulating the biophysical properties of cardiac ion channels and transporters have been identified.¹⁻³ This information has been critical for defining a number of fatal arrhythmias based on gene variants that affect the

function of ion channels (or channel subunits) that control ventricular depolarization and repolarization.^{1,4}

Editorial p 428 Clinical Perspective p 441

Ankyrins localize ion channels and transporters at specialized membrane domains in excitable and nonexcitable cells.^{5,6} Dysfunction in ankyrin-B is linked with fatal arrhythmia in humans.^{7,8} The *ANK2* A4274G variant leading to E1425G causes the type 4 form of the congenital long-QT syndrome (LQTS).⁹ Affected individuals display QT interval

Received August 3, 2006; accepted November 6, 2006.

From the Department of Internal Medicine (P.J.M., J.S.L., I.M.D.), University of Iowa College of Medicine, Iowa City; Departments of Medicine and Pharmacology and Oates Institute for Experimental Therapeutics (K.N., R.B.K., D.M.R.), Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tenn; INSERM U533 (S.L.S., L.C., J.-J.S., D.E.), L'institut du Thorax, Nantes, France; INSERM U582 (I.D., P.G.), Institut de Myologie, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France; AP-HP (I.D., A.L.); Service de Cardiologie, Hôpital Lariboisière, Université Denis Diderot, Paris, France; and Université Pierre et Marie Curie-Paris (P.G.), Paris, France.

Guest Editor for this article was Douglas P. Zipes, MD.

Correspondence to Peter Mohler, 285 Newton Rd, CBRB 2283, Iowa City, IA 52242. E-mail peter-mohler@uiowa.edu

© 2007 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at <http://www.circulationaha.org>

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.656512

prolongation, stress- and/or exercise-induced polymorphic ventricular arrhythmia, syncope, and sudden cardiac death. Individuals heterozygous for ankyrin-B E1425G also have sinus node dysfunction (bradycardia or junctional escape rhythm) and episodes of atrial fibrillation.^{8,9} In primary cardiomyocytes, E1425G leads to loss of ankyrin-B function.⁸ Subsequent evaluation of additional probands heterozygous for ankyrin-B E1425G and identification and characterization of the phenotypes of probands with other ankyrin-B loss-of-function variants (L1622I, T1626N, R1788W, E1813K) demonstrated that the clinical phenotypes often extend beyond the typical LQTS, leading to the label “ankyrin-B syndrome”; these phenotypes include bradycardia, sinus arrhythmia, delayed conduction/conduction block, idiopathic ventricular fibrillation, and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia.⁷ To date, no biophysical mechanism has been offered for the range of severity of cardiac phenotypes associated with different *ANK2* variants.

Here, we report 4 novel *ANK2* loss-of-function variants in individuals with a variety of cardiac phenotypes. Moreover, we identify for the first time a spectrum of in vitro functional defects conferred by these and previously identified variants from wild-type to severe loss-of-function activity. Interestingly, carriers of *ANK2* variants that display severe loss-of-function activity in cardiomyocytes display the most severe clinical phenotypes. These data confirm *ANK2* variants as modulators for human arrhythmias, provide a mechanism for the clinical spectrum of the ankyrin-B syndrome, and reinforce the role of protein interactions involving ankyrin-B in regulating normal cardiac electrogenesis.

Methods

Genotyping and DNA Analysis

Published primers designed to amplify individual exons and flanking introns were used, and polymerase chain reactions were optimized.⁸ Polymerase chain reaction products were screened for variants with the SpectruMedix Reveal temperature gradient capillary electrophoresis system, and fragments containing variants were then directly resequenced. Exons 1 through 46 of *ANK2* (except for brain-specific exon 38) were screened in the Coriell human variation panels, and exons 35 through 46 (excluding exon 38) were screened in the patient panel. The congenital arrhythmia syndrome panel included patients with LQTS and other entities such as idiopathic ventricular fibrillation or drug-induced LQTS. Drug-induced LQTS was defined as previously reported.¹⁰ The anonymized samples screened, obtained from the North American Human Variation Panels at Coriell, included the following panels: black (NA17149 through NA17199), white (NA17249 through NA17296), Han People of Los Angeles (NA17733 through NA17791), and Mexican American Community of Los Angeles (NA17438 through NA17467, NA17614 through NA17642). Specifically, we used AA NA17149 through NA17161, NA17163, and NA17165 through NA17199; Cau NA17249 through NA17296 and NA17298; Mexican NA17438 through NA17446, NA17448 through NA17454, NA17456 through NA17463, NA17465 through NA17467, NA17614 through NA17419, NA17622, NA17624, NA17626, NA17629 through NA17634, NA17636 through NA17637, and NA17639 through NA17642; and HAN NA17733 through NA17747, NA17749, NA17752 through NA17759, NA17761 through NA17762, NA17764 through NA17771, NA17773 through NA17776, NA17779, NA17780, NA17782, NA17783, NA17785, NA17787, and NA17789 through NA17791. All genetic information generated in these studies has been deposited in the PharmGKB database at www.pharmgkb.org.

Cardiomyocytes

Animal care was in accordance with institutional guidelines. Neonatal cardiomyocytes were isolated and transfected from wild-type and ankyrin-B^{+/-} postnatal day 1 mice (backcrossed >17 generations on pure C57/Bl6 background).⁸ After cDNA expression, we measured spontaneous contraction rates and/or Ca⁺² diastolic/systolic peak intensity ratios as a function of time.⁸ For each variant, we analyzed >50 green fluorescent protein (GFP)-positive cells from >3 preparations. Relative levels of GFP-ankyrin-B expression were carefully monitored by immunoblot and immunostaining in each expression experiment to ensure that cellular phenotypes were the result of variant activity and not differences in expression levels.

Immunoblots

Whole-cell lysates from wild-type, ankyrin-B^{+/-}, and ankyrin-B^{-/-} cells transfected with 220-kDa ankyrin-B-GFP variants were prepared, and 50 μg lysate was analyzed by SDS-PAGE and immunoblot.

Reagents

Antibodies used for experiments include affinity-purified antibodies to ankyrin-B, GFP (monoclonal and polyclonal), InsP₃ receptor (Affinity Bioreagents, Golden, Colo, and affinity-purified pan InsP₃ receptor Ig), Na/Ca exchanger 1 (RDI), α-actinin (Sigma), and Na/K ATPase (Affinity Bioreagents).

Immunofluorescence

Neonatal cardiomyocytes were washed with warm phosphate-buffered saline (pH 7.4) and fixed in 2% paraformaldehyde (37°C). Cells were blocked/permeabilized in PBS containing 0.075% Triton X-100 and 3% fish oil gelatin (Sigma) and incubated in primary antibody overnight at 4°C. After they were washed (phosphate-buffered saline plus 0.075% Triton X-100), cells were incubated in secondary antibody (goat anti-mouse, goat anti-rabbit Alexa 488 or 568, Molecular Probes, Carlsbad, Calif) for 8 hours at 4°C and mounted with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, Calif) and No. 1 coverslips. Images were collected on a Zeiss 510 Meta confocal microscope (40 power oil 1.4 NA [Zeiss, Thornwood, NY] or 63 power oil 1.4 NA [Zeiss]; pinhole equals 1.0 Airy Disc) with Carl Zeiss Imaging software. All channels were collected on PMT3. Images were imported into Adobe Photoshop for cropping and linear contrast adjustment. Our cellular protocol is optimized to express only minimal levels of ankyrin-B-GFP to avoid any potential artifacts caused by overexpression. Note that unlike the adult cardiomyocyte, the neonatal cardiomyocyte does not display an organized transverse-tubule network. Therefore, Na/Ca exchanger 1 localization is primarily at the plasma membrane. Additionally, unlike the adult myocyte (primarily perinuclear), the InsP₃ receptor in the differentiated neonatal cardiomyocyte is generally spread across the sarcoplasmic reticulum network.

cDNA Mutagenesis

We introduced single-amino-acid changes to full-length 220-kDa ankyrin-B-GFP (C-terminal enhanced green fluorescent protein fusion) with Quickchange mutagenesis (Stratagene, Garden Grove, Calif) to produce T1404I, G1406C, R1450W, L1503V, V1516D, T1552N, and V1777M. Once the mutation was confirmed by sequencing, a small fragment containing the desired mutation was subcloned into a parental plasmid to ensure that no additional variants were introduced into the parental plasmid by the mutagenesis polymerase chain reaction protocol (≈11 kb). Immunoblots were performed on transfected HEK293 cells to ensure that variant constructs produced full-length proteins.

Statistical Analysis

When appropriate, data were analyzed by use of a 2-tailed Student *t* test. Values of *P* < 0.05 were considered significant. Values are expressed as mean ± SD.

The authors had full access to and take full responsibility for the integrity of the data. All authors have read and agree to the manuscript as written.

TABLE 1. Clinical Features of Probands With Cardiac Dysfunction and Heterozygous for *ANK2* Loss-of-Function Variants

Nucleotide Change	Residue Change	AnkB Domain	Mutation Type	Clinical Phenotype	Eth	Freq
4211-12	T1404I	SBD	CG-TA	Bradycardia, AF, drug-induced TdP, LQTS	B	1/445
T4547A	V1516D	Death	Missense	AF, drug-induced LQTS	W	4/445
T4547A	V1516D	Death	Missense	Exercise-induced VT	W	4/445
T4547A	V1516D	Death	Missense	Bradycardia, exercise-induced VT, syncope, AF	W	4/445
T4547A	V1516D	Death	Missense	Brugada syndrome, CPVT	W	4/445
G5437A	E1813K	CTD	Missense	AF, drug-induced LQTS, TdP	W	2/445
G5437A	E1813K	CTD	Missense	AF, drug-induced LQTS, syncope	W	2/445

Ank indicates ankyrin; Eth, ethnicity; Freq, frequency; SBD, spectrin-binding domain; AF, atrial fibrillation; B, black; W, white; TdP, torsades de pointes; VT, ventricular tachycardia; CPVT, catecholaminergic polymorphic VT; and CTD, C-terminal domain.

Results

Identification of *ANK2* Variants in Humans With Cardiac Dysfunction

We screened exons 35 through 46 and flanking intronic regions of *ANK2* in 445 individuals with congenital arrhythmia (including LQTS and other entities such as idiopathic ventricular fibrillation) or drug-induced LQTS for potential *ANK2* variants. In all subjects, screening the coding regions of the disease-associated genes *KCNQ1*, *KCNH2*, *KCNE1*, *KCNE2*, and *SCN5A* did not yield mutations. We identified 8 variants in *ANK2*: 3 coding region changes that resulted in amino acid substitutions, 2 variants that did not result in amino acid substitutions, and 3 changes to intronic regions.

The transition from 4211 to 4212CG-TA (T1404I; Table 1) was identified in a 54-year-old male black proband with bradycardia, atrial fibrillation, and quinidine-induced LQTS (>630 ms). The T4547A transition (resulting in V1516D) was identified in 4 probands: 1 with drug-induced LQTS and 3 with congenital arrhythmia (Table 1). The first was a 50-year-old white woman who developed QTc prolongation (>700 ms) and multiple episodes of polymorphic ventricular tachycardia torsades de pointes after quinidine treatment for atrial fibrillation. The second was a 19-year-old white man who presented with cardiac arrest while dancing. He subsequently had episodes of polymorphic ventricular tachycardia, with a normal QTc (417 ms) and T-wave morphology while in sinus rhythm. There was a family history of sudden cardiac death. The third proband was a 27-year-old white man who presented with syncope during a soccer match and an ECG showing ventricular tachycardia at 280 bpm. He also had bradycardia, a QTc of 460 ms, and a history of palpitations

after stress. He developed atrial flutter after a stress test and was successfully treated with flecainide. There was no history of sudden cardiac death. The fourth V1516D proband was a 33-year-old white man resuscitated from cardiac arrest while driving. His ECG showed a typical (type 1) pattern of Brugada syndrome.¹¹ An ajmaline infusion during cardiac electrophysiological testing was followed by sustained ventricular tachycardia requiring cardioversion. There was a family history of sudden cardiac death.

The G5437A single nucleotide polymorphism (leading to E1813K) was identified in 2 probands with atrial fibrillation, and both developed ventricular arrhythmias during drug treatment (Table 1). The first was a 79-year-old white woman who developed a long QTc (670 ms) and torsades de pointes during procainamide treatment. The second was a 34-year-old white woman who developed a long QTc (>600 ms) and syncope during treatment with quinidine. This specific variant had been identified in a previous *ANK2* screen of probands with arrhythmia phenotypes.⁷

Identification of *ANK2* Variants in Panels of Defined Ethnicity Asymptomatic Humans

We screened all exons and flanking intronic regions of *ANK2* in 190 anonymized subjects of 4 defined ethnicities (Han Chinese, black, white, and Mexican American) to define other *ANK2* variants. We identified 7 subjects with 6 different *ANK2* nonsynonymous single nucleotide changes (Table 2). These variants were G4216T (G1406C; 1 Mexican American), C4348T (R1450W; 1 white), C4507G (L1503V; 1 black), C4655A (T1552N; 2 blacks), G5329A (V1777M; 1 Han Chinese), and G5437A (E1813K; 1 white; Table 2). In

TABLE 2. Features of Probands Heterozygous for *ANK2* Loss-of-Function Variants

Nucleotide Change	Residue Change	AnkB Domain	Mutation Type	Clinical Phenotype	Eth	Freq
G4216T	G1406C	SBD	Missense	Unknown*	MA	1/190
C4348T	R1450W	Death	Missense	Unknown*	W	1/190
C4507G	L1503V	Death	Missense	Unknown*	B	1/190
C4655A	T1552N	CT	Missense	Unknown*	B	2/190
G5329A	V1777M	CT	Missense	Unknown*	HC	1/190
G5437A	E1813K	CT	Missense	Unknown*	W	1/190

MA indicates Mexican American; HC, Han Chinese. Other abbreviations as in Table 1.

*Because samples were anonymized, specific clinical phenotypes are not available.

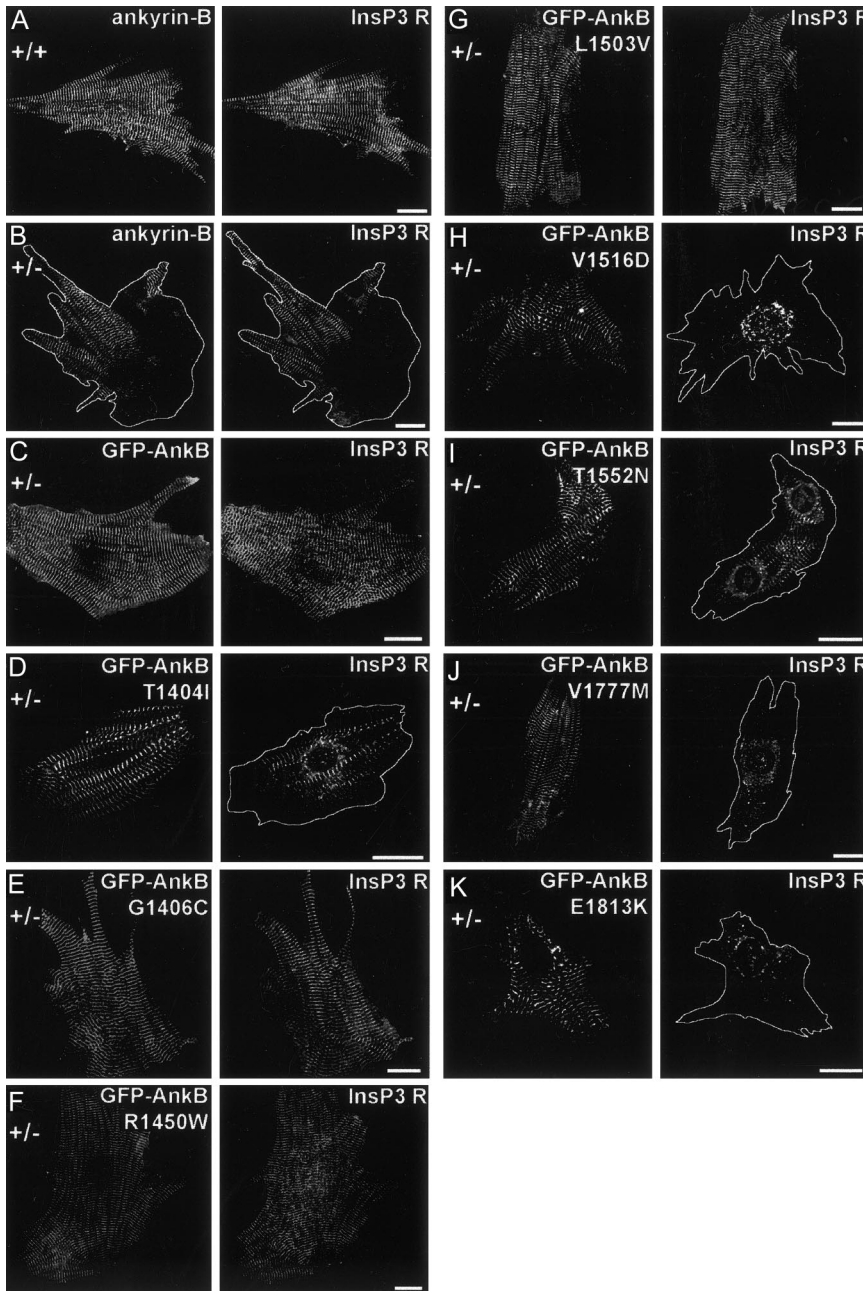


Figure 1. Human ANK2 variants T1404I, V1516D, T1552N, V1777M, and E1813K display ankyrin-B loss-of-function activity in cardiomyocytes. A, Immunolocalization of endogenous ankyrin-B (left) and InsP₃ receptor (right) in wild-type neonatal cardiomyocytes. B, Immunolocalization of ankyrin-B (left) and InsP₃ receptor (right) in ankyrin-B^{-/-} neonatal mouse cardiomyocytes. Reduction in ankyrin-B levels leads to loss of InsP₃ receptor expression and organization (compare InsP₃ receptor staining in A and B). C, Abnormal localization of InsP₃ receptor in ankyrin-B^{+/-} cardiomyocytes is rescued by expression of ankyrin-B-GFP. Ankyrin-B-GFP was immunolocalized using GFP antibody. D–K, Human ankyrin-B variants T1404I, V1516D, T1552N, V1777M, and E1813K are ankyrin-B loss-of-function variants in cardiomyocytes. In contrast, ankyrin-B variants G1406C, R1450W, and L1503V rescue abnormal InsP₃ receptor localization in ankyrin-B^{+/-} neonatal cardiomyocytes. For all images, scale bar=20 μm. In B, D, and H through K, the perimeter of the cardiomyocyte is outlined in white to assist in observing the severity of abnormal ankyrin and/or InsP₃ receptor localization.

addition, the screen identified 11 synonymous coding single nucleotide polymorphisms, 17 intronic single nucleotide polymorphisms, 1 intronic deletion, and 1 intronic insertion that are not considered further here. Therefore, ANK2 variants are present in the normal population from multiple ethnic groups.

Human ANK2 Variants Display Ankyrin-B Loss-of-Function Activity

Unlike wild-type mouse cardiomyocytes, ankyrin-B^{+/-} and ankyrin-B^{-/-} neonatal cardiomyocytes display reduced frequency of spontaneous contractions, abnormal spatial/temporal patterns of cytoplasmic Ca²⁺ release,^{8,12} and aberrant localization and expression of multiple cardiac ion channels

and transporters, including Na/Ca exchanger 1, Na/K AT-Pase, and InsP₃ receptor (Figure 1A and 1B).^{8,12} Normal neonatal cardiomyocyte properties are restored in ankyrin-B^{+/-} and ankyrin-B^{-/-} neonatal cardiomyocytes transfected with ankyrin-B (220-kDa ankyrin-B; Figure 1C).^{6–8,12–15} Previously characterized ankyrin-B variants E1425G, L1622I, T1626N, R1788W, and E1813K display normal ankyrin-B expression and localization when transfected into ankyrin-B^{+/-} and ankyrin-B^{-/-} neonatal cardiomyocytes.^{7,8} However, these variants do not restore normal contraction rates, spatial/temporal patterns of Ca²⁺ release, or ion channel and transporter expression and localization in ankyrin-B^{+/-} and ankyrin-B^{-/-} neonatal cardiomyocytes,^{7,8} demonstrating that they confer an “altered function” phenotype. Accord-

TABLE 3. Summary of Clinical and Cellular Phenotypes Identified for Human *ANK2* Variants

Ankyrin-B Variant	Human Panel	Degree of <i>ANK2</i> Variant Dysfunction in Cardiomyocytes
G1406C	Control	Similar to WT AnkB
R1450W	Control	Similar to WT AnkB
L1503V	Control	Similar to WT AnkB
T1552N	Control	Negligible loss of function
V1777M	Control	Negligible loss of function
E1813K	Control, ALQT	Negligible loss of function
R1404I	ALQT	Negligible loss of function
L1622I	Control, congenital arrhythmia	Minor loss of function
T1626N	Control, congenital arrhythmia	Minor loss of function
E1425G	Congenital arrhythmia	Severe loss of function
V1516D	Congenital arrhythmia	Severe loss of function
R1788W	Congenital arrhythmia	Severe loss of function

WT indicates wild type.

ingly, we used this ankyrin-B^{+/-} neonatal cardiomyocyte rescue assay to evaluate new human variants for altered ankyrin-B function.

Three newly identified variants, ankyrin-B G1406C, R1450W, and L1503V, displayed properties similar to wild-

type ankyrin-B. Similar to ankyrin-B-GFP, GFP-linked constructs of these variants were normally expressed and properly targeted within ankyrin-B^{+/-} neonatal cardiomyocytes (Figure 1, Table 3). Additionally, like ankyrin-B-GFP, these 3 variants rescued abnormal ankyrin-B^{+/-} and ankyrin-B^{-/-} phenotypes, including abnormal contraction rates and aberrant spatial/temporal patterns of cytoplasmic Ca²⁺ release (Figure 2). Moreover, ankyrin-B-GFP G1406C, R1450W, and L1503V variants rescued abnormal localization and expression patterns of InsP₃ receptor (Figure 1), Na/Ca exchanger 1, and Na/K ATPase (not shown).

In contrast, ankyrin-B variants T1404I, V1516D, T1552N, V1777M, and E1813K were ankyrin-B loss-of-function mutations in ankyrin-B^{+/-} neonatal cardiomyocytes. Although none of the variants affected the localization of ankyrin-B-GFP itself (Figure 1), ankyrin-B^{+/-} neonatal cardiomyocytes transfected with ankyrin-B-GFP variants T1404I, V1516D, T1552N, V1777M, and E1813K at equivalent levels displayed abnormal contraction rates and aberrant spatial/temporal patterns of Ca²⁺ release (Figure 2). Additionally, neonatal cardiomyocytes transfected with these variants at similar levels displayed abnormal localization and expression of InsP₃ receptor (Figure 1), Na/Ca exchanger 1, and Na/K ATPase (not shown). Specifically, in ankyrin-B^{+/-} neonatal

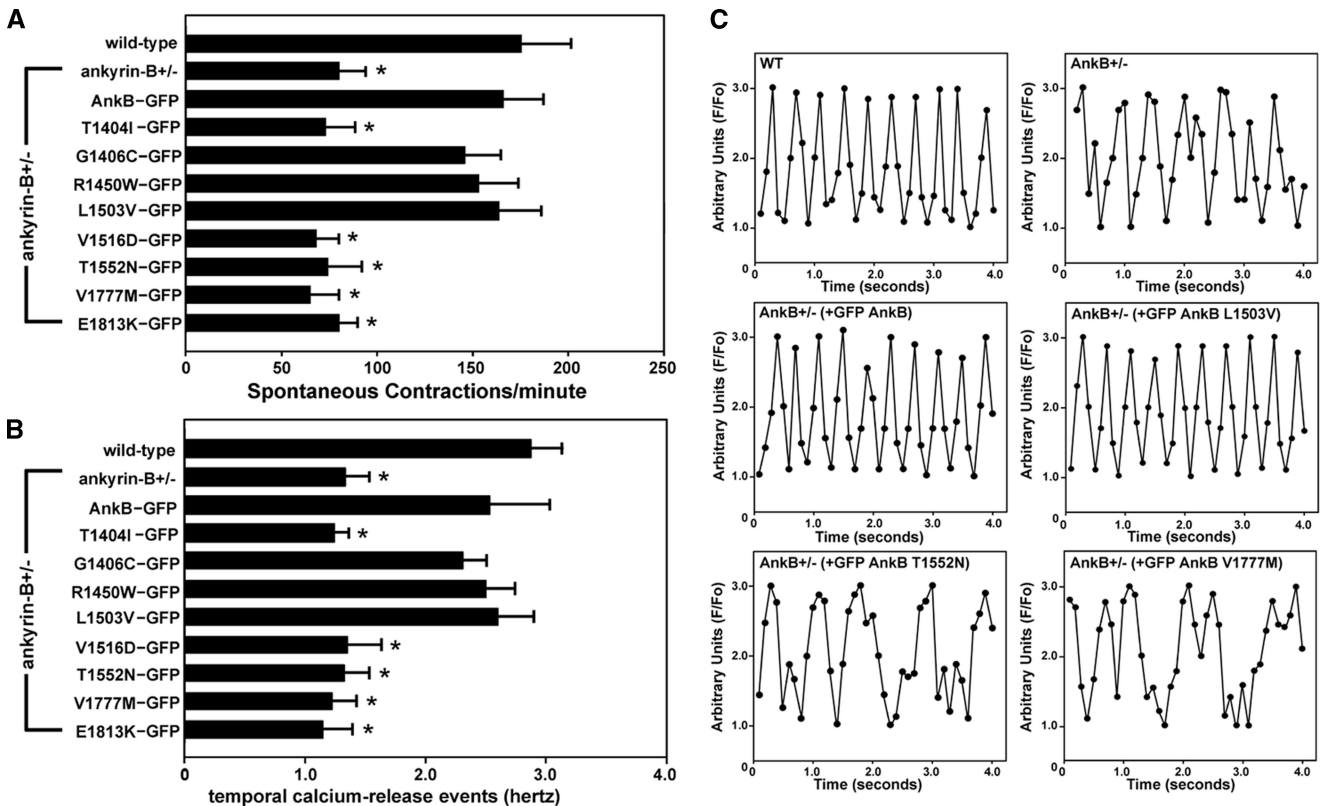


Figure 2. Identification of new ankyrin-B loss-of-function variants. In contrast to wild-type mouse neonatal cardiomyocytes, cardiomyocytes derived from ankyrin-B^{+/-} mice display (A) decreased rates of spontaneous contraction and (B) aberrant spatial and temporal patterns of cytoplasmic Ca²⁺ release. Abnormal ankyrin-B^{+/-} cardiomyocyte contraction rates and aberrant spatial and temporal patterns of cytoplasmic Ca²⁺ release were rescued by expression of ankyrin-B-GFP and ankyrin-B-GFP with human variants G1406C, R1450W, and L1503V but not ankyrin-B-GFP variants T1404I, V1516D, T1552N, V1777M, or E1813K ($n > 50$ cells per variant; $P < 0.05$). Spatial and temporal patterns of cytoplasmic Ca²⁺ release were measured over time with Fluo-3AM and are expressed in hertz. C, Raw data of Ca²⁺ levels in cardiomyocytes (F/F₀). Graphs represent nontransfected wild-type and ankyrin-B^{+/-} neonatal cardiomyocytes and GFP-ankyrin-B- and GFP-ankyrin-B variant-transfected ankyrin-B^{+/-} myocytes.

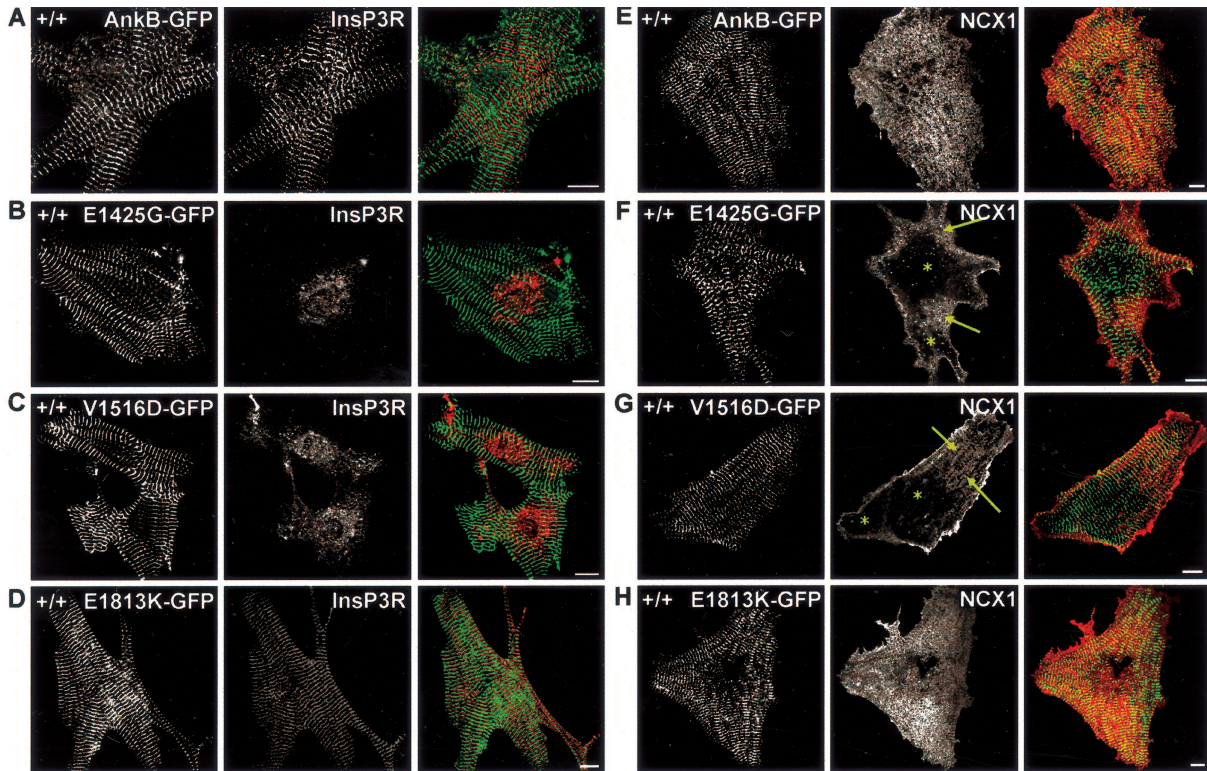


Figure 3. Expression of ankyrin-B loss-of-function variants E1425G, V1516D, and R1788W abolish InsP_3 receptor and Na/Ca exchanger 1 localization in wild-type mouse neonatal cardiomyocytes. Wild-type cardiomyocytes transfected with ankyrin-B-GFP E1425G, V1516D, and R1788W (not shown) display abnormal localization of InsP_3 receptor (B, C) and Na/Ca exchanger 1 (F, G). Merged images are shown on the right. We observed normal localization of InsP_3 receptor and Na/Ca exchanger 1 in wild-type cardiomyocytes transfected with ankyrin-B-GFP and GFP-ankyrin variants T1404I, T1552N, L1622I, T1626N, V1777M (not shown), and E1813K (D, H). All ankyrin-B-GFP loss-of-function variants were normally expressed and localized in wild-type cardiomyocytes. Scale bars = 10 μm . Note that wild-type cardiomyocytes transfected with loss-of-function variants E1425G and V1516D display both reduced expression and abnormal localization of Na/Ca exchanger vs nontransfected wild-type cardiomyocytes (compare wild-type Na/Ca exchanger levels in E with chimeric Na/Ca exchanger 1 expression/localization [denoted by asterisks] in F and G).

cardiomyocytes transfected with T1404I-GFP, V1516D-GFP, T1552N-GFP, V1777M-GFP, and E1813K-GFP, ankyrin-B-associated ion channels and transporters were clustered near the perinuclear region in a pattern resembling the cardiomyocyte Golgi apparatus (Figure 1D and 1H through 1J).¹⁵ Together, these data identify 4 new human ankyrin-B variants that display ankyrin-B loss-of-function activity in cardiomyocytes.

Specific Ankyrin-B Variants Display Severe Loss-of-Function Activity in Cardiomyocytes

To date, 9 different human ankyrin-B variants have been identified that demonstrate loss-of-function activity in ankyrin-B^{+/-} and ankyrin-B^{-/-} neonatal cardiomyocytes.^{7,8} However, the clinical phenotypes associated with these variants vary strikingly, from no obvious phenotype to the manifest LQTS and sudden death. Thus, different individual variants may lead to various degrees of cellular ankyrin-B loss of function that may correlate with a range of severity of cardiac dysfunction.

To determine whether there is a spectrum of in vitro severity of ankyrin-B loss-of-function variants, we expressed ankyrin-B-GFP and all published ankyrin-B loss-of-function variants in wild-type neonatal cardiomyocytes. Wild-type cardiomyocytes were used because we hypothesized that variants

associated with the most severe clinical phenotypes may still display strong loss of function, even in the presence of normal wild-type ankyrin-B activity. As shown in Figure 3, all ankyrin-B variants were normally expressed and targeted in wild-type neonatal cardiomyocytes. Interestingly, ankyrin-B-GFP significantly increased neonatal cardiomyocyte contraction rates compared with nontransfected cells (Figure 4; $\approx 13\%$; $n=50$; $P<0.05$). We observed no difference in contraction rates between nontransfected neonatal cardiomyocytes and wild-type neonatal cardiomyocytes transfected with the ankyrin-B-GFP loss-of-function variants T1404I, T1552N, V1777M, and E1813K (Figure 4; $n > 50$ cells analyzed per mutant; $P=NS$). Wild-type neonatal cardiomyocytes expressing ankyrin-B-GFP L1622I or T1626N displayed a small but significant ($\approx 14\%$) decrease in contraction rates and small but significant differences in spatial/temporal Ca^{2+} release patterns compared with nontransfected cells (Figure 4, $n > 50$ cells per mutant; $P<0.05$). In contrast, wild-type neonatal cardiomyocytes expressing loss-of-function variants E1425G, V1516D, and R1788W displayed pronounced reductions ($>60\%$) in both contraction rates and cytoplasmic calcium release events compared with control neonatal cardiomyocytes ($n > 50$ neonatal cardiomyocytes evaluated for each mutant; $P<0.05$). In fact, contraction rates in these cells were similar to rates in nontransfected ankyrin-

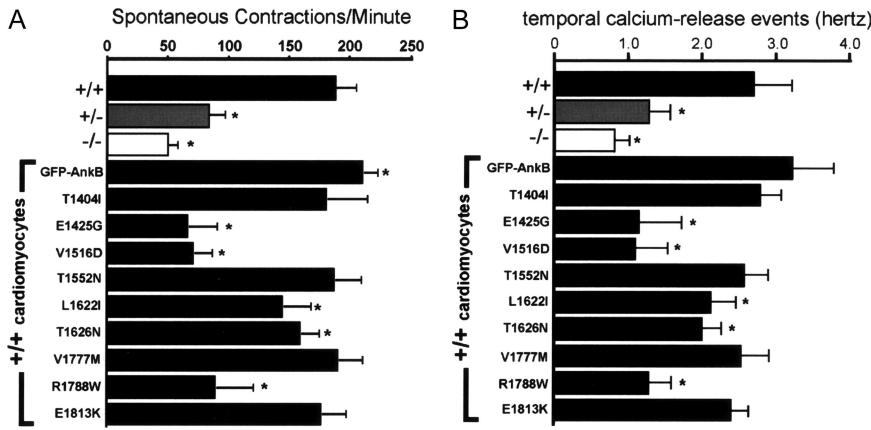


Figure 4. Specific ankyrin-B loss-of-function variants display ankyrin-B severe loss-of-function activity in wild-type cardiomyocytes. Spontaneous contractions (A) and spatial and cytoplasmic calcium release events (B) observed in neonatal cardiomyocytes derived from wild-type, ankyrin-B^{+/-}, and ankyrin-B^{-/-} cardiomyocytes. Bars 4 through 13 represent spontaneous contractions of wild-type cardiomyocytes expressing ankyrin-B-GFP loss-of-function variants. Note the significantly reduced spontaneous contraction rates (A) and reduced calcium release events (B) in wild-type cardiomyocytes transfected with ankyrin-B-GFP loss-of-function variants E1425G, V1516D, and R1788W (n >50 cardiomyocytes; P<0.05).

B^{+/-} or ankyrin-B^{-/-} neonatal cardiomyocytes (Figure 4). All mutants were expressed in cardiomyocytes at equivalent levels as assessed by staining intensity as well as immunoblot (GFP Ig) on transfected cardiomyocyte lysates. Similar to results from previously identified loss-of-function mutants, the loss-of-function phenotypes observed were not due to low transfection efficiencies or abnormal expression levels of ankyrin-B mutants in transfected neonatal cardiomyocytes.^{7,8,12,14}

We next assessed ankyrin-B-associated ion channel and transporter localization in wild-type neonatal cardiomyocytes that expressed ankyrin-B variants with loss-of-function activity (Figure 3). In control cells or cells expressing ankyrin-B-GFP, we observed normal expression and localization of InsP₃ receptor, Na/Ca exchanger 1 (Figure 3), and Na/K ATPase (not shown). We also observed normal expression and localization of ankyrin-B-GFP T1404I, T1552N, L1622I, T1626N, V1777M, and E1813K (Figure 3). In contrast, wild-type neonatal cardiomyocytes expressing ankyrin-B-

GFP E1425G, V1516D, and R1788W displayed abnormal localization/reduced expression of InsP₃ receptor, Na/Ca exchanger 1, and Na/K ATPase. InsP₃ receptor in neonatal cardiomyocytes expressing ankyrin-B-GFP E1425G, V1516D, and R1788W was localized primarily to the perinuclear region, whereas Na/Ca exchanger 1 and Na/K ATPase localization was reduced throughout the myocyte with very little perinuclear staining (Figure 3). Finally, we observed significant reductions in InsP₃ receptor, Na/Ca exchanger 1, and Na/K ATPase expression in wild-type neonatal cardiomyocytes transfected with ankyrin-B E1425G, V1516D, and R1788W mutants compared with control cells or neonatal cardiomyocytes transfected with ankyrin-B mutants T1404I, T1552N, V1777M, or E1813K (Figure 5). We observed a small but significant decrease in InsP₃ receptor, Na/K ATPase, and Na/Ca exchanger 1 expression in wild-type neonatal cardiomyocytes transfected with ankyrin-B mutants L1622I and T1626N (Figure 5; P<0.05; n=3). These data

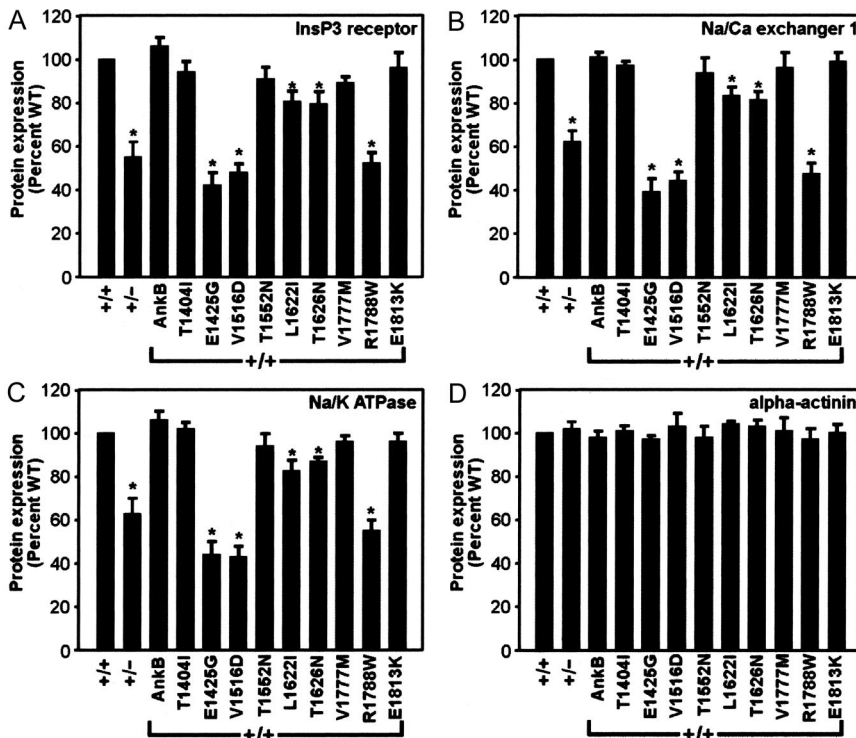


Figure 5. Ankyrin-B loss-of-function variants E1425G, V1516D, and R1788W display ankyrin-B severe loss-of-function activity in wild-type cardiomyocytes. Total cell lysates of wild-type, ankyrin-B^{+/-}, and ankyrin-B^{-/-} cardiomyocytes transfected with ankyrin-B-GFP variants were analyzed by immunoblot using antibodies specific for (A) InsP₃ receptor, (B) Na/Ca exchanger 1, (C) Na/K ATPase, and (D) α-actinin. Ankyrin-B loss-of-function variants E1425G, V1516D, and R1788W dramatically decrease InsP₃ receptor, Na/K ATPase, and Na/Ca exchanger 1 expression levels in wild-type cardiomyocytes. Mean (±SD) protein expression levels (relative to wild-type expression) are shown (n=3; P<0.05).

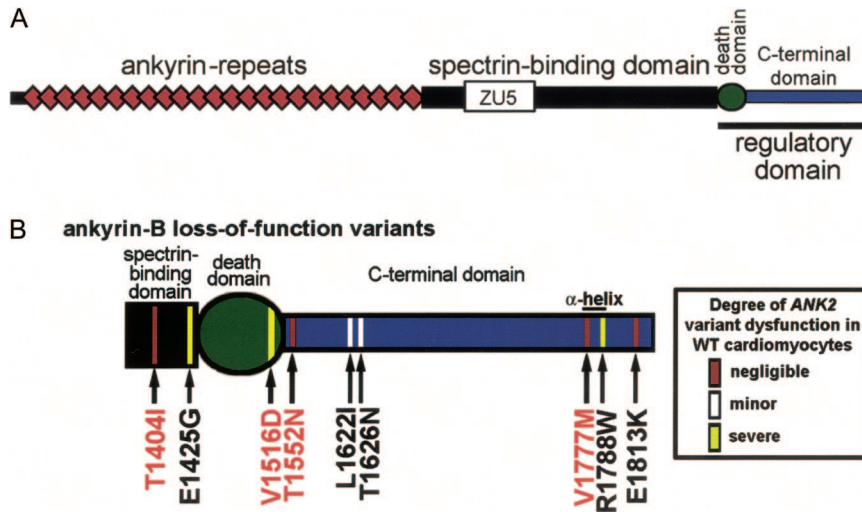


Figure 6. Ankyrin-B domain organization with human loss-of-function variants. A, Domain organization of 220-kDa ankyrin-B. Canonical ankyrin-B contains a large NH₂-terminal domain of 24 ANK repeats (red diamonds; also called membrane-binding domain), a spectrin-binding domain that contains a ZU5 motif, a death domain of unknown function, and a C-terminal domain. Together, the death and C-terminal domains make up the ankyrin-B “regulatory” domain. B, Map of ankyrin-B regulatory domain with 9 identified human ankyrin-B loss-of-function variants (new variants are denoted by red text). Ankyrin-B loss-of-function variants are of 3 classes as assessed by their activities in wild-type cardiomyocytes. The first class displayed normal activity in wild-type cardiomyocytes (red boxes). The second class behaved as simple loss-of-activity variants (white boxes). The third class displayed ankyrin-B severe loss-of-function activity (yellow boxes).

demonstrate a spectrum of in vitro functional defects conferred by ankyrin-B variants and indicate that some, including E1425G (identified in the original LQT4 kindred), V1516D, and R1788W, display severe ankyrin-B loss-of-function activity (Table 3).

Discussion

Screening of 3 large populations of patients with congenital arrhythmia, drug-induced arrhythmia, and anonymized “control” patients identified 8 different ANK2 variants. ANK2 variants were present in all ethnic groups tested, and 3 were detected in multiple probands. Evaluation of the activities of each variant in ankyrin-B^{+/-} neonatal cardiomyocytes revealed that 4 of 7 new ANK2 variants display abnormal ankyrin-B activity (Figures 3 through 5).

A key unanswered question in the cardiac ion channel field is why all subjects with disease-associated DNA variants do not display markedly abnormal phenotypes like type 4 LQTS or the broader ankyrin-B syndrome.^{16,17} Thus, an important new finding here is the identification for the first time of 3 distinct functional classes of ANK2 loss-of-function variants (Figure 6 and Table 3). The first class of variants (4 variants) had negligible affect on wild-type neonatal cardiomyocyte contraction rates or channel/transporter localization/expression (Figure 6B, red boxes). The second class (2 variants) behaved as simple loss-of-activity variants while producing minor depressions in wild-type neonatal cardiomyocyte ion channel and transporter localization and expression and small depressions in neonatal cardiomyocyte spontaneous contraction rates (Figure 6B, white boxes). Finally, the third class of variants displayed severe ankyrin-B loss-of-function activity, both decreasing contraction rates and normal channel/transporter expression and localization (Figure 6B, yellow boxes). Together, these findings demonstrate that ANK2 variants

produce a spectrum of in vitro defects. Additional cellular studies are necessary to determine the molecular mechanism of each human ANK2 variant. We propose that this striking functional variability in vitro likely contributes to the variability in clinical phenotypes among patients with ANK2 loss-of-function variants. In the patients identified here, other LQTS mutations were absent, suggesting that the identified variants determine the human phenotypes observed. Indeed, the 3 variants with strong loss-of-function characteristics identified here (E1425G, V1516D, R1788W) were associated with generally more severe arrhythmia. Thus, although the numbers are small, we predict that such variants represent risk factors for development of more severe arrhythmias in the face of exogenous stressors such as drug exposure, adrenergic stimulation, or even acute myocardial ischemia.

Our new findings demonstrate the importance of combining targeted mutational analysis with careful functional examination of the physiological relevance of identified gene variants. For example, our screen identified a number of variants (G1406C, R1450W, L1503V) with absolutely no functional effect on ankyrin-B activity. Moreover, new and previously identified variants with loss-of-function phenotypes can now be more carefully scrutinized for degree of dysfunction. On the basis of our new functional data, we hypothesize that variants with less severe in vitro phenotypes (eg, L1622I) are more likely to be present in unaffected populations compared with variants that have severe effects on the myocyte (E1425G). In support of these findings, a recent report found L1622I to be present in a significant percentage of a control population.¹⁸ Additionally, Sherman et al¹⁸ identified a number of variants in both control and proband populations (E1543K, E1578K, S1721T, T1726N, S1791P) that need to be functionally characterized in myo-

cytes before speculation can be made regarding their clinical significance.

The roles of ankyrins for cell physiology continue to be elucidated, but it is clear that key functions include the cellular organization of a range of other proteins.¹⁹ Thus, our new data reinforce the role of protein interactions involving ankyrin-B in regulating normal cardiac electrogenesis and raise new questions regarding ankyrin-B regulation in vivo. To date, all ankyrin-B variants associated with abnormal cardiac function in humans are localized in or near the ankyrin-B regulatory domain. Although ankyrin-B ANK repeats are responsible for direct interactions with membrane-bound ion channels and transporters, multiple independent studies strongly support a critical role for the C-terminal region of ankyrin-B for normal activity in vivo by regulating both intermolecular and intramolecular interactions.^{12,14,19–22}

In summary, the finding that ANK2 variants with altered function are common across human populations, including those with arrhythmias, clearly identifies this gene and those with related functions as candidate modulators of the electrophysiological response of the cardiac myocyte to exogenous stressors such as exercise and drug exposure.²³

Study Limitations

Predicting clinical phenotype on the basis of genotype is difficult for most autosomal-dominant diseases. Genotype/phenotype predictions are further confounded in the case of ankyrin-B syndrome because congenital LQTS and associated arrhythmias display low penetrance^{17,24} and because ANK2 variants associated with severe arrhythmia and sudden cardiac death are rare.⁸ Moreover, in view of the latency of onset of phenotypes observed in probands with ANK2 variants, it also is possible that a number of asymptomatic/control ANK2 variant carriers will display cardiac symptoms in the future. Although these issues are not unique to ANK2-associated arrhythmia, we acknowledge that additional probands and family members harboring ANK2 variants with cardiac phenotypes are critical for further establishing ANK2 genotype-phenotype correlations. As with other disease phenotypes, genetic modifiers and environmental factors likely play a key role in the ultimate cardiac phenotype of ANK2 carriers.²³ Our new data provide the first insight into the severity of cellular phenotype for each identified ANK2 loss-of-function variant. Although determining the specific molecular mechanism underlying each individual variant is clearly beyond the scope of a single study, our new results suggesting that specific ANK2 variants lead to severe cardiomyocyte phenotypes clearly prioritize which ANK2 variants should be evaluated quickly and more critically in future experiments. Finally, although our present experiments have focused on the role of ankyrin-B function in ventricular cardiomyocytes, cardiac phenotypes associated with the ankyrin-B syndrome extend beyond the ventricular cardiomyocyte (sinoatrial node, atria). The role of ankyrin-B for targeting specific ion channels and transporters to T-tubule and sarcoplasmic reticulum membranes in ventricular cardiomyocytes is well established.¹⁹ In contrast, cellular

cardiac cell types are currently unknown but likely based on phenotypes observed in mice with reduced ankyrin-B expression and human probands harboring ANK2 variants.^{7–9,18} Therefore, correlations between the ventricular cardiomyocyte phenotypes observed in this study and nonventricular cardiac phenotypes in human ANK2 probands are less clear. Undoubtedly, uncovering the roles for ankyrin polypeptides in other excitable cardiac cells presents an exciting future focus for cardiac ankyrin research.

Sources of Funding

Dr Mohler is supported by R01HL084583 and R01HL083422. This work also was supported in part by HL65962, the Pharmacogenomics of Arrhythmia Therapy U01 Site of the Pharmacogenetics Research Network (Dr Roden), the Direction de la Recherche Clinique des Hôpitaux de Paris (PHRC AOR04070), and the GIS-Institut des Maladies Rares (P040111; Dr Guicheney and Dr Denjoy). Dr Escande and Dr Roden are part of the Transatlantic Network of Excellence on Sudden Cardiac Death supported by the Leducq Foundation.

Disclosures

None.

References

- Priori SG, Napolitano C. Genetics of cardiac arrhythmias and sudden cardiac death. *Ann NY Acad Sci*. 2004;1015:96–110.
- Keating MT, Sanguinetti MC. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell*. 2001;104:569–580.
- Towbin JA, Vatta M. Molecular biology and the prolonged QT syndromes. *Am J Med*. 2001;110:385–398.
- Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev*. 2005;85:1205–1253.
- Bennett V, Baines AJ. Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev*. 2001;81:1353–1392.
- Mohler PJ, Gramolini AO, Bennett V. Ankyrins. *J Cell Sci*. 2002;115:1565–1566.
- Mohler PJ, Splawski I, Napolitano C, Bottelli G, Sharpe L, Timothy K, Priori SG, Keating MT, Bennett V. A cardiac arrhythmia syndrome caused by loss of ankyrin-B function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:9137–9142.
- 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.
- Schott JJ, Charpentier F, Peltier S, Foley P, Drouin E, Bouhour JB, Donnelly P, Vergnaud G, Bachner L, Moisan JP, Le Marec H, Pascal O. Mapping of a gene for long QT syndrome to chromosome 4q25–27. *Am J Hum Genet*. 1995;57:1114–1122.
- Yang P, Kanki H, Drolet B, Yang T, Wei J, Viswanathan PC, Hohnloser SH, Shimizu W, Schwartz PJ, Stanton M, Murray KT, Norris K, George AL Jr, Roden DM. Allelic variants in long-QT disease genes in patients with drug-associated torsades de pointes. *Circulation*. 2002;105:1943–1948.
- Antzelevitch C, Brugada P, Borggreffe M, Brugada J, Brugada R, Corrado D, Gussak I, LeMarec H, Nademanee K, Perez Riera AR, Shimizu W, Schulze-Bahr E, Tan H, Wilde A. Brugada syndrome: report of the Second Consensus Conference. *Heart Rhythm*. 2005;2:429–440.
- Mohler PJ, Gramolini AO, Bennett V. The Ankyrin-B C-terminal domain determines activity of ankyrin-B/G chimeras in rescue of abnormal inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptor distribution in ankyrin-B (-/-) neonatal cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 2002;277:10599–10607.
- Mohler PJ, Davis JQ, Davis LH, Hoffman JA, Michael P, Bennett V. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor localization and stability in neonatal cardiomyocytes requires interaction with ankyrin-B. *J Biol Chem*. 2004;279:12980–12987.
- Mohler PJ, Hoffman JA, Davis JQ, Abdi KM, Kim CR, Jones SK, Davis LH, Roberts KF, Bennett V. Isoform specificity among ankyrins: an amphipathic alpha-helix in the divergent regulatory domain of ankyrin-B

- interacts with the molecular co-chaperone Hdj1/Hsp40. *J Biol Chem.* 2004;279:25798–25804.
15. Mohler PJ, Yoon W, Bennett V. Ankyrin-B targets beta2-spectrin to an intracellular compartment in neonatal cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2004;279:40185–40193.
 16. Moss AJ, Zareba W, Kaufman ES, Gartman E, Peterson DR, Benhorin J, Towbin JA, Keating MT, Priori SG, Schwartz PJ, Vincent GM, Robinson JL, Andrews ML, Feng C, Hall WJ, Medina A, Zhang L, Wang Z. Increased risk of arrhythmic events in long-QT syndrome with mutations in the pore region of the human ether-a-go-go-related gene potassium channel. *Circulation.* 2002;105:794–799.
 17. Priori SG, Napolitano C, Schwartz PJ. Low penetrance in the long-QT syndrome: clinical impact. *Circulation.* 1999;99:529–533.
 18. Sherman J, Tester DJ, Ackerman MJ. Targeted mutational analysis of ankyrin-B in 541 consecutive, unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing and 200 healthy subjects. *Heart Rhythm.* 2005;2:1218–1223.
 19. Mohler PJ, Davis JQ, Bennett V. Ankyrin-B coordinates the Na/K ATPase, Na/Ca exchanger, and InsP(3) receptor in a cardiac T-tubule/SR microdomain. *PLoS Biol.* 2005;3:2158–2167.
 20. Abdi KM, Mohler PJ, Davis JQ, Bennett V. Isoform specificity of ankyrin-B: a site in the divergent C-terminal domain is required for intramolecular association. *J Biol Chem.* 2006;281:5741–5749.
 21. Hall TG, Bennett V. Regulatory domains of erythrocyte ankyrin. *J Biol Chem.* 1987;262:10537–10545.
 22. Davis LH, Davis JQ, Bennett V. Ankyrin regulation: an alternatively spliced segment of the regulatory domain functions as an intramolecular modulator. *J Biol Chem.* 1992;267:18966–18972.
 23. Roden DM, Viswanathan PC. Genetics of acquired long QT syndrome. *J Clin Invest.* 2005;115:2025–2032.
 24. Roden DM. Human genomics and its impact on arrhythmias. *Trends Cardiovasc Med.* 2004;14:112–116.

CLINICAL PERSPECTIVE

Mutations in more than a dozen genes have now been implicated as causes of primary congenital arrhythmia syndromes like the long-QT syndrome, Brugada syndrome, or catecholaminergic ventricular tachycardia. Most of these genes encode ion channels or their function-modifying β -subunits. In 2003, linkage analysis in a very large kindred established that a mutation in a non-ion channel gene, *ANK2*, causes the rare type 4 long-QT syndrome, whereas follow-up studies suggested that the phenotype can be more complicated, including sinus bradycardia and atrial fibrillation. Here, screening *ANK2* in normal populations and patients with diverse arrhythmias, including sudden death and drug-associated long-QT syndrome, yielded a surprisingly high number of variants. The key question raised by such an analysis is whether and how identified variants affect arrhythmia susceptibility. In this case, studies in myocytes from wild-type and *ANK2* heterozygous mice established that the in vitro functional defect—abnormal cardiomyocyte contraction rates likely caused by misprocessing of key calcium control proteins—conferred by specific human variants varies from none to severe suppression of normal ankyrin-related physiology. This finding reinforces the notion that variants in many genes contributing to normal electrogenesis may modify arrhythmia susceptibility and thus further blurs the distinction between congenital and acquired arrhythmias. With the advent of increasingly robust high-throughput genotyping, identification of gene variants will become ever more common, so studies such as this that approach the problem of translating those findings to the bedside will become an increasingly important component of contemporary genomics.

II.1.3- Discussion (projet #1, compréhension des relations génotype-phénotype dans le syndrome ankyrine-B)

Le criblage d'une large population de 445 patients et 190 contrôles a permis d'identifier quatre nouveaux variants « perte de fonction » du gène *ANK2*, portant à neuf le nombre de mutations dont l'effet fonctionnel a été validé *in vitro* (**Article 2**). Ces variants entraînent des anomalies diverses du rythme cardiaque, auriculaires et ventriculaires, et de gravité variable. Présents dans les deux populations d'individus, ils représenteraient des facteurs de risque pour le développement d'arythmies cardiaques sévères en présence d'événements extérieurs comme la prise de médicaments, la stimulation adrénergique (stress, exercice), et l'ischémie myocardique.

La fréquence des variants non-synonymes du gène *ANK2* rapportés dans cet article (1,5% des patients, 3,5% des contrôles) approche les résultats d'un criblage de 541 patients SQT4 mutés ou non et 200 individus contrôles. En effet dans cette autre étude des variants non-synonymes avaient été identifiés chez 3% des patients SQT4 mutés ou non et 7% des contrôles (4% des caucasiens, 9% des afro-américains) [Sherman *et al.*, 2005]. Le variant L1622I à effet mineur avait été mis en évidence dans leur population contrôle avec une fréquence de 4% chez les afro-américains. Ils ont identifié d'autres variants qui n'ont pas été explorés fonctionnellement. Il est possible que les individus contrôles, asymptomatiques à ce jour, mais porteurs de variants *ANK2*, développeront des troubles du rythme dans le futur en présence de facteurs déclencheurs.

Suite à la publication de notre article, une étude reportant la fréquence des variants chez des individus « contrôles » originaires d'Europe (1 152 individus) et d'Afrique de l'Ouest (384 individus) a confirmé la forte prévalence des variants « perte de fonction » *ANK2* chez des individus apparemment sains (2% des européens, plusieurs variants rares ; 8% des ghanéens, seul le variant L1622I a été retrouvé). Les variants associés à un phénotype plus sévère (E1425G, V1516D, R1788W) sont rares dans la population générale. Ces résultats suggèrent une différence de fréquence allélique des SNP due à l'ethnie, et d'autre part ces variants pourraient être liés à une sénescence précoce et une durée de vie diminuée mais bénéfiques pour la contractilité cardiaque [Mohler *et al.*, 2007].

Un modèle de souris « *Knock-In* » E1425G, mutation de la famille SQT4 d'origine, est en cours d'élaboration. Etant donné les résultats de l'**Article 2** et le phénotype sévère des patients de la famille d'origine (« Family 1 », **Article 1**), un phénotype plus grave de ces souris en comparaison avec le phénotype des souris *AnkB*^{+/-} est supposé. La caractérisation

phénotypique de cette souris par l'équipe de Flavien Charpentier au laboratoire permettra de déterminer précisément la physiopathologie de la mutation E1425G.

La famille Ma (« Family 2 », **Article 1**) a un phénotype moins sévère que celui de la famille AnkB-E1425G (« Family 1 »). Dans cette famille, il y a 4 non-pénétrants, dont 2 sont obligatoirement porteurs de la mutation puisque au moins un de leurs enfants est cliniquement atteint. De plus, le phénotype ventriculaire est moins sévère puisque seulement 60% des individus possédant l'haplotype morbide présentent une anomalie de la repolarisation contre 92% des individus porteurs de la mutation E1425G dans la première famille. Ces observations pourraient s'expliquer par l'existence dans la famille Ma d'une mutation qui n'aurait pas un effet dominant négatif. La quantification du taux de protéine ankyrine-B chez un patient de la famille Ma montre une diminution de celui-ci, qui est effectivement en faveur d'une haploinsuffisance plutôt qu'un effet dominant négatif. Ce résultat est à prendre avec précaution puisque l'analyse a été menée sur une biopsie de muscle squelettique et non cardiaque.

La première hypothèse pour expliquer la diminution du taux d'ankyrine-B est un défaut au niveau de la transcription. Le promoteur proximal et des régions conservées dans l'évolution, qui pourraient correspondre à des séquences régulatrices, ont donc été séquencées, mais n'ont pas permis d'identifier de mutation.

La seconde hypothèse est un défaut au niveau post-transcriptionnel. Parmi les voies qui contrôlent la traduction et la dégradation des ARNm, nous pouvons citer la voie du *nonsense-mediated RNA decay* et la régulation par les microRNA (miRNA) [revue par Shyu *et al.*, 2008]. Le premier mécanisme est un système de surveillance du cytoplasme qui détecte et élimine les ARNm aberrants dont la traduction produirait des protéines tronquées ou défectueuses. Le second est un mécanisme de régulation par de petits ARN non-codants endogènes de 21-24 nucléotides, les miRNA, qui se fixeraient sur la partie 3'UTR de leurs gènes cibles pour inhiber leur traduction ou provoquer leur destruction [revue par Kloosterman & Plasterk, 2006]. Des SNP dans la région 3'UTR des gènes peuvent affecter leur niveau d'expression en modifiant la fixation des miRNA. Par exemple, un SNP au niveau du site de fixation du miR-189 en 3'UTR du gène *SLITRK1* renforce la fixation de ce miRNA et conduit au syndrome de la Tourette [Abelson *et al.*, 2005]. Les SNP en 3'UTR peuvent aussi créer de nouveaux sites de fixation illégitimes, comme un SNP du gène de la myostatine qui contribue à l'hypertrophie musculaire chez le mouton [Cloup *et al.*, 2006]. Chez l'homme, un polymorphisme dans la partie 3'UTR du gène codant pour le récepteur à l'angiotensine-II (*AT1R*) associé à des maladies cardio-vasculaires atténue la liaison du miR-155 ce qui remet en cause son supposé effet « silencieux » car situé dans une région non-codante [Martin *et al.*, 2007b]. Les mutations qui créent ou détruisent des sites de fixation de

miRNA semblent être abondantes. Malgré le séquençage de la partie 3'UTR du gène *ANK2*, et la recherche de réarrangements par deux types de puces CGH haute-densité qui pourrait entraîner un ARNm instable, le défaut du gène *ANK2* n'a pu être identifié à ce jour. Ce gène couvre environ 330 kb entre l'exon 1 décrit dans les bases de données et l'exon 46, la taille moyenne d'un gène chez l'homme étant de 10-15 kb (étendue extrêmement variable de moins d'un kb à près de 2 500 kb pour la dystrophine). Il était donc inenvisageable avec nos techniques de séquençage classique de cribler l'ensemble des parties introniques. Une petite délétion intronique pourrait avoir un effet sur l'épissage et produire un ARNm instable. Etant donné que les puces que nous avons utilisées ont une résolution limitée, une des solutions serait d'utiliser des puces CGH-*array tiling* pour identifier un éventuel réarrangement de petite taille. Si cette approche n'était pas concluante, une solution serait de séquencer le gène en entier ainsi que ses deux zones promotrices avec des techniques de séquençage haut-débit.

Le séquençage d'autres gènes du locus 4q25-q27 a mis en évidence une délétion de 4 pb dans un miRNA situé 400 kb en amont du gène (*MIRN302c*). Cette délétion était intrigante puisque le miR-302c a parmi ses cibles le gène *ANK2* d'après les prédictions bioinformatiques TargetScan [<http://www.targetscan.org/>] et PicTar [<http://pictar.bio.nyu.edu/>]. Cependant aucune mutation dans un miRNA n'a encore été rapportée et chaque miRNA a des centaines de gènes cibles ce qui impliquerait que d'autres voies soient touchées. De plus, cette délétion de 4 pb a été retrouvée à une fréquence de 4,9% chez les contrôles. Même s'il n'est pas à l'origine de la pathologie considérée rare de la famille Ma, ce « polymorphisme » pourrait moduler la régulation post-transcriptionnelle de ses gènes cibles, dont le gène *ANK2*.

En ce qui concerne les régions codantes du gène, le séquençage de nouveaux exons des transcrits cardiaques ne s'est pas avéré concluant. Nous ne pouvons exclure l'existence d'autres exons (spécifiques du tissu nodal par exemple) puisque la recherche s'est limitée au tissu ventriculaire.

D'autre part, la recherche de nouveaux exons a mis en évidence un épissage important de ce gène. Les transcrits existants pour la partie C-terminale sont multiples et il existe un exon 1 alternatif situé très en amont de l'exon 1 décrit dans les bases de données (145 kb). Il a déjà été observé un épissage alternatif élevé pour les autres gènes de la famille des ankyrines. En effet le gène *ANK1* a un exon 1 alternatif et de multiples extrémités 5' et 3' [Birkenmeier *et al.*, 1993 ; Birkenmeier *et al.*, 1998] et un promoteur alternatif spécifique du muscle [Gallagher & Forget, 1998]. Le gène *ANK3* possède lui aussi des transcrits alternatifs [Peters *et al.*, 1995]. L'existence d'exons alternatifs spécifiques du tissu a très certainement un rôle primordial dans la fonction de la protéine et leur identification est maintenant facilitée

grâce à de nouvelles technologies haut-débit [Clark *et al.*, 2007]. Les études futures sur ces exons, pour savoir quel est leur rôle, et si ils interagissent avec d'autres protéines, seront déterminantes pour comprendre le rôle de l'ankyrine-B au niveau cardiaque.

En conclusion, ces deux études ont permis d'élargir les connaissances sur les relations génotype-phénotype du syndrome ankyrine-B en démontrant l'implication de l'ankyrine-B dans la dysfonction sinusale, en élargissant le spectre phénotypique des mutations *ANK2*, et en apportant des éléments nouveaux sur le degré de sévérité phénotypique engendré par ces mutations.

Le défaut du gène *ANK2* responsable d'une diminution du taux de protéine ankyrine-B dans l'unique seconde grande famille identifiée à ce jour est probablement complexe. Son identification permettra d'éclaircir les mécanismes de régulation du gène et ouvrira de nouvelles perspectives pour le criblage des dizaines de patients « LQT4-*like* » sporadiques pour lesquels le diagnostic moléculaire a échoué mais aussi des patients atteints de dysfonction sinusale.

II.2- Projet #2 : Etude génétique d'un syndrome de repolarisation précoce maligne

II.2.1- Article 3 : Description clinique du syndrome

Ce nouveau syndrome de mort subite cardiaque par fibrillation ventriculaire (FV) associé à une repolarisation précoce est décrit dans l'**Article 3, page 115**. Une courte description est présentée ci-dessous.

La repolarisation précoce, observable sur l'électrocardiogramme, est considérée comme bénigne et commune et affecte 1 à 5% des individus (Figure 9, page 41). L'objectif de cette étude était d'évaluer la relation potentielle entre la repolarisation précoce et la fibrillation ventriculaire pouvant conduire à la mort subite sur cœur sain chez des individus jeunes.

La prévalence d'une forme de repolarisation précoce a été évaluée chez i) 206 patients atteints de FV idiopathique et ii) 412 sujets contrôles. Cette forme est caractérisée par une élévation de la jonction QRS-ST avec un point J $\geq 0,1$ mV dans les dérives latérales (V4-V6, D1, aVL) ou inférieures (DII, DIII, aVF), ou un défaut à la fin du complexe QRS (*notch* ou *slurring*).

Cette étude a montré que la repolarisation précoce était plus fréquemment observée chez les patients avec une FV (31% *versus* 5%). Ces patients atteints de FV idiopathique et présentant une repolarisation précoce sont en majorité des hommes, et ont un nombre d'événements (syncopes, mort subite pendant la nuit) plus important. Il faut noter que l'amplitude ou l'aspect de la repolarisation précoce varie dans le temps, parfois même battement à battement. L'anomalie est souvent très discrète, et s'amplifie parfois juste avant l'arythmie ventriculaire. La fibrillation ventriculaire a généralement pour origine des extrasystoles polymorphes provenant du ventricule gauche.

Cette étude rendue possible par la collaboration de 22 centres hospitaliers a donc montré une prévalence accrue de la repolarisation précoce (dans les dérives latérales ou inférieures) chez des patients jeunes avec FV idiopathique responsable de syncopes et/ou mort subite. Ce nouveau syndrome vient s'ajouter au syndrome de Brugada pour l'explication des formes « idiopathiques » de fibrillation ventriculaire.

Mon travail a consisté dans un premier temps à exclure chez 3 patients présentant une forme typique de ce syndrome les gènes les plus fréquemment incriminés dans le syndrome du QT long (*KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *ANK2*, *KCNE1*, *KCNE2*, *KCNJ2*) et le syndrome de Brugada (*SCN5A*), impliqués dans la mort subite du sujet jeune par fibrillation ventriculaire sur cœur sain. Suite à ce premier travail, nous avons initié un nouveau projet de recherche sur ce syndrome de repolarisation précoce maligne (paragraphe II-2.2, page 116).

Article 3

Sudden cardiac arrest associated with early repolarization

Michel Haïssaguerre¹, Nicolas Derval¹, Frederic Sacher¹, Laurence Jesel², Isabel Deisenhofer³, Luc de Roy⁴, Jean-Luc Pasquié⁵, Akihiko Nogami⁶, Dominique Babuty⁷, Sinikka Yli-Mayry⁸, Christian De Chillou⁹, Patrice Scanu¹⁰, Philippe Mabo¹¹, Seiichiro Matsuo¹, Vincent Probst¹², Solena Le Scouarnec¹², Pascal Defaye¹³, Juerg Schlaepfer¹⁴, Thomas Rostock¹⁵, Dominique Lacroix¹⁶, Dominique Lamaison¹⁷, Thomas Lavergne¹⁸, Yoshifusa Aizawa¹⁹, Anders Englund²⁰, Frederic Anselme²¹, Mark O'Neill²², Meleze Hocini¹, Kang Teng Lim¹, Sebastien Knecht¹, George D. Veenhuyzen²³, Pierre Bordachar¹, Michel Chauvin², Pierre Jais¹, Gaelle Coureau¹, Genevieve Chene¹, George J. Klein²⁴, Jacques Clémenty¹.

The New England Journal of Medicine (2008), 358:2016-2023

¹Université Bordeaux - Hôpital Haut-Lévêque,
Bordeaux-Pessac, France

²CHU Strasbourg, France

³Herzzentrum, Munich, Allemagne

⁴Clinique Mont-Godinne, Louvain, Belgique

⁵CHU Montpellier, France

⁶Yokohama Rosai Hospital , Japon

⁷CHU Tours, France

⁸Tampere University Hospital, Finlande

⁹CHU Nancy, France

¹⁰CHU Caen, France

¹¹CHU Rennes, France

¹²CHU Nantes, France

¹³CHU Grenoble, France

¹⁴CH Lausanne, Suisse

¹⁵Eppendorf hospital, Hambourg, Allemagne

¹⁶CHU Lille, France

¹⁷CHU Clermont-Ferrand, France

¹⁸CHU Paris, France

¹⁹Niigata University school, Japon

²⁰Orebro hospital, Suède

²¹CHU Rouen, France

²²St Mary hospital, London, Angleterre

²³Libin Cardiovascular Institute of Alberta,
University of Calgary, Canada

²⁴London Health Sciences Center, Ontario,
Canada

ORIGINAL ARTICLE

Sudden Cardiac Arrest Associated with Early Repolarization

Michel Haïssaguerre, M.D., Nicolas Derval, M.D., Frederic Sacher, M.D., Laurence Jesel, M.D., Isabel Deisenhofer, M.D., Luc de Roy, M.D., Jean-Luc Pasquié, M.D., Ph.D., Akihiko Nogami, M.D., Dominique Babuty, M.D., Sinikka Yli-Mayry, M.D., Christian De Chillou, M.D., Patrice Scanu, M.D., Philippe Mabo, M.D., Seiichiro Matsuo, M.D., Vincent Probst, M.D., Ph.D., Solena Le Scouarnec, Ph.D., Pascal Defaye, M.D., Juerg Schlaepfer, M.D., Thomas Rostock, M.D., Dominique Lacroix, M.D., Dominique Lamaison, M.D., Thomas Lavergne, M.D., Yoshifusa Aizawa, M.D., Anders Englund, M.D., Frederic Anselme, M.D., Mark O'Neill, M.D., Meleze Hocini, M.D., Kang Teng Lim, M.B., B.S., Sebastien Knecht, M.D., George D. Veenhuizen, M.D., Pierre Bordachar, M.D., Michel Chauvin, M.D., Pierre Jais, M.D., Gaelle Coureau, Ph.D., Genevieve Chene, Ph.D., George J. Klein, M.D., and Jacques Clémenty, M.D.

ABSTRACT

BACKGROUND

Early repolarization is a common electrocardiographic finding that is generally considered to be benign. Its potential to cause cardiac arrhythmias has been hypothesized from experimental studies, but it is not known whether there is a clinical association with sudden cardiac arrest.

METHODS

We reviewed data from 206 case subjects at 22 centers who were resuscitated after cardiac arrest due to idiopathic ventricular fibrillation and assessed the prevalence of electrocardiographic early repolarization. The latter was defined as an elevation of the QRS–ST junction of at least 0.1 mV from baseline in the inferior or lateral lead, manifested as QRS slurring or notching. The control group comprised 412 subjects without heart disease who were matched for age, sex, race, and level of physical activity. Follow-up data that included the results of monitoring with an implantable defibrillator were obtained for all case subjects.

RESULTS

Early repolarization was more frequent in case subjects with idiopathic ventricular fibrillation than in control subjects (31% vs. 5%, $P < 0.001$). Among case subjects, those with early repolarization were more likely to be male and to have a history of syncope or sudden cardiac arrest during sleep than those without early repolarization. In eight subjects, the origin of ectopy that initiated ventricular arrhythmias was mapped to sites concordant with the localization of repolarization abnormalities. During a mean (\pm SD) follow-up of 61 ± 50 months, defibrillator monitoring showed a higher incidence of recurrent ventricular fibrillation in case subjects with a repolarization abnormality than in those without such an abnormality (hazard ratio, 2.1; 95% confidence interval, 1.2 to 3.5; $P = 0.008$).

CONCLUSIONS

Among patients with a history of idiopathic ventricular fibrillation, there is an increased prevalence of early repolarization.

From the Université Bordeaux, Hôpital Haut-Lévêque, Bordeaux-Pessac (M. Haïssaguerre, N.D., F.S., S.M., M. Hocini, K.T.L., S.K., P.B., P.J., G. Coureau, G. Chene, J.C.), and Centres Hospitaliers Universitaires of Strasbourg (L.J., M.C.), Montpellier (J.-L.P.), Tours (D.B.), Nancy (C.D.C.), Caen (P.S.), Rennes (P.M.), Nantes (V.P., S.L.S.), Grenoble (P.D.), Lille (D. Lacroix), Clermont-Ferrand (D. Lamaison), Paris (T.L.), and Rouen (F.A.) — all in France; Herzzentrum, Munich (I.D.), and Eppendorf Hospital, Hamburg (T.R.) — both in Germany; Clinique de Mont Godinne, Louvain, Belgium (L.R.); Yokohama Rosai Hospital, Yokohama (A.N.), and Niigata University School, Niigata (Y.A.) — both in Japan; Tampere University Hospital, Tampere, Finland (S.Y.-M.); Centre Hospitalier, Lausanne, Switzerland (J.S.); Orebro Hospital, Orebro, Sweden (A.E.); St. Mary Hospital, London (M.O.); and Libin Cardiovascular Institute of Alberta, University of Calgary, Calgary (G.D.V.), and London Health Sciences Centre, London, ON (G.J.K.) — both in Canada. Address reprint requests to Dr. Haïssaguerre at Hôpital Cardiologique du Haut-Lévêque, 33604 Bordeaux-Pessac, France, or at michel.haissaguerre@chu-bordeaux.fr.

N Engl J Med 2008;358:2016-23.

Copyright © 2008 Massachusetts Medical Society.

SUDDEN CARDIAC ARREST REMAINS A MAJOR public health problem that accounts for approximately 350,000 deaths annually in the United States. Despite advances in emergency medical systems, only 3 to 10% of patients who have an out-of-hospital cardiac arrest are successfully resuscitated. The majority of such sudden cardiac arrests are caused by ventricular tachyarrhythmias, which occur in persons without structural heart disease in 6 to 14% of cases.^{1,2} Some of the latter cases are related to well-recognized electrocardiographic abnormalities that affect ventricular repolarization (e.g., long or short QT intervals or the Brugada syndrome), whereas other cases, in which there are no signs during sinus rhythm, are described as idiopathic ventricular fibrillation.³⁻¹⁰

Early repolarization is a common electrocardiographic finding that affects 1 to 5% of persons.^{11,12} Although the condition is usually considered benign, its potential arrhythmogenicity has been suggested by experimental studies.¹³ However, supporting clinical evidence is lacking. We performed a case-control study involving 206 case subjects with idiopathic ventricular fibrillation to assess the prevalence of early repolarization and evaluated its potential relationship with any observed arrhythmias and the subsequent outcome, as monitored by implantable defibrillators.

METHODS

STUDY POPULATION

Case subjects under the age of 60 years were enrolled at 22 international tertiary care arrhythmia centers. All subjects with the diagnosis of idiopathic ventricular fibrillation in this age group were selected from the databases of patients who had received an implantable defibrillator; all patients 60 years of age or older were excluded to minimize the risk of subclinical structural heart disease. Oral informed consent was obtained from all enrolled subjects.

We evaluated baseline electrocardiograms for the presence of early repolarization, which was defined as an elevation of the QRS-ST junction (J point) in at least two leads, at the time of implantation of the defibrillator. The amplitude of J-point elevation had to be at least 1 mm (0.1 mV) above the baseline level,^{11,12} either as QRS slurring (a smooth transition from the QRS segment to the ST segment) or notching (a positive J deflection inscribed on the S wave) in the inferior lead (II, III, and aVF), lateral lead (I, aVL, and V₄ to V₆),

or both. The anterior precordial leads (V₁ to V₃) were excluded from the analysis to avoid the inclusion of patients with right ventricular dysplasia or the Brugada syndrome.^{6,8}

On the basis of published guidelines,^{1,2} patients were classified as having idiopathic ventricular fibrillation if they had no identifiable structural heart disease demonstrated by normal echocardiographic biventricular dimensions and function, no detectable coronary artery disease on coronary angiography or exercise testing, and no known repolarization abnormalities. Case subjects were excluded if they had a QT interval corrected for heart rate (QTc) of less than 340 msec (short QT interval) or more than 440 msec (long QT interval) at baseline and before arrhythmia.^{5,9} Patients with the Brugada syndrome, defined as right bundle-branch block and ST-segment elevation (>0.2 mV) in precordial leads V₁ to V₃, without intervention or following infusion of a sodium-channel blocker,^{8,10} were also excluded. In addition, patients with catecholaminergic arrhythmias, defined as arrhythmias during catecholamine infusion or exercise testing, were excluded.

We assessed the prevalence and amplitude of early repolarization in a control group of 412 consecutive subjects. This population was composed of health care professionals with normal echocardiographic biventricular dimensions and function and no history of syncope. Global frequency matching was used for the distribution of known confounding factors (age, sex, race, and level of physical activity).

DATA COLLECTION

We collected the following clinical data: a history of unexplained syncope, circumstances of sudden cardiac arrest, a family history of unexplained sudden death (at <60 years of age), the level of physical activity (>10 hours or ≤10 hours of activity a week), results on signal-averaged electrocardiography (both standard amplification and high amplification), and results of pharmacological testing and invasive electrophysiological testing. Electrocardiographic readings were measured with the use of automated online software and were verified manually. The QTc interval was calculated after correction for heart rate with Bazett's formula.

ELECTROPHYSIOLOGICAL STUDY

We performed electrophysiological testing with the use of multielectrode catheters introduced percutaneously through the femoral vessels. Programmed

Table 1. Characteristics of the Case Subjects.*

Characteristic	Early Repolarization (N = 64)	No Early Repolarization (N = 142)	P Value
Demographic and clinical			
Male sex — no. (%)	46 (72)	76 (54)	0.007
Age — yr	35±13	37±13	0.49
Race or ethnic group — no. †			0.69
White	58	132	
Asian	5	9	
Black	1	1	
History of unexplained syncope — no. (%)	24 (38)	35 (25)	0.06
Family history of unexplained sudden death — no. (%)	10 (16)	13 (9)	0.17
Physical activity — no. (%) ‡	4 (6)	18 (13)	0.11
Activity at the time of initial sudden cardiac arrest — no. (%)			
Sleeping	12 (19)	6 (4)	0.03
Physical effort	6 (9)	19 (13)	
Other activity	46 (72)	117 (82)	
Occurrence of initial ventricular fibrillation — no. (%)			
Out of hospital	52 (81)	126 (89)	0.15
In hospital for syncope or other reason	12 (19)	16 (11)	
Electrocardiographic			
Prolonged PR interval (>200 msec) — no. (%)	3 (5)	7 (5)	0.93
Duration of QRS complex — msec	91±10	92±15	0.39
Duration of QTc interval — msec	392±22	401±23	0.01
Presence of late potentials — no./total no. (%) §	5/44 (11)	8/63 (13)	0.84
Electrophysiological			
His bundle–ventricular interval — msec	45±7	46±10	0.77
Inducibility of ventricular fibrillation — no./total no. (%)	16/47 (34)	17/85 (20)	0.07
Inducible with 3 extrastimuli — %	81	85	0.96
Shortest coupling interval — msec	209±30	209±23	0.84
Confirmation of idiopathic ventricular fibrillation			
Coronary angiogram — no. (%) ¶	62 (97)	128 (90)	0.09
Right ventricular angiogram or MRI — no. (%)	50 (78)	107 (75)	0.66
Sodium-blocker infusion — no. (%)	54 (84)	81 (57)	<0.001
Exercise test or catecholamine infusion — no. (%)	54 (84)	69 (49)	<0.001

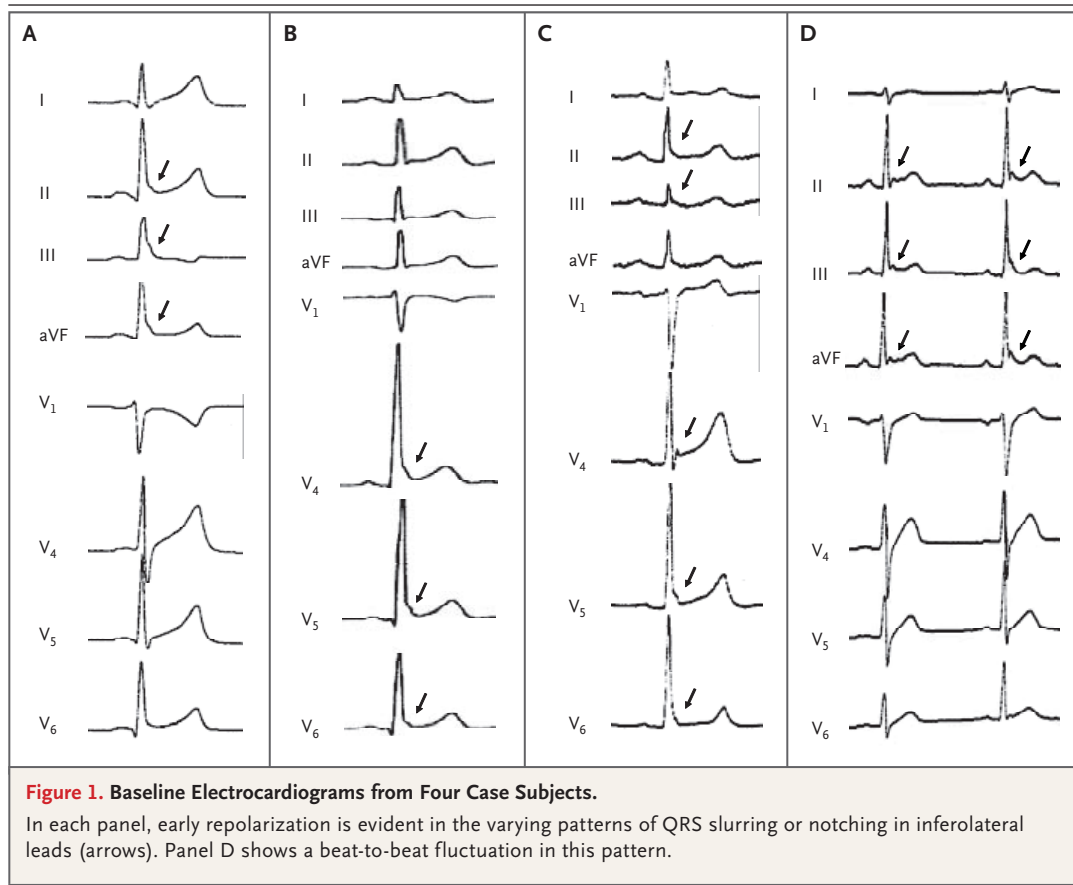
* Plus–minus values are means ±SD. Percentages may not total 100 because of rounding. MRI denotes magnetic resonance imaging.

† Race or ethnic group was self-reported.

‡ Physical activity was defined as more than 10 hours of activity a week.

§ High-amplification, signal-averaged electrocardiograms were considered to indicate the presence of late ventricular potentials when two of the following measurements were recorded: a QRS duration of more than 120 msec, a root mean square of terminal QRS of less than 25 mV, and a low-amplitude signal lasting more than 40 msec.

¶ Subjects who did not undergo coronary angiography had normal exercise testing.



ventricular stimulation was performed with the use of a maximum of two or three ventricular extrastimuli from two separate ventricular sites. Ventricular fibrillation was considered to be inducible if it lasted for more than 30 seconds or required electrical cardioversion. No subject had inducible monomorphic ventricular tachycardia.

In case subjects with recurrent ventricular fibrillation despite the administration of antiarrhythmic drugs, catheter ablation that targeted the initiating ventricular ectopy was performed as described previously.¹⁴ Such ectopy was localized by mapping the earliest electrical activity, either Purkinje or myocardial, relative to the onset of the QRS complex. Ablation was performed with the use of radiofrequency energy.

THERAPY AND FOLLOW-UP

All case subjects received an implantable defibrillator that provided accurate information on recurrence of ventricular fibrillation. The subjects were seen routinely every 6 to 12 months for clinical review and device interrogation or as necessary in

the event of the onset of symptoms or device discharges. In subjects with recurrent arrhythmias, the choice of antiarrhythmic drugs was made by individual physicians.

STATISTICAL ANALYSIS

Continuous variables were reported as means \pm SD or medians (with 25th and 75th percentiles), as appropriate. A comparison between the two groups was performed with Student's t-test or the non-parametric Wilcoxon rank-sum test, as appropriate, and with Student's t-test for paired data. Categorical variables were compared with Fisher's exact test. The prevalence of early repolarization was compared between case subjects and control subjects with the use of logistic-regression analysis (reported as odds ratios with 95% confidence intervals) and was adjusted for matching variables. The number of recurrences of ventricular fibrillation was compared with the use of the Wilcoxon test, and the recurrence rate was assessed with the use of actuarial curves. Hazard ratios from Cox proportional-hazards models were used to estimate

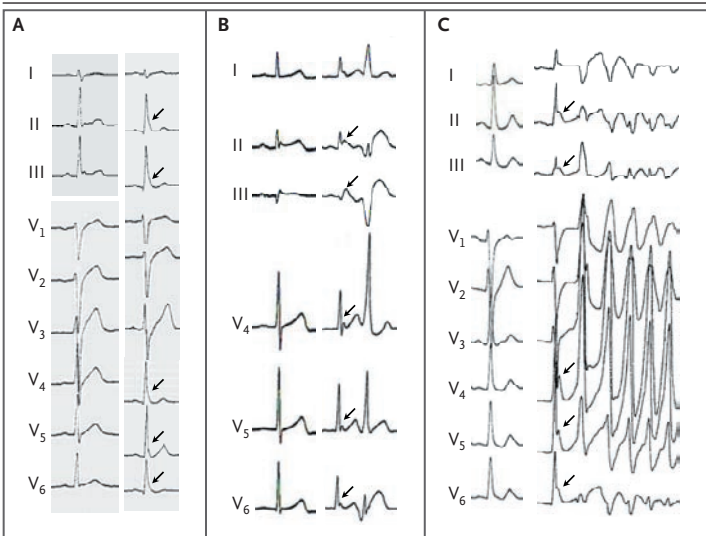


Figure 2. Electrocardiograms from Three Case Subjects with Early Repolarization Associated with Ventricular Fibrillation.

Each panel shows the first QRS complex recorded at baseline (left) and the subsequent complexes recorded before an arrhythmic event (right), with clear accentuation of early repolarization (arrows), as compared with baseline. In the patient whose electrocardiogram is shown in Panel A, ventricular fibrillation occurred the following night. Panel B shows a ventricular premature beat (with a left axis); a similar beat triggered ventricular fibrillation a few hours later, as documented on monitoring. Panel C shows the onset of ventricular fibrillation.

the relative risk associated with early repolarization. All tests were two-tailed, and a P value of less than 0.05 was considered to indicate statistical significance.

RESULTS

EARLY REPOLARIZATION

The group of case subjects with idiopathic ventricular fibrillation included 123 men and 83 women with a mean age of 36 ± 11 years. The control group included 412 persons who were well matched for age (36 ± 12 years), sex (270 men and 142 women), race (380 white, 27 Asian, and 5 black), and physical activity (44 subjects engaged in more than 10 hours of activity weekly).

Early repolarization occurred in 64 case subjects (31%), as compared with 21 control subjects (5%, $P < 0.001$) and was greater in magnitude in case subjects than in control subjects (J-point elevation, 2.0 ± 0.9 mm vs. 1.2 ± 0.4 mm; $P < 0.001$). After adjustment for age, sex, race, and level of physical activity, the odds ratio for the presence of

early repolarization in case subjects, as compared with control subjects, was 10.9 (95% confidence interval [CI], 6.3 to 18.9).

Case subjects with early repolarization were more likely to be male, to have a history of unexplained syncope or sudden cardiac arrest during sleep, and to have a shorter QTc interval than those without early repolarization. The characteristics of the case subjects are summarized in Table 1.

At baseline, early repolarization was present in the inferior lead in 28 subjects, in the lateral lead in 6 subjects, and in both inferior and lateral leads in 30 subjects (Fig. 1). This pattern was considered repolarization rather than late depolarization because of its slower inscription, spontaneous fluctuation in morphologic pattern or amplitude in the face of stable QRS complexes, and amplitude varying concurrently with ST segment. The absence of late potentials on high-amplification electrocardiography further supported a repolarization pattern (Table 1). This pattern occurred in isolation or was followed by negative T-wave elevation or discrete ST-segment elevation (horizontal or displaying upward concavity). Electrocardiograms that had been obtained weeks to years before sudden cardiac arrest were available for 22 subjects and showed the pattern of early repolarization (as defined above).

Electrocardiography was performed during an arrhythmic period (including frequent ventricular ectopy and episodes of ventricular fibrillation) in 18 subjects, and all studies showed a consistent increase in the amplitude of early repolarization, as compared with baseline (Fig. 2). The J-point amplitude increased from 2.6 ± 1 mm to 4.1 ± 2 mm ($P < 0.001$). In most of the case subjects, ectopy had a positive QRS morphologic pattern in leads V_1 to V_2 , which indicated an origin from the left ventricle and a short coupling interval initiating ventricular fibrillation (mean, 326 ± 41 msec; range, 260 to 400).

Exercise testing or the infusion of isoproterenol consistently reduced or eliminated early repolarization. Isoproterenol infused in two subjects during repetitive episodes of ventricular fibrillation eliminated all arrhythmias when the sinus heart rate was increased above 120 beats per minute. In contrast, beta-blockers accentuated repolarization abnormalities. The effects of antiarrhythmic drugs are summarized in Table 2. Their

Table 2. Outcome after Initial Aborted Sudden Cardiac Arrest.*

Variable	Early Repolarization (N = 64)	No Early Repolarization (N = 142)	P Value
Duration of follow-up (mo)			0.81
Mean	60±45	62±52	
Median	49	54	
Interquartile range	24–90	17–92	
No. of recurrent episodes of ventricular fibrillation per patient			0.001
Median	8	2	
Interquartile range	2–35	1–6	
Successful treatment (no./total no.)†			
Beta-blockers	2/13	9/17	
Amiodarone	0/7	3/7	
Flecainide, cifenline, or pilsicainide	0/10	2/4	
Quinidine or disopyramide	4/4	1/3	
Verapamil	0/5	3/8	
Mexiletine	0/5	0/2	
Catheter ablation	5/8	6/7	
Current outcome			
No. of subjects alive	63	142	
No. of subjects with recurrence in the past 12 mo	5‡	5	

* Plus–minus values are means ±SD.

† Successful treatment was defined as no ventricular fibrillation for at least 12 months, as documented by an implantable defibrillator.

‡ Quinidine was recently prescribed for three subjects.

inefficacy led to attempts at catheter ablation of ventricular premature beats, which triggered ventricular fibrillation in some subjects.

ORIGIN OF ECTOPY IN EARLY REPOLARIZATION

Mapping was performed in eight case subjects. In two case subjects, mapping of both ventricles did not show results during ventricular depolarization that were coincident with a wide terminal QRS abnormality, confirming that the latter was related to repolarization. A total of 26 ectopic patterns were mapped either to the ventricular myocardium (16 patterns) or to Purkinje tissue (10 patterns). In six subjects with early repolarization recorded only in inferior leads, all ectopy originated from the inferior ventricular wall. In two subjects with widespread early repolarization, as recorded by both inferior and lateral leads, ectopy originated from multiple regions. Catheter ablation eliminated all ectopy in five subjects and did not eliminate the condition in three subjects.

OUTCOME IN CASE SUBJECTS

Table 2 summarizes the outcome during a mean period of 61±50 months (median, 51 months; interquartile range, 19 to 90) after the initial event, with no case subject lost to follow-up. Arrhythmic recurrences were more frequent in subjects with early repolarization than in those without such repolarization (41% vs. 23%). The hazard ratio for recurrence was 2.1 (95% CI, 1.2 to 3.5; P=0.008), even after adjustment for sex (Fig. 3). The three subjects with the highest J-point elevation (>5 mm) had more than 50 episodes of ventricular fibrillation, leading to death in one. Four subjects with multiple episodes were treated with quinidine, which diminished the repolarization abnormality and eliminated arrhythmia recurrences.

DISCUSSION

Sudden cardiac arrest from arrhythmia may occur in persons who do not have structural heart dis-

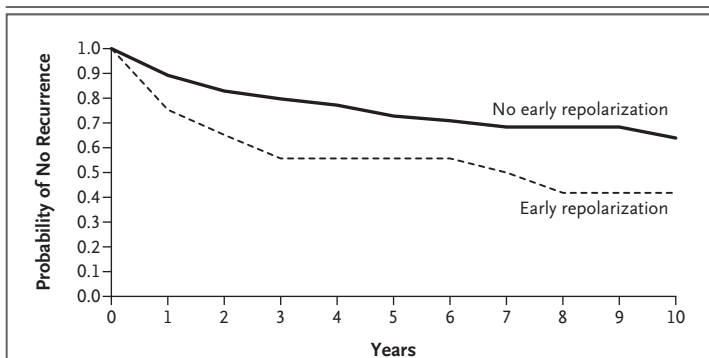


Figure 3. Actuarial Curves for Case Subjects, According to the Presence or Absence of Early Repolarization.

Case subjects with a repolarization abnormality were at increased risk for recurrent ventricular fibrillation, as compared with those without such an abnormality (hazard ratio, 2.1; 95% CI, 1.2 to 3.5; $P=0.008$).

ease or evident electrocardiographic abnormalities during sinus rhythm. In our study, such case subjects had a significantly higher prevalence of early repolarization than control subjects, in whom the prevalence was similar to that among healthy subjects in studies reported previously.¹¹⁻¹³ In nearly one third of case subjects, electrocardiograms obtained before cardiac arrest were available, and they showed early repolarization, which indicated that this abnormality could not be the result of the trauma of sudden cardiac arrest, resuscitation efforts, or drugs used for resuscitation.

It is unlikely that this abnormality is simply more common among the survivors of cardiac arrest than among nonsurvivors, because the single most important factor determining successful resuscitation is access to prompt defibrillation.¹⁵ This electrocardiographic pattern was also associated with an increased incidence of recurrent ventricular arrhythmias during follow-up with defibrillator monitoring.

Our results suggest a relationship between early repolarization and sudden cardiac arrest, a conclusion that is at odds with the seemingly benign nature of this common phenomenon. First, this finding may be due to the definition of early repolarization, since we specifically included abnormalities in the inferolateral leads, whereas the broad traditional definition of early repolarization involves varying amplitude, configuration, and extent of the electrocardiographic patterns, most commonly in the right precordial leads. Second, few of the case subjects in our study belonged to

subgroups that have a high prevalence of early repolarization (e.g., athletes and blacks), which suggested that cofactors influence the association with sudden cardiac arrest. Third, the benign nature of early repolarization is challenged by experimental findings indicating the presence of a form of transmural electrical heterogeneity, which can be dramatically amplified under certain conditions (the use of specific drugs and various levels of autonomic tone and electrolytes) resulting in malignant arrhythmias.¹³ The potential arrhythmogenicity is thus dependent on defective modulation of repolarization, which is in accordance with the dynamic changes temporally related to arrhythmias that we observed in our case subjects.

The link between this electrocardiographic pattern and malignant arrhythmias is supported by both the accentuated repolarization before the onset of arrhythmia in the case subjects and the origin of triggering beats from the region of early repolarization. Quinidine, which has been shown to restore transmural electrical homogeneity and abort arrhythmic activity in this condition,¹³ diminished the electrocardiographic pattern and eliminated recurrent arrhythmias in four subjects.

Finally, although to our knowledge no multicenter study has specifically examined the association between early repolarization and sudden cardiac arrest, anecdotal reports (mostly from Southeast Asia) have described patients who had sudden cardiac arrest associated with abnormal J waves.¹⁶⁻²³ The repolarization abnormality that is recorded by inferolateral leads, as described in our report, may be a marker of underlying electrical vulnerability that increases the risk of fatal arrhythmias under conditions that need to be investigated. These conditions include the presence of genetic defects related to cardiac ion channels, as suggested by the fact that 10 of our case subjects had a family history of sudden cardiac arrest.

These findings are potentially relevant to the assessment of patients with syncope or a family history of sudden death. Arrhythmias that are related to a repolarization abnormality may be responsible for a proportion of unexplained deaths, predominantly in young men, as reported previously.²⁴⁻²⁶ Such arrhythmias may also be responsible for some undiagnosed causes of syncope that have been reported to increase the risk of premature death.²⁷

The results of our study, which require confirmation by other investigators, have several limitations. Although the cohort included subjects with strictly defined common features, data collection was not uniform among centers. In our study population, we had no subjects with structural heart disease and few athletes or blacks, so the results may not apply to these subgroups. Most important, although our results suggest that early repolarization is a marker of a disorder associated with malignant arrhythmias, natural-history studies predict a benign course for most of these patients. Further research is required to identify factors that modulate underlying arrhythmogenicity and to predict which patients are at risk.

In conclusion, this multicenter study showed a higher-than-expected prevalence of early repolar-

ization (as seen on inferolateral leads) in patients younger than 60 years of age who had idiopathic ventricular fibrillation that caused syncope and sudden cardiac arrest.

Dr. Haïssaguerre reports receiving grant support from Biosense Webster; Dr. Sacher, grant support from Medtronic and Guidant; Dr. Deisenhofer, lecture fees from Bard; Dr. Nogami, lecture fees from Medtronic, Guidant, and St. Jude Medical and grant support from the Japanese Ministry of Health; Dr. De Chillou, lecture fees from St. Jude Medical, Sanofi-Aventis, 3M, Biosense Webster, and Bard; Dr. Mabo, grant support from Medtronic, Sorin, St. Jude Medical, and Guidant; Dr. Schlaepfer, lecture fees from MSD, Medtronic, and Sanofi-Aventis; Dr. Lacroix, lecture fees from Biosense Webster, Medtronic, Servier, and Vitatron; Dr. O'Neill, lecture fees from Biosense Webster; Dr. Hocini, lecture fees from Bard; Dr. Veenhuyzen, lecture fees from Biosense Webster and Merck; Dr. Bordachar, consulting fees from Sorin; Dr. Jais, lecture fees from Biosense Webster and St. Jude Medical; and Dr. Clémenty, consulting fees from Medtronic and Sorin. No other potential conflict of interest relevant to this article was reported.

REFERENCES

- Zipes DP, Wellens HJJ. Sudden cardiac death. *Circulation* 1998;98:2334-51.
- Survivors of out-of-hospital cardiac arrest with apparently normal heart: need for definition and standardized clinical evaluation: consensus statement of the Joint Steering Committees of the Unexplained Cardiac Registry of Europe and of the Idiopathic Ventricular Fibrillation Registry of the United States. *Circulation* 1997;95:265-72.
- Huikuri HV, Castellanos A, Myerburg RJ. Sudden death due to cardiac arrhythmias. *N Engl J Med* 2001;345:1473-82.
- Wellens HJJ, Lemery R, Smeets JL, et al. Sudden arrhythmic death without overt heart disease. *Circulation* 1992;85:Suppl 1:I-92-I-97.
- Moss AJ, Schwartz PJ, Crampton RS, Locati E, Carleen A. The long QT syndrome: a prospective international study. *Circulation* 1985;71:17-21.
- Corrado D, Basso C, Thiene G. Sudden cardiac death in young people with apparently normal heart. *Cardiovasc Res* 2001;50:399-408.
- Viskin S, Belhassen B. Idiopathic ventricular fibrillation. *Am Heart J* 1990;120:661-71.
- Brugada J, Brugada R, Brugada P. Right bundle-branch block and ST-segment elevation in leads V1 through V3: a marker for sudden death in patients without demonstrable structural heart disease. *Circulation* 1998;97:457-60.
- Gaita F, Giustetto C, Bianchi F, et al. Short QT syndrome: a familial cause of sudden death. *Circulation* 2003;108:965-70.
- Antzelevitch C, Brugada P, Borggreff M, et al. 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. [Erratum, *Circulation* 2005;112(4):e74.]
- Klatsky AL, Oehm R, Cooper RA, Udaltova N, Armstrong MA. The early repolarization normal variant electrocardiogram: correlates and consequences. *Am J Med* 2003;115:171-7.
- Mehta M, Jain AC, Mehta A. Early repolarization. *Clin Cardiol* 1999;22:59-65.
- Gussak I, Antzelevitch C. Early repolarization syndrome: clinical characteristics and possible cellular and ionic mechanisms. *J Electrocardiol* 2000;33:299-309.
- Haïssaguerre M, Shoda M, Jais P, et al. Mapping and ablation of idiopathic ventricular fibrillation. *Circulation* 2002;106:962-7.
- Eisenberg MS, Mengert TJ. Cardiac resuscitation. *N Engl J Med* 2001;344:1304-13.
- Otto CM, Tauxe RV, Cobb LA, et al. Ventricular fibrillation causes sudden death in Southeast Asian immigrants. *Ann Intern Med* 1984;101:45-7.
- Aizawa Y, Tamura M, Chinushi M, et al. Idiopathic ventricular fibrillation and bradycardia-dependent intraventricular block. *Am Heart J* 1993;126:1473-4.
- Garg A, Finneran W, Feld KF. Familial sudden death associated with a terminal QRS abnormality on surface 12-lead electrocardiogram in the index case. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998;9:642-7.
- Kalla H, Yan GX, Marinchak R. Ventricular fibrillation in a patient with prominent J (Osborn) waves and ST segment elevation in the inferior electrocardiographic leads: a Brugada syndrome variant? *J Cardiovasc Electrophysiol* 2000;11:95-8.
- Takagi M, Aihara N, Takaki H, et al. Clinical characteristics of patients with spontaneous or inducible ventricular fibrillation without apparent heart disease presenting with J wave and ST-segment elevation in inferior leads. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2000;11:844-8.
- Daimon M, Inagaki M, Morooka S, et al. Brugada syndrome characterized by the appearance of J waves. *Pacing Clin Electrophysiol* 2000;23:405-6.
- Takeuchi T, Nato N, Kawamura Y, et al. A case of a short-coupled variant of torsades de pointes with electrical storm. *Pacing Clin Electrophysiol* 2003;26:632-6.
- Shinohara T, Takahashi N, Saikawa T, Yoshimatsu H. Characterization of J wave in a patient with idiopathic ventricular fibrillation. *Heart Rhythm* 2006;3:1082-4.
- Loire R, Tabib A. Unexpected sudden cardiac death: an evaluation of 1000 autopsies. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1996;89:13-8. (In French.)
- Behr ER, Casey A, Sheppard M, et al. Sudden arrhythmic death syndrome: a national survey of sudden unexplained cardiac death. *Heart* 2007;93:601-5.
- Tester DJ, Ackerman MJ. Postmortem long QT genetic testing for sudden unexplained death in the young. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:240-6.
- Soteriades ES, Evans JC, Larson MG, et al. Incidence and prognosis of syncope. *N Engl J Med* 2002;347:878-85.

Copyright © 2008 Massachusetts Medical Society.

II.2.2- Etude génétique du syndrome

Afin d'élucider les bases moléculaires de ce nouveau syndrome, l'étude génétique a été abordée par une approche gène candidat sur des patients isolés, et une approche familiale. L'approche familiale a consisté à étudier une famille présentant de nombreux cas de mort subite cardiaque et qui comprend au moins deux patients dont l'ECG est évocateur d'un syndrome de repolarisation précoce maligne. Pour cette famille, la famille B, plusieurs loci candidats ont été exclus par génotypage puis une analyse de liaison pan-génomique avec des SNP a été réalisée.

II.2.2.1- Approche gène candidat : étude de cas isolés

Etant donné l'aspect électrocardiographique observé, les mécanismes responsables de la repolarisation précoce pourraient impliquer une modification du gradient transmural de la repolarisation à travers la paroi ventriculaire, causée par un défaut du potentiel d'action épicaudique. Ce défaut pourrait être causé par une augmentation en courant I_{to} , I_{Kr} , I_{Ks} , $I_{Cl(Ca)}$, I_{KAch} , I_{KATP} et/ou une diminution en courant entrant retardé I_{Na} et/ou I_{Ca} . Les gènes à séquencer en priorité en plus des gènes impliqués dans des formes de fibrillation ventriculaire (syndrome du QT long, syndrome du QT court, et syndrome de Brugada) étaient donc les canaux K_{ATP} , K_{ACh} , les canaux responsables du courant I_{to} et leurs protéines régulatrices, et les canaux calciques. Le Tableau 11 liste les gènes criblés à ce jour au laboratoire chez des patients sporadiques (mars 2008).

Tableau 11 – Gènes séquencés chez les patients présentant un syndrome de repolarisation précoce

Gène	Protéine / Fonction	Nb patients
<i>KCNQ1*</i>	K_vLQT1 ou $K_v7.1$ (canal potassique α), repolarisation/ I_{Ks}	3
<i>KCNH2*</i>	HERG ou $K_v11.1$ (canal potassique α), repolarisation/ I_{Kr}	4
<i>KCNE1*</i>	minK ou Isk (canal potassique β), repolarisation/ I_{Ks}	3
<i>KCNE2*</i>	MiRP1 (canal potassique β), repolarisation/ I_{Kr}	3
<i>KCND2</i>	$K_v4.2$ (canal potassique α), repolarisation/ $I_{to,f}$	8
<i>KCND3</i>	$K_v4.3$ (canal potassique α), repolarisation/ $I_{to,f}$	8
<i>KCNJ2*</i>	$Kir2.1$ (canal potassique α), repos, repolarisation/ I_{K1}	3
<i>KCNJ3</i>	$Kir3.1$ (canal potassique α), repos, courant rectifiant entrant I_{KAch}	18
<i>KCNJ5</i>	$Kir3.4$ (canal potassique α), repos, courant rectifiant entrant I_{KAch}	18
<i>KCNJ8</i>	$Kir6.1$ (canal potassique α), repos, courant rectifiant entrant I_{KATP}	18
<i>KCNJ11</i>	$Kir6.2$ (canal potassique α), repos, courant rectifiant entrant I_{KATP}	18
<i>CACNA1C*</i>	$Ca_v1.2$ (canal calcique α_1C), dépolarisation/ I_{Ca-L}	18
<i>CACNB2*</i>	$Ca_v\beta_2b$ (canal calcique β_2b), dépolarisation/ I_{Ca-L}	18
<i>SCN5A*</i>	$Na_v1.5$ (canal sodique α), dépolarisation/ I_{Na}	5
<i>SCN1B*</i>	$Na_v\beta_1$ (canal sodique β), régulation de I_{Na}	3
<i>ANK2*</i> (exons 35-46)	ankyrine-B, ancrage/ $I_{Na/Ca}$	4
<i>KCNIP2</i>	K_v Channel Interacting Protein 2, modulation des canaux potassiques	8
<i>IRX3</i>	Iroquois Homeobox 3, facteur de transcription	14
<i>IRX5</i>	Iroquois Homeobox 5, facteur de transcription	18

Les gènes marqués d'un * sont impliqués dans des arythmies cardiaques (paragraphe I.2, page 32 ; *SCN1B* : paragraphe II.3.2, page 128). Nb patients : Nombre de patients criblés.

Le séquençage des gènes *CACNA1C* et *CACNB2* a été réalisé par Simon Lecointe, technicien dans l'équipe, et le séquençage des gènes *KCNJ3,5,8,11* et *IRX3,5* par Stéphanie Chatel, étudiante en thèse dans l'équipe. Deux variants ont été identifiés chez deux patients isolés : un dans le gène *CACNA1C* (c.5149G>A ; p.Ala1717Thr), et un dans le gène *KCNJ8* (c.1265C>T ; p.Ser422Leu). Ces variants n'ont pas été trouvés chez 288 et 192 individus contrôles respectivement. Les études pour caractériser leurs effets fonctionnels sont en cours par la technique de *patch-clamp*. Une des patientes a également été criblée à Münster par l'équipe d'Eric Schulze-Bahr pour les gènes suivants : *CALR* (calréticuline), *CASQ2* (calséquestrine 2), *NCX1* (échangeur Na/Ca). Le séquençage d'autres gènes candidats va se poursuivre sur la cinquantaine de patients « syndrome de repolarisation précoce » français et étrangers adressés au CHU de Nantes et sur des cohortes de patients « FV idiopathiques ».

II.2.2.2- Approche familiale : étude de la famille B

1- Etude clinique de la famille B

La famille B est originaire de Mayenne et est suivie par le Professeur Philippe Mabo à Rennes (Figure 21, Tableau 12). Dans cette famille, 11 adultes ont été victime d'une mort subite (dont une récupérée, Ind V-17). Le jeune âge des victimes (7 patients avaient moins de 35 ans, âge moyen : 42 ± 21 ans) et l'autopsie réalisée chez 3 patients (Ind V-3, V-9, V-23) qui n'a décelé aucune anomalie structurale cardiaque sont en faveur d'une mort subite cardiaque par arythmie. L'aspect électrocardiographique de deux patients de la famille (Figure 22), typique du syndrome de repolarisation précoce maligne décrit par Michel Haissaguerre (**Article 3, page 115**), conforte cette hypothèse. Une patiente (Ind V-17) était porteuse d'un défibrillateur pour une mort subite récupérée en 1991, présentait de nombreux orages rythmiques, et a succombé en 2002 à une infection alors qu'elle était sous double assistance circulatoire. Un enregistrement pendant un épisode de fibrillation ventriculaire est illustré en Figure 22. L'autre patient est un homme âgé actuellement de 23 ans (Ind V-5) qui ne se plaint d'aucun symptôme. Le contexte de mort subite est variable selon les patients : quatre sont survenues la nuit pendant leur sommeil (Ind II-1 à 72 ans ; Ind V-9, à 33 ans ; Ind V-22, à 28 ans ; Ind V-23, à 27 ans), une au coucher (Ind III-3, à 49 ans), et six sans contexte particulier connu (Ind III-10, à 70 ans ; Ind III-13, à 75 ans ; Ind IV-17, à 32 ans ; Ind V-3, à 21 ans ; Ind V-14, à 20 ans ; Ind V-17, à 34 ans).

Ces événements peu communs et concentrés dans une même famille suggèrent un caractère héréditaire à cette mort subite. La famille nous a donc été adressée pour identifier le défaut génétique potentiellement responsable d'un trouble du rythme apparaissant sans signe précurseur, et fatal.

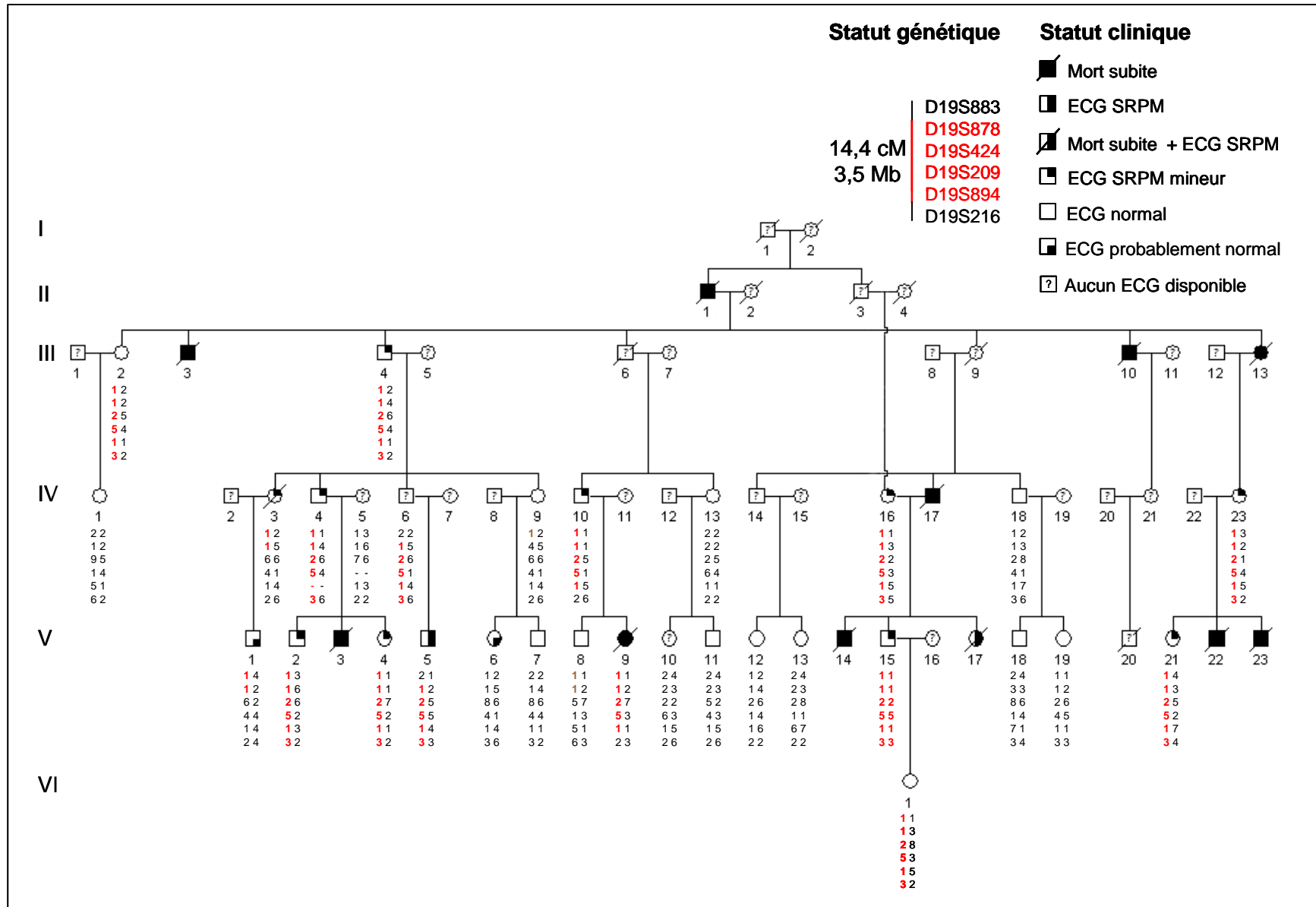


Figure 21 – Arbre généalogique de la famille B montrant un haplotype commun aux individus considérés atteints pour l'analyse de liaison en 19p13.3

Il faut noter un cas de consanguinité : l'individu IV-17 a épousé l'individu IV-16, cousine de sa mère. Un de leurs enfants, l'individu V-15, est homozygote pour l'haplotype morbide. Leurs deux autres enfants sont décédés (Individus V-14 et V-17). SRPM : Syndrome de repolarisation précoce maligne.

Tableau 12 – Caractéristiques cliniques des individus de la famille B

Individu	Age actuel	Circonstance décès	ECG	Défibrillateur (âge)
II-1	† (72)	MS nuit	-	non
III-3	† (49)	MS au coucher	-	non
III-4*	86	-	SRPM mineur	non
III-6	† (68)	infarctus du myocarde	-	non
III-9	† (75)	-	-	non
III-10	† (70)	MS	-	non
III-13	† (75)	MS	-	non
IV-3*	† (58)	tumeur au cerveau	SRPM mineur	non
IV-4*	61	-	SRPM mineur	non
IV-6*	53	-	SRPM mineur	non
IV-10*	61	-	SRPM mineur	non
IV-16*	76	-	SRPM mineur	non
IV-17	† (32)	MS	-	non
IV-21	54	-	refus	non
IV-23*	69	-	SRPM mineur	non
V-1*	37	-	probablement normal	non
V-2*	36	-	SRPM mineur	oui (33)
V-3	† (21)	MS (autopsie blanche)	-	non
V-4*	31	-	SRPM mineur	non
V-5*	23	-	SRPM	non
V-9**	† (33)	MS nuit (autopsie blanche)	-	non
V-14	† (20)	MS	-	non
V-15*	48	-	SRPM mineur	non
V-17	† (45)	hospitalisée pour orages rythmiques (MS récupérée à 34 ans)	SRPM, FV	oui (34)
V-20	† (7 semaines)	MS nourrisson ?	-	non
V-21*	41	-	SRPM mineur	non
V-22	† (28)	MS nuit	-	non
V-23	† (27)	MS nuit (autopsie blanche)	-	non
VI-1*	19	-	normal	non

Sont indiqués uniquement les individus atteints, probablement atteints, ou transmetteurs obligatoires. MS : Mort subite, SRPM : Syndrome de repolarisation précoce maligne. FV : Fibrillation ventriculaire. Les étoiles indiquent les individus pour lesquels un prélèvement d'ADN a été collecté, à partir de sang (*) ou d'une biopsie (**).

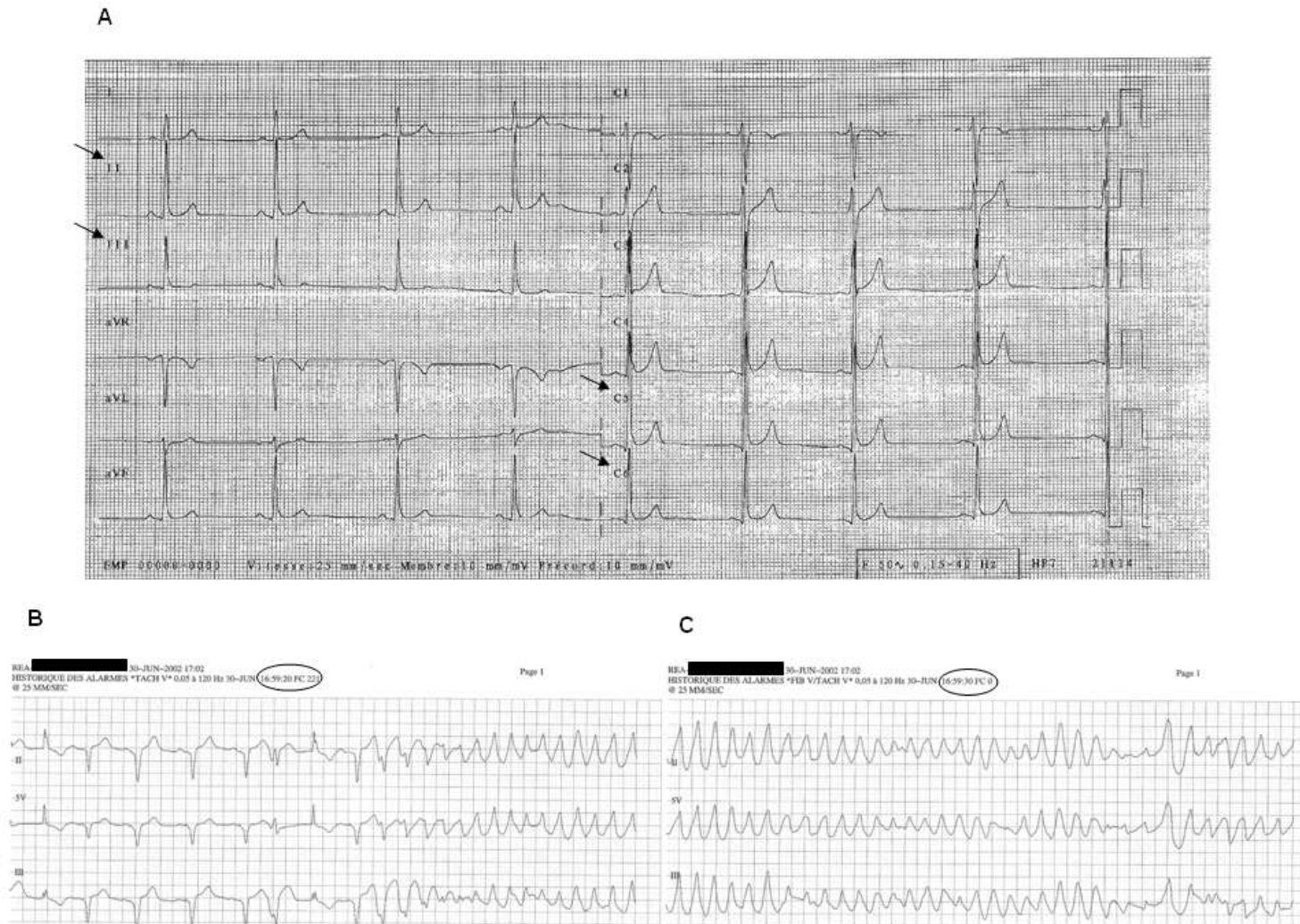


Figure 22 – ECG de deux patients de la famille B montrant syndrome de repolarisation précoce maligne ou tachycardie/fibrillation ventriculaire

A : Repolarisation précoce chez l'individu V-5 (20 ans). B : TV induite par des extrasystoles ventriculaires chez l'individu V-17 hospitalisée aux soins intensifs pour épisodes de FV répétés (45 ans). C : Quelques secondes plus tard, la TV dégénère en FV (Individu V-17, 45 ans).

La difficulté majeure pour étudier génétiquement cette famille est que les patients « atteints » sont décédés et on ne dispose pas de leur ADN. Un travail important a été réalisé par Christine Poulain, infirmière de recherche clinique à Rennes, pour contacter tous les membres de la famille, parfois transmetteurs, ce qui nous a permis d'obtenir 30 prélèvements d'ADN.

Pour l'étude génétique, nous avons fait l'hypothèse que dans cette famille, la présence de l'anomalie décrite récemment par l'équipe de Michel Haissaguerre (syndrome de repolarisation précoce maligne, SRPM) et la mort subite étaient liées, et qu'on pouvait ainsi considérer comme phénotypiquement atteints les patients présentant une encoche au niveau du complexe QRS. En effet, les individus « transmetteurs », parents ou grands-parents de patients décédés subitement, présentent de façon plus ou moins marquée une légère anomalie de ce type à l'ECG (« SRPM mineur », Figure 21, Tableau 12).

2- Etude génétique de la famille B

Parallèlement à l'approche gène candidat réalisée chez les cas sporadiques de syndrome de repolarisation précoce maligne (paragraphe II.2.2.1, page 116), j'ai exclu par génotypage les gènes *CACNA1G*, *CACNA1H*, *CACNA1D*, *CACNA2D2* (canaux calciques), *ANK2* (protéine d'ancrage), *ABCC9* (*SUR2A*, protéine régulatrice des canaux potassiques ATP-dépendants), *CX40*, *CX37*, *CX43*, *CX45* (connexines), *TGF-β3*, *RYR2*, *DSP*, *PKP2*, *DSC2* et *DSG2* (gènes impliqués dans la dysplasie arythmogène du ventricule droit, [revue par van Tintelen *et al.*, 2007]).

Après exclusion de ces gènes, une analyse de liaison pan-génomique a été réalisée avec des puces SNP sur la plate-forme IFR26 de Nantes, par Martine Le Cunff (puce 250K Nsp I, Affymetrix, protocole en annexe F-II.1.2.4, page 197, Figure 46).

Le *LOD score* théorique maximum pour cette famille était de 5,5 (pénétrance de 90%), en considérant comme phénotypiquement atteints douze individus pour lesquels un prélèvement d'ADN était disponible, selon les critères suivants :

- 1) a succombé à une mort subite (Ind V-9)
- 2) présente à l'ECG un syndrome de repolarisation précoce maligne (Ind V-5)
- 3) présente à l'ECG une forme mineure du syndrome de repolarisation précoce maligne (Ind V-2, V-4, V-15, V-21)
- 4) est transmetteur obligatoire du gène muté responsable de la mort subite ou de la repolarisation précoce maligne (Ind III-4, IV-4, IV-6, IV-10, IV-16, IV-23).

L'analyse de liaison à partir de ces 262 000 génotypes par individu a été réalisée par Tim Strom (Helmholtz-Centre, Munich, Allemagne) avec l'algorithme Merlin (annexe F-II.1.2.4, page 197). Compte tenu de la grande taille de cette famille pour une analyse multi-point, l'ensemble du pedigree n'a pas été inclus dans les calculs. Pour tenir compte des déséquilibres de liaison et en éliminant les marqueurs non informatifs ou présentant des erreurs mendéliennes, l'analyse a porté sur :

Configuration ① : ~30 000 marqueurs SNP (~12% des marqueurs de la puce) pour une analyse incluant 11 patients (Ind V-9 non génotypée par puce SNP pour des raisons techniques liées au prélèvement) et 7 individus sains.

Configuration ② : ~20 000 marqueurs (~8% des marqueurs de la puce) pour une analyse incluant uniquement les patients (*affected-only*).

Ces deux analyses ont mis en évidence une région significativement liée avec le phénotype atteint sur le chromosome 19 en 19p13.3. Le *LOD score* maximum avec Merlin était de 3,9 pour l'analyse avec la **configuration ①** et de 3,4 pour la **configuration ②** (Figure 23). Le calcul de *LOD score* avec l'algorithme Allegro a donné des résultats similaires. J'ai ensuite génotypé 6 marqueurs microsatellites qui ont confirmé la liaison (région maximale de 3,5 Mb, Figure 21), notamment pour la patiente V-9 dont l'ADN extrait d'une biopsie (mort subite à 33 ans) était de qualité suffisante pour génotyper ce type de marqueurs. Le *LOD score* maximum a été obtenu pour le marqueur D19S209 ($Z_{\max}=3,3$ à $\theta=0$ pour une pénétrance de 90%, *LOD score* deux-point). Deux patientes sont non-pénétrantes puisqu'elles sont porteuses de l'haplotype morbide mais *a priori* saines (Ind III-2 et VI-1). Récemment, un ECG a pu être obtenu pour la patiente IV-3, qui possède uniquement la partie haute de l'haplotype. L'ECG montre qu'elle présentait une forme mineure du SRPM. Son fils qui possède également le haut de l'haplotype (Ind V-1) a un ECG difficilement interprétable.

Cette région est délimitée à 3,5 Mb par microsatellites (95 gènes annotés) et 1,9 Mb par les SNP (47 gènes annotés). J'ai exclu 6 gènes candidats de l'intervalle de 1,9 Mb par séquençage direct des régions codantes des gènes *GNG7*, *GNA11*, *GNA15* (petites protéines G, transduction du signal), *JSRP1* (protéine du réticulum sarcoplasmique dans le muscle squelettique, impliquée dans le métabolisme calcique), *LMNB2* (lamine B2, la lamine A étant associée à des cardiomyopathies), et *OAZ1* (*ornithine decarboxylase antizyme 1*, pour laquelle un polymorphisme est associé à la maladie coronarienne). Je vais séquencer prochainement les gènes *DIRAS1* (famille des GTPases Ras) et *APBA3* (*amyloid beta precursor protein-binding*, trafic et interaction probable avec les canaux ioniques).

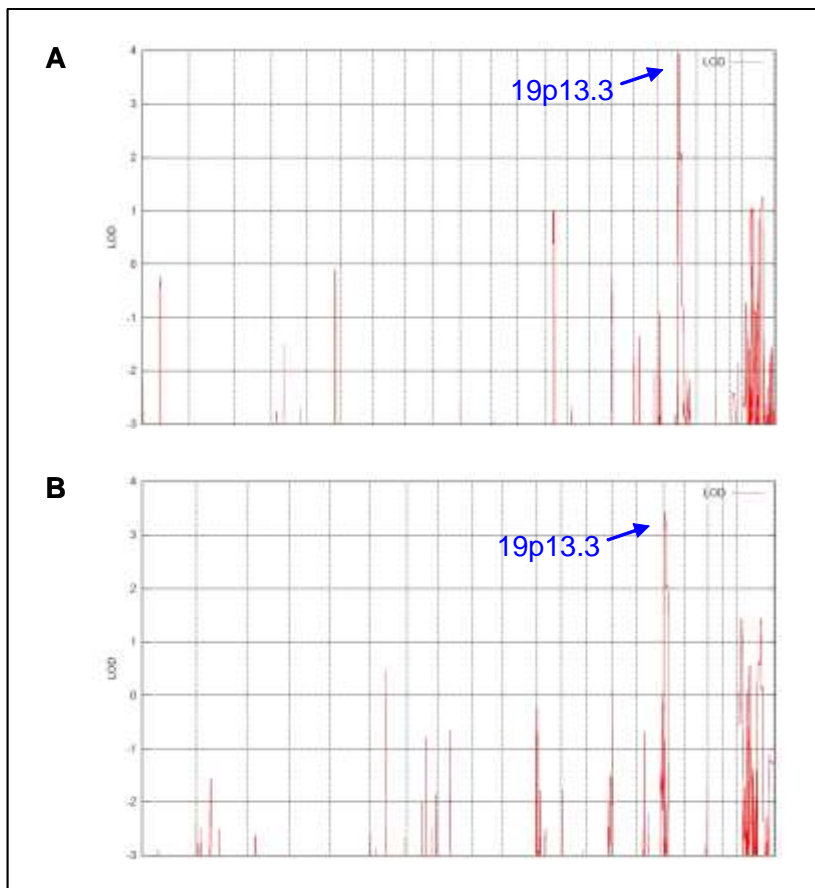


Figure 23 – Représentation des valeurs de *LOD* scores multi-point obtenues par analyse paramétrique des SNP sur la famille B avec l’algorithme Merlin

A : Configuration ① (11 patients, 7 individus sains).

B : Configuration ② (« affected-only », 11 patients).

II.2.3- Discussion (projet #2, étude génétique d'un syndrome de repolarisation précoce maligne)

Les tachyarythmies ventriculaires qui surviennent sur cœur sain sont liées à des anomalies de la repolarisation (syndrome du QT long/court, syndrome de Brugada) ou n'ont pas de manifestation identifiable sur l'ECG et sont donc décrits comme des FV idiopathiques.

Les précédentes données cliniques suggéraient que le syndrome de repolarisation précoce était bénin. Cette forme n'est pas considérée comme arythmogène car il n'y a pas de dispersion transmurale et épicaudique significative ce qui ne crée pas de substrat pour des ré-entrées de phase 2 du potentiel d'action, ne menant donc pas à la FV (paragraphe I.2.3, page 38). L'**Article 3** présente une nouvelle forme de repolarisation précoce, avec une anomalie particulière dans les dérives inférieures et/ou latérales sur l'ECG présente chez 31% des 206 patients « FV idiopathiques » inclus dans l'étude. Comme dans le syndrome de Brugada (SBr), il existe une prédominance masculine. L'élévation du point J et du segment ST observés chez les patients présentant une repolarisation précoce maligne pourraient impliquer des mécanismes similaires à ceux décrits pour le SBr.

A l'image des différentes hypothèses sur les mécanismes physiopathologiques du SBr, ce qui détermine le potentiel arythmogène de la repolarisation précoce maligne est pour l'instant inconnu. Contrairement au SBr et d'autres troubles où les arythmies naissent principalement du ventricule droit, les foyers ectopiques semblent se situer dans le ventricule gauche dans le cas du syndrome de repolarisation précoce maligne. On pourrait soupçonner des canaux dont l'expression est prédominante dans le ventricule gauche. Cependant l'expérience du SBr montre que l'augmentation ou la diminution de densité de courant à cause d'une mutation peut créer un déséquilibre d'autres courants dont l'expression variable selon les régions du cœur va créer des anomalies dans ce compartiment. En effet, l'expression du gène *SCN5A*, impliqué dans le syndrome de Brugada chez ~15-25% des patients, n'est pas différente entre ventricule gauche et ventricule droit. La prédominance des anomalies dans le ventricule droit serait due à un courant I_{to} plus fort dans ce compartiment. Aucune mutation n'a été identifiée à ce jour dans les gènes codant pour les canaux responsables du courant I_{to} , et ces gènes ne sont donc *a priori* pas des gènes majeurs de SBr. Les gènes déjà impliqués dans les tachyarythmies ventriculaires ne semblent pas fréquemment impliqués dans le syndrome de repolarisation précoce puisque aucune mutation n'a été identifiée par séquençage. En plus des canaux ioniques, les protéines partenaires de canaux ioniques, qui pourraient perturber leur trafic à la membrane ou leur fonction sont également de bons candidats. L'identification d'un premier gène donnerait des indices importants sur les mécanismes physiopathologiques.

La recherche de mutations se poursuit par l'approche gène candidat, mais l'identification de deux patients d'une même famille présentant l'anomalie électrocardiographique décrite dans l'**Article 3** est une bonne opportunité de pouvoir identifier ce premier gène. Dans cette famille B, on recense 11 cas de mort subite à l'âge adulte, dont 7 avaient moins de 35 ans. Une analyse de liaison pan-génomique avec des marqueurs SNP a permis d'identifier un locus sur le chromosome 19 (19p13.3).

Dans l'intervalle de liaison, il n'y a pas de gènes codant pour des canaux ioniques. Je suis actuellement en train de poursuivre le séquençage de gènes de l'intervalle, notamment du gène *APBA3* (*amyloid beta A4 precursor protein-binding, family A, member 3 ou X11-like 2*), dont l'expression est ubiquitaire. De part son interaction avec le précurseur de l'amyloïde β , c'est un gène candidat pour la maladie d'Alzheimer. Il est le troisième membre identifié dans la famille des protéines Mint (Mint3), essentiellement neuronales, qui sont impliquées dans le trafic [Shrivastava-Ranjan *et al.*, 2008 ; Sumioka *et al.*, 2008] et l'ancrage de protéines membranaires. De façon intéressante, ils interagissent avec les canaux ioniques : **Mint1** avec le canal calcique $\alpha 1B$ au niveau des synapses [Maximov *et al.*, 1999] et avec le canal potassique Kir2.2 dans le coeur [Leonoudakis *et al.*, 2004a ; Leonoudakis *et al.*, 2004b] et **Mint2** avec HCN2 [Kimura *et al.*, 2004]. Leur capacité d'interagir avec de nombreuses protéines est notamment possible grâce à deux domaines PDZ et un domaine PID (*Phosphotyrosine Interaction Domain*). **Mint3 (APBA3)** pourrait interagir via ce domaine PDZ avec $Na_v1.5$ (*SCN5A*) [Gee *et al.*, 1998] ou des canaux potassiques importants dans l'activité électrique cardiaque.

L'identification d'autres familles de ce nouveau syndrome de repolarisation précoce associé à la mort subite pourrait permettre de conforter ce locus en 19p13.3. Tout récemment, une seconde famille a été identifiée et elle est actuellement en cours de recrutement par Michel Haissaguerre (CHU Bordeaux). Il s'agit d'une fratrie de 10 individus dont 3 ont été victimes d'une mort subite. Un de ces 3 patients a pu être réanimé et son ECG montre un aspect de repolarisation précoce. Parmi les 7 autres individus de la fratrie, six présentent un aspect de repolarisation précoce. L'analyse génétique de cette seconde famille sera réalisée au laboratoire.

En conclusion, ce nouveau syndrome de repolarisation précoce associée à une forte incidence de fibrillation ventriculaire est une nouvelle explication pour les FV idiopathiques. L'élucidation des mécanismes physiopathologiques aiderait au choix des traitements anti-arythmiques en plus du défibrillateur chez les patients à haut risque (anomalie électrocardiographique très marquée). Les différentes hypothèses pourront être orientées par l'identification de gènes à l'origine de la FV, que ce soit par l'approche gène candidat ou l'approche familiale.

II.3- Projet #3 : Recherche de nouveaux gènes pour le syndrome de Brugada

II.3.1- Etude #3a : Importance du fond génétique

Les patients atteints d'un syndrome de Brugada (SBr) ont un risque élevé de mort subite par fibrillation ventriculaire lorsqu'ils sont symptomatiques. Un premier gène a été identifié en 1998 par une approche gène candidat : *SCN5A* [Chen *et al.*, 1998]. Il était déjà impliqué dans un autre type de FV lié à un défaut de repolarisation : le syndrome du QT long [Wang *et al.*, 1995]. Aucun autre gène majeur n'a été identifié depuis. Cependant, seuls ~15-25% des patients SBr ont une mutation dans ce gène et les études familiales montrent une faible pénétrance des mutations chez les apparentés.

Une petite famille de 7 patients présentant un aspect électrocardiographique de syndrome de Brugada nous a été adressée pour l'analyse génétique (Famille J, Figure 24). Dans un premier temps, j'ai génotypé des marqueurs microsatellites au locus de *SCN5A* et exclu le gène puisqu'une patiente atteinte (Individu III-6) ne partageait pas l'haplotype commun aux 6 autres patients. J'ai tout de même séquencé le gène et identifié chez le propositus une mutation (c.1983-1993dup) qui crée une protéine tronquée et conduit certainement à une haploinsuffisance. Les autres patients sont porteurs de la mutation à l'exception de la patiente III-6 (Figure 24).

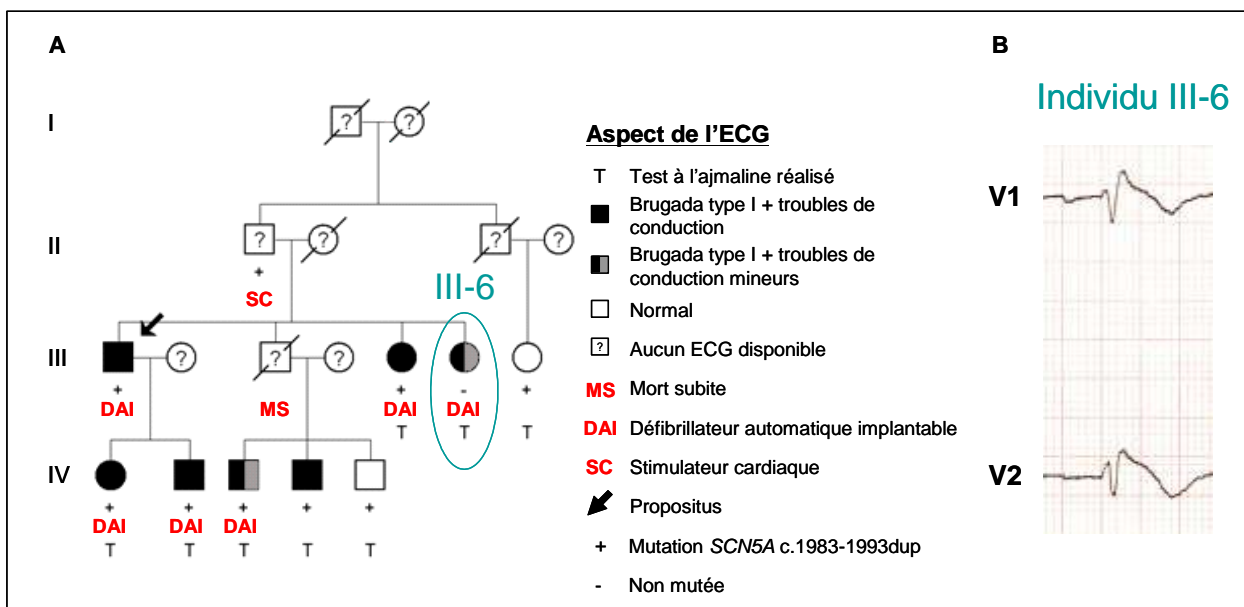


Figure 24 – Absence de la mutation familiale *SCN5A* chez une patiente présentant un SBr

A : Arbre généalogique de la famille J. La patiente III-6 n'a pas la mutation *SCN5A* présente chez les autres membres de la famille atteints d'un SBr. **B** : ECG de la patiente III-3 montrant l'aspect de syndrome de Brugada type I.

Ce défaut de ségrégation a été observé dans d'autres familles. Ces travaux font l'objet d'un manuscrit en préparation :

Probst V, Wilde AA*, Sacher F, Babuty D, Mabo P, Mansourati J, Le Scouarnec S, Barc J, Kyndt F, Bezieau S, Meregalli PG, Schott JJ, Tan HL, Le Marec H. *Contribution équivalente. SCN5A and the role of genetic background in the pathophysiology of Brugada syndrome.*

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'association entre mutations *SCN5A* et SBr et plus particulièrement dans 13 familles où au moins 4 individus étaient porteurs de la mutation familiale. Le phénotype majeur chez les patients mutés est la présence de troubles de conduction. Dans cinq de ces familles, au moins un patient atteint d'un SBr ne portait pas la mutation familiale. Parmi ces 7 patients, 4 ont un défibrillateur, 3 présentaient un ECG de SBr à l'état basal, et un était symptomatique. L'incidence faible du syndrome de Brugada, maladie rare, réduit la probabilité que ces patients soient des phénocopies.

Cette étude suggère que le fond génétique suffit à induire un syndrome de Brugada, même en l'absence de mutation *SCN5A*. Ces cinq familles, dont la famille J, seront intéressantes à étudier pour identifier des gènes modificateurs.

II.3.2- Etude #3b : Approche gène candidat : la sous-unité $\beta 1$ du canal sodique

II.3.2.1- Article 4 : Objectifs

Le gène *SCN5A*, qui code pour le canal sodique cardiaque majoritaire $Na_v1.5$, est impliqué dans de nombreuses pathologies cardiaques : les troubles de conduction (progressifs ou non), le syndrome de Brugada, la dysfonction sinusale, les cardiomyopathies dilatées avec arythmie auriculaire, la fibrillation ventriculaire idiopathique (mutations « perte de fonction »), et le syndrome du QT long congénital de type 3 (mutations « gain de fonction »). Quatre sous-unités régulatrices β de ce canal ont été identifiées à ce jour (Tableau 9, page 53) et sont codées par les gènes *SCN1B-4B*. Cette étude dont les résultats sont présentés dans l'**Article 4, page 130**, avait pour objectif de cribler les deux transcrits résultant d'un épissage alternatif du gène *SCN1B*, l'isoforme classique $\beta 1$, et l'isoforme $\beta 1B$ (**Figure 1, Article 4**) chez des cas index atteints de syndrome de Brugada ou de troubles de conduction.

II.3.2.2- Article 4 : Résultats

Trois variants rares ont été identifiés parmi les 282 propositus « syndrome de Brugada » et les 44 propositus « troubles de conduction » (**Figure 2, Article 4**) :

- un variant dans l'isoforme $\beta 1$ (c.259G→C, exon 3 ; **p.Glu87Gln** ; propositus turc atteint de troubles de conduction),
- deux variants dans l'isoforme $\beta 1B$ (c.536G→A et c.537G→A, exon 3A ; **p.Trp179X** ; propositus français atteint de syndrome de Brugada/troubles de conduction, et propositus hollandais atteint de troubles de conduction, respectivement).

J'ai étudié le taux d'expression du gène par PCR quantitative en temps réel (protocole en annexe F-II.3.3, page 205, Figure 49), et montré que dans le cœur humain sain, les deux isoformes sont exprimées, bien que l'isoforme $\beta 1B$ soit exprimée très faiblement. Le taux de transcrite des sous-unités $\beta 1$ et $\beta 1B$ est plus important dans les fibres de Purkinje que dans le ventricule (**Figure 3, Article 4**), ce qui pourrait expliquer les troubles de conduction observés chez les patients. Les études électrophysiologiques montrent que les variants abolissent l'augmentation du courant sodique observée en présence de $\beta 1$ ou $\beta 1B$ sauvage *in vitro* (**Figures 4-5, Article 4**). Ces résultats font suite à une collaboration entre plusieurs laboratoires de recherche, dans le cadre du réseau transatlantique d'excellence de la fondation Leducq « *Alliance Against Sudden Cardiac Death* ». Le séquençage des patients a

été réalisé à Nantes et à Amsterdam, le séquençage des individus contrôles a été réalisé à Munich, l'analyse du taux de transcrit des sous-unités $\beta 1$ et $\beta 1B$ à Nantes, et les expériences d'électrophysiologie à Nashville.

L'identification de variants dans les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 1B$ chez six patients (3 familles) atteints de troubles de conduction, et un patient atteint de syndrome de Brugada, associée aux données d'expression des transcrits et des données électrophysiologiques, font du gène *SCN1B* un nouveau gène de syndrome de Brugada et de troubles de conduction.

Article 4

Sodium channel β 1-subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans

Hiroshi Watanabe^{*1,2}, Tamara T. Koopmann^{*3}, Solena Le Scouarnec^{*4,5,6}, Tao Yang¹, Christiana R. Ingram¹, Jean-Jacques Schott^{4,5,6,7}, Sophie Demolombe^{4,5,6}, Vincent Probst^{4,5,6,7}, Frédéric Anselme⁸, Denis Escande^{4,5,6,7}, Ans C.P. Wiesfeld⁹, Arne Pfeufer^{10,11}, Stefan Kääh¹², H-Erich Wichmann^{11,12}, Can Hasdemir¹³, Yoshifusa Aizawa², Arthur A.M. Wilde³, Dan M. Roden¹, Connie R. Bezzina³

*Contribution équivalente

The Journal of Clinical Investigation (2008), 118:2260-2268

¹Department of Medicine, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN, Etats-Unis

²Division of Cardiology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japon

³Heart Failure Research Center, Department of Experimental Cardiology, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, Pays-Bas

⁴INSERM, U915, Nantes, France

⁵Université de Nantes, Faculté de Médecine, l'institut du thorax, Nantes, France

⁶CNRS, ERL3147, Nantes, France

⁷CHU Nantes, l'institut du thorax, Service de cardiologie, Nantes, France

⁸CHU Rouen, Département de cardiologie, Rouen, France

⁹Department of Cardiology, Thoraxcenter, University Medical Center Groningen, Groningen, Pays-Bas

¹⁰Institut für Humangenetik, TUM Munich, Allemagne

¹¹GSF Forschungszentrum, Neuherberg, Allemagne

¹²LMU University, Munich, Allemagne

¹³Department of Cardiology, Ege University School of Medicine, Izmir, Turquie



Sodium channel $\beta 1$ subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans

Hiroshi Watanabe,^{1,2} Tamara T. Koopmann,³ Solena Le Scouarnec,^{4,5,6} Tao Yang,¹ Christiana R. Ingram,¹ Jean-Jacques Schott,^{4,5,6,7} Sophie Demolombe,^{4,5,6} Vincent Probst,^{4,5,6,7} Frédéric Anselme,⁸ Denis Escande,^{4,5,6,7} Ans C.P. Wiesfeld,⁹ Arne Pfeufer,^{10,11} Stefan Kääh,¹² H.-Erich Wichmann,^{11,12} Can Hasdemir,¹³ Yoshifusa Aizawa,² Arthur A.M. Wilde,³ Dan M. Roden,¹ and Connie R. Bezzina³

¹Department of Medicine and Pharmacology, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee, USA. ²Division of Cardiology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan. ³Heart Failure Research Center, Department of Experimental Cardiology, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands. ⁴INSERM, UMR915, l'institut du thorax, Nantes, France. ⁵Université de Nantes, Nantes, France. ⁶CNRS ERL3147, Nantes, France. ⁷CHU Nantes, l'institut du thorax, Service de Cardiologie, Nantes, France. ⁸CHU Rouen, Département de Cardiologie, Rouen, France. ⁹Department of Cardiology, Thoraxcenter, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands. ¹⁰Institut für Humangenetik, Technical University of Munich, Munich, Germany. ¹¹Helmholtz Zentrum Munich, German Research Center for Environmental Health, Neuherberg, Germany. ¹²Department of Medicine I, Ludwig-Maximilians-University Munich, Klinikum Großhadern, Munich, Germany. ¹³Department of Cardiology, Ege University School of Medicine, Izmir, Turkey.

Brugada syndrome is a genetic disease associated with sudden cardiac death that is characterized by ventricular fibrillation and right precordial ST segment elevation on ECG. Loss-of-function mutations in *SCN5A*, which encodes the predominant cardiac sodium channel α subunit $\text{Na}_v1.5$, can cause Brugada syndrome and cardiac conduction disease. However, *SCN5A* mutations are not detected in the majority of patients with these syndromes, suggesting that other genes can cause or modify presentation of these disorders. Here, we investigated *SCN1B*, which encodes the function-modifying sodium channel $\beta 1$ subunit, in 282 probands with Brugada syndrome and in 44 patients with conduction disease, none of whom had *SCN5A* mutations. We identified 3 mutations segregating with arrhythmia in 3 kindreds. Two of these mutations were located in a newly described alternately processed transcript, $\beta 1B$. Both the canonical and alternately processed transcripts were expressed in the human heart and were expressed to a greater degree in Purkinje fibers than in heart muscle, consistent with the clinical presentation of conduction disease. Sodium current was lower when $\text{Na}_v1.5$ was coexpressed with mutant $\beta 1$ or $\beta 1B$ subunits than when it was coexpressed with WT subunits. These findings implicate *SCN1B* as a disease gene for human arrhythmia susceptibility.

Introduction

Voltage-gated sodium channels are critical for the generation and propagation of the cardiac action potential, and mutations in *SCN5A*, the gene encoding the major pore-forming sodium channel α subunit in the heart ($\text{Na}_v1.5$), cause multiple cardiac arrhythmia syndromes (1–4). Mutations producing enhanced inward current during the course of the action potential plateau, often as a consequence of destabilized fast inactivation of the channel, cause long QT syndrome type 3 (LQT3; OMIM 603830) (1). On the other hand, a reduction in sodium current leads to cardiac conduction disease, which may be progressive (OMIM 113900) (2, 3), and Brugada syndrome (OMIM 601144), characterized by ST segment elevation in the right precordial leads (V1 to V3) of the 12-lead ECG and episodes of ventricular fibrillation (4). Multiple mechanisms have been described that reduce sodium current in these syndromes, including altered gating of the channel or reduced cell-surface expression (5). In addition, mutations in *SCN5A* may manifest with an overlap of these different phenotypes (6–10). However, mutations in *SCN5A* are found in fewer than 30% of patients with Brugada syndrome, indicating involvement of other genes (11). A mutation in the glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like gene (*GPD1L*) has recently been

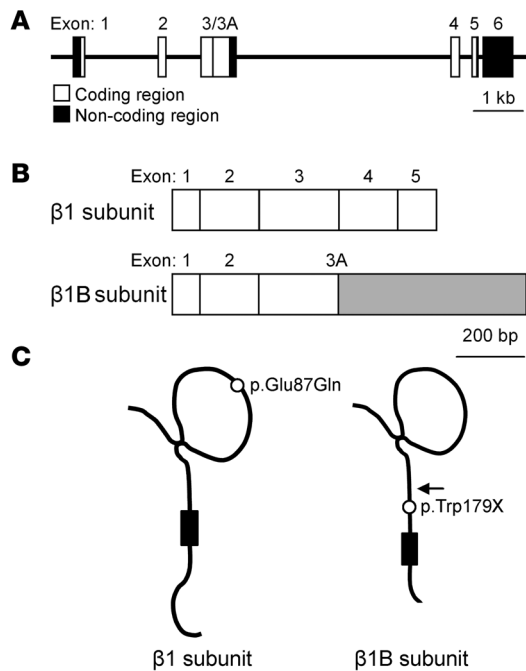
reported in a large kindred with Brugada syndrome (12); however, *GPD1L* mutations are rare in Brugada syndrome (13). Antzelevitch et al. have recently reported mutations in the gene encoding the L-type calcium channel (*CACNA1C*) or its $\beta 2b$ subunit (*CACNB2b*) in Brugada syndrome patients with unusually short QT intervals (14), but the frequency of these defects as a cause for more-typical Brugada syndrome is unknown. *SCN5A* mutations are also not identified in the majority of patients with cardiac conduction disease (15).

Sodium channels are multisubunit protein complexes composed not only of pore-forming α subunits but also of multiple other protein partners including auxiliary function-modifying β subunits (16, 17). In humans, 4 sodium channel β subunits ($\beta 1$ to $\beta 4$, encoded by *SCN1B* to *SCN4B*) have been identified, and they share a common predicted protein topology: a large extracellular N-terminal domain (including an immunoglobulin-like domain), a single transmembrane segment, and an intracellular C-terminal domain (16). Functions attributed to β subunits include an increase in sodium channel expression at the cell surface, modulation of channel gating and voltage dependence, and a role in cell adhesion and recruitment of cytosolic proteins such as ankyrin-G (16).

The $\beta 1$ transcript arises from splicing of exons 1–5 of the *SCN1B* gene (Figure 1, A and B). More recently, a second transcript has been described, arising from splicing of exons 1–3 with retention of a segment of intron 3 (termed exon 3A), leading to an alternate 3' sequence

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Citation for this article: *J. Clin. Invest.* 118:2260–2268 (2008). doi:10.1172/JCI33891.

**Figure 1**

Structure of $\beta 1$ and $\beta 1B$ subunits. (A) Genomic structure of *SCN1B*. (B) Extension of exon 3 (c.208–458) into intron 3 creates a novel 3' end of the transcript (exon 3A, c.208–978) and generates an alternate transcript encoding $\beta 1B$. The gray region indicates the unique sequence of exon 3A. (C) Predicted topology of $\beta 1$ and $\beta 1B$. The $\beta 1B$ protein has unique juxtamembrane, transmembrane, and intracellular domains. The arrow indicates the initial amino acid of the $\beta 1B$ -specific segment. Circles indicate the locations of the mutations.

(Figure 1, A and B) (18, 19). This latter transcript encodes the $\beta 1B$ subunit, which, in spite of the different 3' sequence, has a predicted protein topology similar to that of $\beta 1$ (Figure 1C) (19). The $\beta 1B$ subunit has been shown to increase a neuronal sodium current ($Na_v1.2$) (19), but its effects on $Na_v1.5$ current have not yet been investigated, although $\beta 1$ and $\beta 1B$ are both expressed in heart (19, 20).

Since loss-of-function $Na_v1.5$ mutations cause conduction disease and Brugada syndrome, one could envision that mutations in sodium channel β subunits could also underlie these disorders by decreasing sodium current. Therefore, we tested the hypothesis that mutations in *SCN1B* coding sequences, for either $\beta 1$ or $\beta 1B$, underlie cases of conduction disease and Brugada syndrome. We identified 3 mutations segregating with arrhythmia in 3 kindreds, and 2 of the mutations were located in the newly described $\beta 1B$ transcript. Both $\beta 1$ and $\beta 1B$ transcripts were expressed in the human heart and were abundant in Purkinje fibers that play a critical role in electric pulse conduction in heart. Electrophysiologic study of heterologously expressed sodium channels revealed loss of sodium current with mutant subunits.

Results

Mutation analysis and clinical data. We screened 282 probands with Brugada syndrome and 44 with conduction disease for mutations in exons 1–5 of *SCN1B* encoding the $\beta 1$ subunit and in exon 3A retained in the $\beta 1B$ transcript (Figure 1, A and B). *SCN5A* coding region mutations had been previously excluded in all 326 subjects. Three variants were identified in probands and family members (Figure 2A). These variants were absent in 1,404 population controls (see Methods).

A missense mutation, c.259G→C (Figure 2B) in exon 3, resulting in p.Glu87Gln within the extracellular immunoglobulin loop of the protein (Figure 1C) was identified in a Turkish kindred affected by conduction disease (family 1; Figure 2A). Alignment of the $\beta 1$ subunit amino acid sequence from multiple species demonstrated that Glu87 is highly conserved, supporting the importance of glutamate at this position (Figure 2C). The proband was a

50-year-old white Turkish female (II-1) who presented with palpitations and dizziness. Physical examination and echocardiography were normal, and her ECG showed complete left bundle branch block. A clinical electrophysiological study revealed a prolonged His-ventricle interval of 80 ms and inducible atrioventricular nodal reentrant tachycardia; complete atrioventricular block occurred following atrial programmed stimulation and during induced tachycardia. A dual-chamber pacemaker was implanted with resolution of symptoms. The same mutation was found in her brother (II-3), who had bifascicular block (right bundle branch block and left anterior hemiblock), and her mother (I-2), who had a normal ECG. There was no family history of syncope, sudden cardiac death, or epilepsy.

A nonsense mutation, c.536G→A in exon 3A (Figure 1B and Figure 2D), was identified in a French kindred affected with Brugada syndrome and conduction disease (family 2; Figure 2A). This mutation results in p.Trp179X and is predicted to generate a prematurely truncated protein lacking the membrane-spanning segment and intracellular portion of the protein (Figure 1C). The proband was a 53-year-old white male (II-4) who presented with chest pain. Physical examination, echocardiography, and coronary angiography were normal. His ECG showed ST segment elevation typical of Brugada syndrome and conduction abnormalities (prolonged PR interval of 220 ms and left anterior hemiblock; Figure 2E) (21). Ventricular fibrillation was induced by programmed electrical stimulation in basal state (in the absence of drugs). The same mutation was detected in his brother (II-1), nephew (III-1), and sister (II-2). The brother had no palpitations or history of syncope. His baseline ECG showed left anterior hemiblock and minor ST segment elevation suggestive of Brugada syndrome at baseline (type II saddleback abnormality; ref. 21); with flecainide challenge, the ST segment elevation was further exaggerated but did not meet criteria for a diagnostic (type I) pattern. The nephew had right bundle branch block and type II Brugada syndrome ECG after flecainide challenge, and the sister had a normal ECG and a negative flecainide test. There was no family history of tachyarrhythmias, syncope, sudden cardiac death, or epilepsy.

A different nonsense mutation, c.537G→A in exon 3A (Figure 2D), resulting in p.Trp179X, affecting the same codon as in family 2, was identified in a Dutch kindred (family 3; Figure 2A). The proband was a 17-year-old white female (II-1). Physical examination and echocardiography were normal, and a flecainide test for Brugada syndrome was negative. Her ECG showed right bundle branch block and prolonged PR interval of 196 ms (normal upper limit in teenagers, 180 ms) (22). The same mutation was found in her father (I-1), with normal ECG and negative flecainide test. The family history was negative for syncope, sudden cardiac death, or epilepsy.

$\beta 1$ and $\beta 1B$ transcript expression. To confirm and extend previous reports that $\beta 1B$ is expressed in brain, heart, skeletal muscle, and other organs (19), we used quantitative real-time PCR in nondiseased

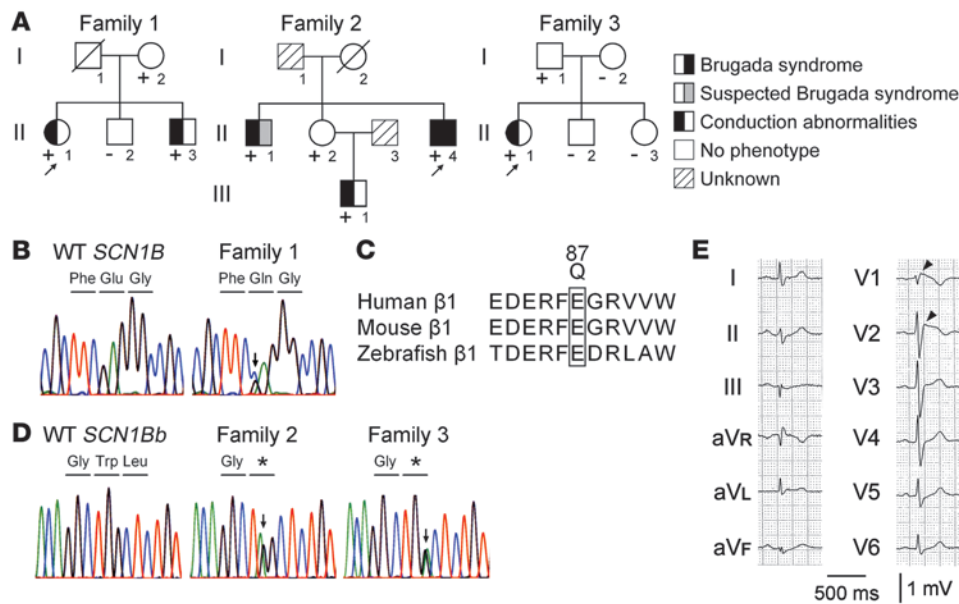


Figure 2 *SCN1B* mutations found in patients with Brugada syndrome and conduction disease. (A) Pedigrees and phenotypes of the families affected by Brugada syndrome and/or conduction disease. Individuals carrying the mutation are indicated (+). Individuals who tested negative for the mutation are indicated (-). Individuals I-1 from family 1; and I-1, I-2, and II-3 from family 2 did not undergo genetic testing. Arrows indicate probands. (B) The c.259G→C mutation in *SCN1B* resulting in p.Glu87Gln found in family 1. (C) Alignment of $\beta 1$ across species showing the high conservation of Glu87. (D) The c.536G→A (middle) and c.537G→A (right) mutations in exon 3A of $\beta 1B$, both resulting in p.Trp179X found in families 2 and 3, respectively. (E) Twelve-lead ECG from the proband of family 2 (II-4). The arrowheads indicate ST-segment elevation typical of Brugada syndrome.

human heart. Both $\beta 1$ and $\beta 1B$ transcripts were detected in right and left ventricles and in Purkinje fibers (Figure 3). The $\beta 1$ transcript level was higher in Purkinje fibers (which make up the conduction system in the ventricle) than left- (2.4-fold; $P < 0.05$) and right-ventricular (1.6-fold; $P = NS$) free walls. $\beta 1B$ transcript levels showed an even greater difference: Purkinje fibers versus left- (4.8-fold; $P < 0.001$) and right-ventricular (3.7-fold; $P < 0.001$) free walls. Levels of both transcripts were also slightly (but not statistically significantly) higher in right- versus left-ventricular free wall (1.5-fold and 1.3-fold for $\beta 1$ and $\beta 1B$ transcripts, respectively).

Cellular electrophysiology. The effects of mutant and WT $\beta 1$ and $\beta 1B$ variants on $Na_v1.5$ sodium current were assessed using the whole-cell patch-clamp technique in transfected CHO cells. As described in Methods, bicistronic expression vectors encoding a reporter (GFP or DsRed) with or without β subunits were cotransfected with expression vector encoding $Na_v1.5$. Currents were compared in cells transfected with *SCN5A* plus WT, mutant, or both β subunits.

Figure 4A shows representative current traces in cells expressing $Na_v1.5$ alone and $Na_v1.5$ plus WT or mutant $\beta 1B$ (p.Trp179X $\beta 1B$) or their combination; current densities at -30 mV are summarized in Figure 4B. Coexpression of $Na_v1.5$ with WT $\beta 1B$ significantly increased sodium current density over $Na_v1.5$ alone, by 69%, while currents recorded with p.Trp179X $\beta 1B$ coexpression were no different from $Na_v1.5$ alone. Similarly, while coexpression of WT subunit with $Na_v1.5$ shifted the voltage dependence of both activation and inactivation to more negative potentials compared with those with $Na_v1.5$ alone, no such shift was observed with the mutant (Figure 4C

and Table 1). This result indicates that while WT $\beta 1B$ modulates $Na_v1.5$ gating (in a fashion similar to WT $\beta 1$; see below), the mutant exerts no such effect. Coexpression of WT or mutant $\beta 1B$ with $Na_v1.5$ did not alter recovery from inactivation (Figure 4D and Table 1).

To examine whether expression of the mutant influences the effect of WT $\beta 1B$ on $Na_v1.5$ current (e.g., to produce a dominant negative action), cells were transfected with $Na_v1.5$ and varying amounts of WT and p.Trp179X $\beta 1B$. Figure 4B shows that the sodium current increase over $Na_v1.5$ alone recorded with transfection of 1 μg of both $\beta 1B$ subunit constructs was identical to the increase with that of 1 μg of WT $\beta 1B$. In addition, the increase in sodium current recorded with transfection of 0.5 μg of both $\beta 1B$ subunit constructs was 51% of that with 1 μg of $\beta 1B$ alone. These data indicate that p.Trp179X $\beta 1B$ does not exert a dominant negative effect on WT $\beta 1B$ function and further support the finding that the mutant, unlike WT, does not affect sodium channel function.

Figure 5A shows representative current traces of $Na_v1.5$ and $Na_v1.5$ coexpressed with WT and/or mutant $\beta 1$ (p.Glu87Gln $\beta 1$); current densities are summarized in Figure 5B. Coexpression of $Na_v1.5$ with WT $\beta 1$ significantly increased sodium current density at -30 mV, by 76%, while coexpression with mutant $\beta 1$ (p.Glu87Gln $\beta 1$) did not increase the sodium current. The increase in sodium current recorded with coexpression of $Na_v1.5$ and 1 μg of both WT and p.Glu87Gln $\beta 1$ (+20%) was markedly smaller than the increase with coexpression of $Na_v1.5$ with 1 μg WT $\beta 1$ alone (+76%), indicating that this mutant exerts a dominant negative effect on WT $\beta 1$ function. Figure 5C shows that WT $\beta 1$ produced negative shifts in the voltage dependence of $Na_v1.5$ activation and inactivation similar to those observed with WT $\beta 1B$. p.Glu87Gln $\beta 1$ shifted the voltage dependence of inactivation to negative potentials (similar to WT $\beta 1$) but did not alter the voltage dependence of activation (Table 2). Coexpression of WT or mutant $\beta 1$ with $Na_v1.5$ did not alter recovery from inactivation (Figure 5D and Table 2).

Since Glu87 is located in a region of the protein common to both $\beta 1$ and $\beta 1B$, we also studied the effects of p.Glu87Gln $\beta 1B$ on $Na_v1.5$ current properties (Supplemental Figure 1 and Supplemental Table 1; supplemental material available online with this article; doi:10.1172/JCI33891DS1). While WT $\beta 1B$ increased $Na_v1.5$ current by 69% (Figure 4), p.Glu87Gln $\beta 1B$ did not increase the sodium current compared with $Na_v1.5$ alone. Similarly, WT $\beta 1B$ produced a negative shift in voltage dependence of both activation and inactivation (Table 1), while p.Glu87Gln $\beta 1B$ shifted only the voltage dependence of inactivation compared with $Na_v1.5$ alone. As with the other β subunit

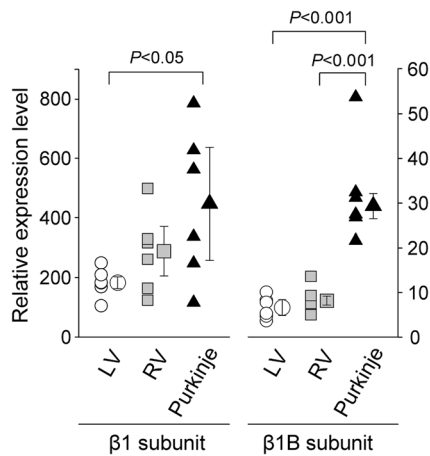


Figure 3

Expression profile of β1 and β1B transcripts in nondiseased human ventricular tissue as determined by quantitative real-time PCR. Relative expression levels of the β1 and β1B subunits are presented, normalized to those of *HPRT1* in LV (circles), RV (squares), and Purkinje fibers (triangles). Tissues for each group were collected from 6 human donors (nondiseased hearts, *n* = 6). Data points indicate the average of 2 measurements in each tissue sample. Larger symbols and error bars indicate median ± median absolute deviation for all samples.

constructs studied, there was no change in recovery from inactivation. Thus, the effects of p.Glu87Gln were comparable in the β1 and the β1B backbones.

Since Glu87 is located in a region of the protein common to both β1 and β1B, we also studied the effects of p.Glu87Gln β1B on *Nav*_v1.5 current properties (Supplemental Figure 1 and Supplemental Table 1). While WT β1B increased *Nav*_v1.5 current by 69% (Figure 4), p.Glu87Gln β1B did not increase the sodium current compared with *Nav*_v1.5 alone. Similarly, WT β1B produced a negative shift in voltage dependence of both activation and inactivation (Table 1), while p.Glu87Gln β1B shifted only the voltage dependence of inactivation compared with *Nav*_v1.5 alone. As with the other β subunit constructs studied, there was no change in recovery from inactivation. Thus, the effects of p.Glu87Gln were comparable in the β1 and the β1B backbones.

activation (Table 1), while p.Glu87Gln β1B shifted only the voltage dependence of inactivation compared with *Nav*_v1.5 alone. As with the other β subunit constructs studied, there was no change in recovery from inactivation. Thus, the effects of p.Glu87Gln were comparable in the β1 and the β1B backbones.

Discussion

In this study, we provide what we believe to be the first report of mutations in *SCN1B* sequences encoding the β1 and β1B transcript variants in patients with conduction disease and/or Brugada syndrome. Further, we provide new data indicating that β1 and β1B transcripts in the heart vary by region; greater expression in Purkinje fibers is consistent with the conduction system phenotype we describe in mutation carrier patients. Finally, we demonstrate that the β1 and β1B variants modulate function of the major cardiac sodium channel α subunit *Nav*_v1.5 and that the identified *SCN1B* mutations blunt or inhibit this effect.

Figure 4

Electrophysiological characteristics of the p.Trp179X β1B mutant. (A) Representative traces of sodium current demonstrating an increase in sodium current with WT but not mutant subunit. (B) Sodium current density at -30 mV for *Nav*_v1.5 alone (*n* = 29), *Nav*_v1.5 coexpressed with WT β1B (*n* = 28), *Nav*_v1.5 coexpressed with p.Trp179X β1B (*n* = 18), *Nav*_v1.5 coexpressed with WT β1B plus p.Trp179X β1B (1 μg for each; *n* = 14), and *Nav*_v1.5 coexpressed with WT β1B plus p.Trp179X β1B (0.5 μg for each; *n* = 10). (C) Voltage dependence of activation and inactivation. Filled circles, open circles, and squares indicate *Nav*_v1.5 alone, *Nav*_v1.5 coexpressed with WT β1B, and *Nav*_v1.5 coexpressed with p.Trp179X β1B, respectively. The pulse protocol used to study the voltage dependence of inactivation is shown in the inset. (D) Recovery from inactivation. Biophysical properties are provided in Table 1.

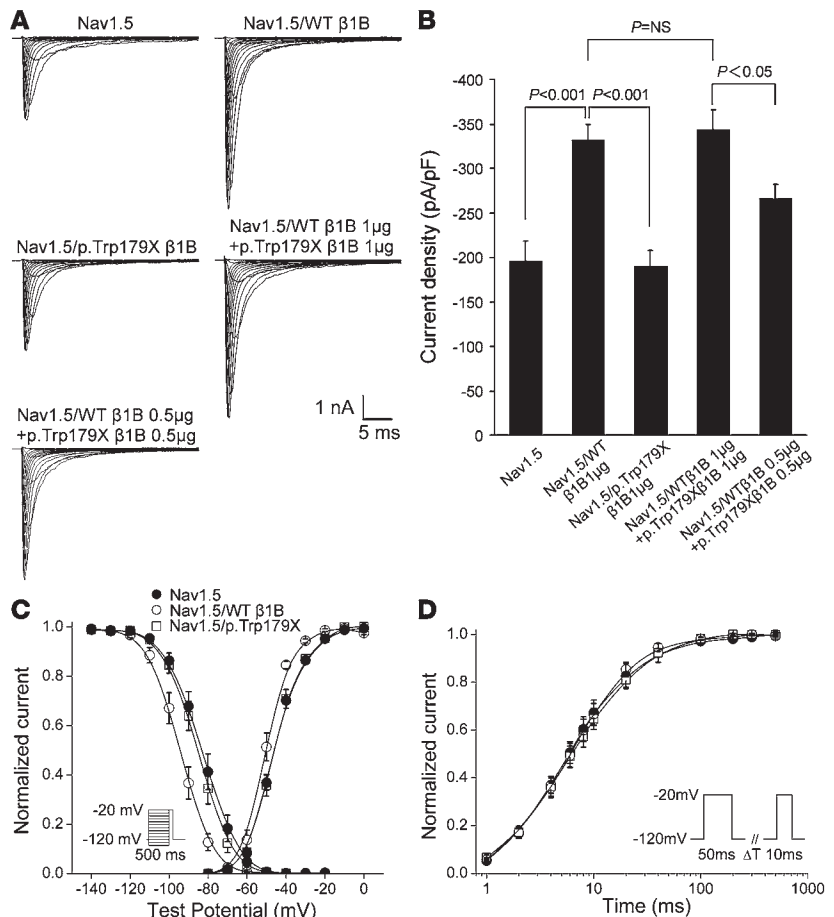




Table 1

Biophysical parameters of WT and mutant $\beta 1B$

	Voltage dependence of activation			Voltage dependence of inactivation			Recovery from inactivation		
	$V_{1/2}$, mV	k , mV	n	$V_{1/2}$, mV	k , mV	n	τ_i , ms (amplitude, %) ^A	τ_s , ms (amplitude, %) ^A	n
Nav1.5	-46.2 ± 1.0	7.1 ± 0.4	29	-83.8 ± 1.8	7.6 ± 0.2	17	7.7 ± 1.1 (87.2 ± 1.1)	56.4 ± 9.8 (11.6 ± 1.0)	12
Nav1.5/WT $\beta 1B$	-50.6 ± 0.7 ^B	6.3 ± 0.3	28	-94.2 ± 1.3 ^A	7.6 ± 0.2	14	7.4 ± 1.0 (86.5 ± 1.2)	43.3 ± 8.6 (13.1 ± 1.1)	14
Nav1.5/p.Trp179X $\beta 1B$	-46.3 ± 1.3 ^C	6.5 ± 0.4	18	-85.2 ± 2.0 ^B	6.6 ± 0.3	15	8.2 ± 1.0 (91.8 ± 1.1)	58.0 ± 11.9 (7.8 ± 1.0)	12

Values are shown as mean ± SEM. ^AThe percentages refer to the properties of the overall time constants contributed by the 2 components τ_i and τ_s . ^B $P < 0.01$ versus Nav1.5 alone. ^C $P < 0.01$ versus Nav1.5/WT $\beta 1B$.

The 3 mutations were identified in 3 probands with conduction disease and/or Brugada syndrome as well as in other family members with or without these arrhythmia phenotypes. Formal linkage analysis was not possible because the families are too small and penetrance is incomplete. Thus, evidence in support of disease causality of these mutations (beyond their identification in subjects with clinical phenotypes) includes the findings that both $\beta 1$ and $\beta 1B$ transcripts are expressed in heart and that the mutant subunits (p.Glu87Gln $\beta 1$, p.Glu87Gln $\beta 1B$, and p.Trp179X $\beta 1B$) did not increase Nav1.5 currents in heterologous expression experiments, while WT $\beta 1$ and $\beta 1B$ did. Incomplete penetrance, a well-recognized feature of the monogenic arrhythmia syndromes (12, 23), was observed. For *SCN5A* mutations linked to Brugada syndrome, penetrance as low as 12.5% has been described (24). A role for sex, age, and genetic modifiers (e.g., common polymorphisms) is suspected (5, 25, 26), but the mechanisms for this common clinical finding remain poorly understood.

Two types of mutations were identified. The c.536G→A and c.537G→A mutations in exon 3A both result in a stop codon at

position 179, predicted to generate a $\beta 1B$ protein lacking the transmembrane and cytoplasmic domains and thus unable to integrate into the sarcolemma and to associate with Nav1.5. Thus, the a priori assumption is that a mutation such as this will cause disease by simple haploinsufficiency. The electrophysiologic data support this idea, since coexpression of p.Trp179X $\beta 1B$ failed to increase Nav1.5 current and did not modulate the effect of the WT $\beta 1B$ protein. Furthermore, the voltage dependencies of activation and inactivation of Nav1.5 coexpressed with p.Trp179X $\beta 1B$ were the same as those for Nav1.5 alone, in contrast to the shifts observed with WT $\beta 1B$. While *Scn1b*-knockout mice display clear ECG changes (27), studies with young (17- to 18-day-old) heterozygotes identified no difference from WT. Since age-related changes in conduction are a recognized feature of cardiac conduction disease and conduction delay is one of the proposed mechanisms of Brugada syndrome (2, 28), aging may be important for the β subunit-mediated phenotype.

On the other hand, the c.259G→C mutation leads to an amino acid substitution (p.Glu87Gln) within the extracellular domain of the

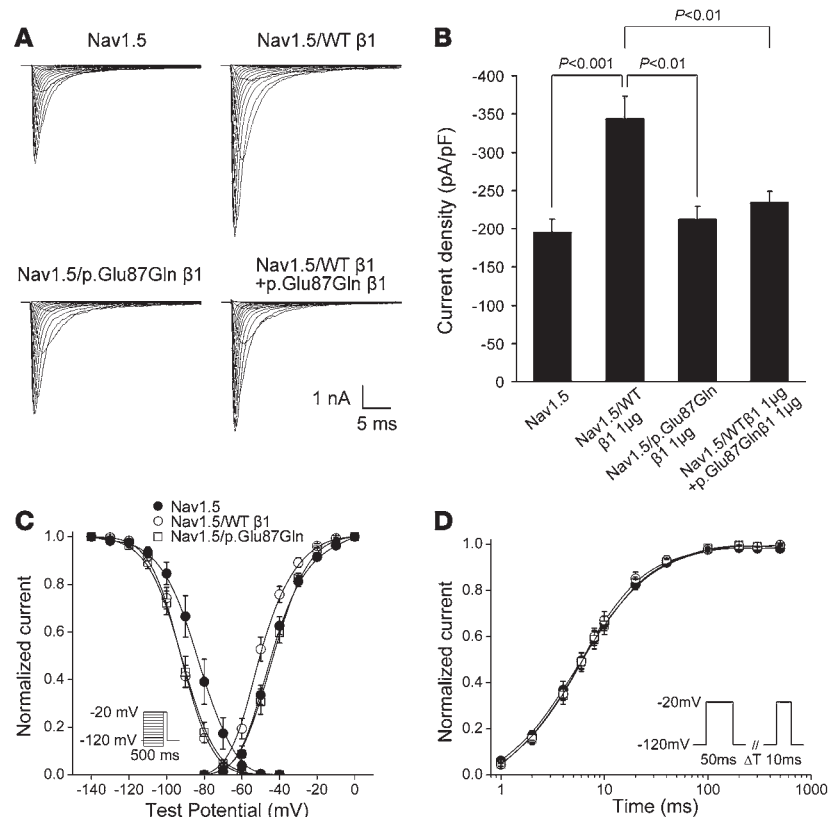


Figure 5

Electrophysiological characteristics of the p.Glu87Gln mutant. (A) Representative traces of sodium current. (B) Current density at -30 mV for Nav1.5 alone ($n = 13$), Nav1.5 coexpressed with WT $\beta 1$ ($n = 17$), Nav1.5 coexpressed with p.Glu87Gln $\beta 1$ ($n = 18$), and Nav1.5 coexpressed with WT $\beta 1$ plus p.Glu87Gln $\beta 1$ ($n = 15$). (C) Voltage dependence of activation and inactivation. Filled circles, open circles, and squares indicate Nav1.5 alone, Nav1.5 coexpressed with WT $\beta 1$, and Nav1.5 coexpressed with p.Glu87Gln $\beta 1$, respectively. (D) Recovery from inactivation. Biophysical properties are provided in Table 2.



Table 2
Biophysical parameters of WT and mutant $\beta 1$

	Voltage dependence of activation			Voltage dependence of inactivation			Recovery from inactivation		
	$V_{1/2}$, mV	k , mV	n	$V_{1/2}$, mV	k , mV	n	τ_i , ms (amplitude, %) ^A	τ_s , ms (amplitude, %) ^A	n
Nav1.5	-46.1 ± 1.7	7.8 ± 0.4	13	-85.1 ± 3.2	7.3 ± 0.5	12	8.2 ± 1.2 (88.2 \pm 1.3)	52.4 ± 7.9 (11.0 \pm 1.3)	9
Nav1.5/WT $\beta 1$	-50.6 ± 1.4^B	7.3 ± 0.4	17	-92.6 ± 1.4^A	6.4 ± 0.2	12	7.5 ± 1.1 (84.2 \pm 1.3)	43.1 ± 4.6 (14.1 \pm 1.3)	13
Nav1.5/p.Glu87Gln $\beta 1$	-44.9 ± 1.4^C	7.7 ± 0.4	18	-92.5 ± 1.7^A	6.8 ± 0.2	12	7.7 ± 1.1 (89.1 \pm 1.1)	52.0 ± 9.5 (10.4 \pm 1.1)	10

Values are shown as mean \pm SEM. ^AThe percentages refer to the properties of the overall time constants contributed by the 2 components τ_i and τ_s .

^B $P < 0.05$ versus Nav1.5 alone. ^C $P < 0.05$ versus Nav1.5 /WT $\beta 1$.

protein. The electrophysiological data demonstrate that the mutant subunit did modulate Nav1.5 gating (shift in the voltage dependence of inactivation, in either the $\beta 1$ or $\beta 1B$ background), supporting the idea that it associates with Nav1.5 at the cell surface. In addition, in contrast to the p.Trp179X $\beta 1B$, p.Glu87Gln did exert a dominant negative effect on the WT subunit. Thus, the 3 mutations lead to a decrease in Nav1.5 current through somewhat different mechanisms. This reduction of current is consistent with the conduction disease and Brugada syndrome phenotypes of the patients.

Normal impulse propagation in the atria, ventricles, and Purkinje network is critically dependent on normal sodium channel function. Dysfunction of the sodium channel leads to conduction delay, and loss-of-function mutations in *SCN5A* have been described in isolated conduction disease unassociated with structural heart disease (2, 3). Thus, our finding of *SCN1B* mutations associated with reduced sodium current in patients with conduction disease is consistent with previous studies of the mechanism of this disorder. The preferential expression of the $\beta 1$ and $\beta 1B$ transcripts in human Purkinje fibers further supports the prominent conduction delay seen as part of the clinical phenotypes.

Loss-of-function mutations in *SCN5A* were the first reported cause of the Brugada syndrome (4). These mutations reduce sodium current by reducing Nav1.5 cell surface expression and/or altering gating (4, 5, 29). A common view is that in epicardial cells, this reduction in sodium current produces marked action potential shortening, attributed to an “unopposed” early transient outward potassium current. By contrast, reduction of sodium current in endocardial cells is thought to produce only modest action potential shortening. The resultant increased heterogeneity of repolarization predisposes to rapid reentry, resulting in ventricular fibrillation (4, 30). A common feature in Brugada syndrome — consistent with reduced sodium current — is slowed conduction (28, 31). Indeed, an alternate proposed mechanism suggests that the characteristic right-precordial ST-segment elevation on the ECG and initiation of arrhythmias is attributable primarily to right-ventricular outflow tract conduction delay (28). The trend to higher expression levels of $\beta 1B$ in right ventricle may thus contribute to the Brugada syndrome phenotype.

This idea is further supported by functional studies in a single large kindred in which a *GPD1L* mutation was linked to Brugada syndrome: coexpression of mutant *GPD1L* with Nav1.5 was reported to decrease sodium current, consistent with the observation that loss-of-function mutations in *SCN5A* cause Brugada syndrome (12). In principle, reduction in L-type calcium current might also produce differential effects in epicardial and endocardial sites and thus cause Brugada syndrome; rare kindreds with this mechanism have now been described (14).

Conduction disease was observed in families 1 and 3, while in family 2, mutation carriers presented either solely with conduction disease or conduction disease in combination with ECGs typical of Brugada syndrome. This phenomenon of overlapping clinical phenotypes is common in individuals with *SCN5A* mutations leading to loss of sodium channel function (6, 7), and conversely, in vitro electrophysiologic analysis of *SCN5A* mutations linked to Brugada syndrome or isolated conduction disease consistently reveals loss of Nav1.5 channel function (2, 4). Indeed, a single mutation segregating in a given family can lead to conduction disease in some family members and Brugada syndrome in others (6, 7). What determines the ultimate phenotype — Brugada syndrome versus isolated conduction disease — is unknown. Sex, age, and genetic modifiers (e.g., common polymorphisms) have been proposed as modulators of the clinical phenotypes (5, 25, 26).

The reported effects of $\beta 1$ on Nav1.5 channels are controversial (32). Some groups have reported that $\beta 1$ increases Nav1.5 currents with or without affecting voltage dependence or channel kinetics, while others have reported no effect of $\beta 1$ on Nav1.5 current (20, 33–37). The $\beta 1B$ variant has to date only been studied in coexpression studies with the neuronal sodium channel Nav1.2 (encoded by *SCN2A*), where it was shown to increase sodium current and cause a small negative shift in voltage dependence of activation (19). In our experiments, WT $\beta 1$ and $\beta 1B$ had similar effects on Nav1.5 current: both increased sodium currents and led to hyperpolarizing (negative) shifts in voltage dependence of activation and inactivation.

Not only were the effects of the WT β subunits on Nav1.5 current similar, but the effects of the p.Glu87Gln mutation in the $\beta 1$ background (p.Glu87Gln $\beta 1$) were also similar to those in the $\beta 1B$ background (p.Glu87Gln $\beta 1B$). Although the $\beta 1$ and $\beta 1B$ variants share the same topology (an N-terminal extracellular immunoglobulin domain, a transmembrane domain, and a C-terminal cytoplasmic domain), their sequence identity is limited to the extracellular immunoglobulin domain; the C-terminal half of $\beta 1B$, residues 150–268, has only approximately 17% amino acid sequence identity with $\beta 1$ (19). Taken together, the data suggest that the molecular determinants of $\beta 1$ and $\beta 1B$ modulation of Nav1.5 cell-surface expression and gating likely reside in the extracellular immunoglobulin domain. This is in line with previous studies of skeletal muscle (Nav1.4 encoded by *SCN4A*) and neuronal (Nav1.2) sodium channel α subunits that have shown that deletion of the intracellular domain of the $\beta 1$ subunit has no effect on its modulation of α subunit function, whereas deletions within the extracellular domain block modulation (38–40). Alternatively, specific residues may not be as important as preservation of overall structural motifs, as suggested by the data of Zimmer



and Benndorf, who reported that the $\beta 1$ subunit modulates $\text{Nav}1.5$ via the membrane anchor plus additional intracellular or extracellular regions (41).

In addition to modulation of sodium channel α subunit expression and function, other roles have been suggested for β subunits: these include acting as adhesion molecules or as participants in signal transduction (16, 32). The different transmembrane and C-terminal domains of $\beta 1$ and $\beta 1B$ might therefore lead to participation in different signaling pathways. For instance, phosphorylation of the tyrosine at position 181 of the $\beta 1$ C terminus regulates its interaction with ankyrin-G (42), which is thought to be critical for ankyrin-G localization within cardiomyocytes (intercalated discs versus T tubules). $\beta 1B$ lacks this tyrosine in its C-terminal domain, so a role for $\beta 1B$ as a modulator of this function seems less likely.

Another mechanism regulating function of β subunits is the potential for cleavage by β -site amyloid precursor protein–cleaving enzyme (BACE1) and γ -secretase, resulting in the release of the N- and C-terminal fragments (43). The processed C-terminal fragment of $\beta 2$ and $\beta 4$ has been reported to be associated with cell adhesion, migration, and morphogenesis in neuronal cells as well as regulation of the expression level of the neuronal sodium channel $\text{Nav}1.1$ (44–46). Thus, p.Trp179X $\beta 1B$ may result in absence of functions depending on the generation of a β subunit C-terminal fragment by BACE1. However, a role for BACE1 cleavage has not been studied in either human $\beta 1$ subunit or cardiomyocytes, and the cleavage site located at the common juxtamembrane domain in $\beta 1$ and $\beta 1B$ is not conserved between human and mice (19, 43).

Mutations in *SCN1B* have been previously reported in generalized epilepsy with febrile seizures plus (47), and $\beta 1$ -null mice exhibit a severe seizure disorder and die at approximately 3 weeks of age (48). In addition, these mice exhibit bradycardia and prolonged rate-corrected QT intervals (27). These changes suggest that $\beta 1$ plays an important role in the murine heart, although it is possible that the changes are a consequence of the severe overall developmental phenotype in this model (48). To our knowledge, defects in cardiac function have not been investigated in *SCN1B* mutation carriers presenting with epilepsy (32, 49). Conversely, we have observed no neurological phenotype in our patients. Four *SCN1B* mutations have been linked to epilepsy to date (47, 49, 50), all of which localize to the extracellular immunoglobulin-like fold of the protein, as does the p.Glu87Gln mutation reported here. One additional possible link between the cardiac and neurological phenotypes associated with $\beta 1$ mutations is the syndrome of sudden unexpected death in epilepsy (SUDEP) (51), where a role for cardiac bradyarrhythmias has been proposed (52).

To date, *SCN5A* mutations are the most common cause identified in cases of Brugada syndrome, and *SCN5A* is the only identified causative gene in conduction disease (2, 11). However, *SCN5A* mutations are not identified in the majority of patients, and it has been reported that the frequency of mutations in other implicated genes (*CACNA1C*, *CACNB2b*, *GPD1L*) is also low in Brugada syndrome (12–14). In this study, *SCN1B* mutations were identified in less than 1% of probands with Brugada syndrome and less than 5% of probands with conduction disease and thus account for a small subset of these inherited arrhythmic syndromes.

A conventional heterologous mammalian expression system was used for functional assessment of the mutations. The environment in this approach is different from that in native cardiomyocytes, and other proteins known to associate with the sodium channel complex, such as other β subunits, are generally absent. Despite

these limitations, the in vitro characteristics of the mutations were concordant with the phenotype observed in the patients, which, in combination with the genetic data presented, supports the hypothesis of a causal relationship between the mutations and disease.

In summary, we have for the first time to our knowledge identified *SCN1B* mutations in families with conduction disease and Brugada syndrome. We have shown expression of the $\beta 1$ subunit transcript and the alternate $\beta 1B$ subunit transcript variant in human heart and demonstrated reduced $\text{Nav}1.5$ sodium current as a result of loss or altered β subunit modulation of $\text{Nav}1.5$ current. These findings implicate *SCN1B* as a disease gene for human arrhythmia susceptibility.

Methods

Study populations. The study populations consisted of: (a) unrelated Brugada syndrome probands identified and characterized at the Academic Medical Center, Amsterdam ($n = 38$), l'institut du thorax, Nantes, ($n = 216$), and the Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences ($n = 28$); and (b) patients with cardiac conduction disease were identified and characterized at the Academic Medical Center ($n = 2$), l'institut du thorax ($n = 39$), and Ege University School of Medicine ($n = 3$). The study was performed according to a protocol approved by the Medical Ethical Committee, Academic Medical Center, Amsterdam; Comité de Protection des Personnes, Nantes; Ege University Research Ethics Committee; and Medical Research Ethics Committee, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences. Informed consent was obtained from all patients. Coding region and splice site mutations in *SCN5A* had been previously excluded in all probands by single-strand confirmation polymorphism analysis, denaturing HPLC sequencing, or direct sequencing using primers in flanking intronic sequences.

Mutation analysis. Probands with Brugada syndrome and cardiac conduction disease were screened for mutations in regions of the *SCN1B* gene encoding $\beta 1$ and $\beta 1B$, except for Japanese probands, who were screened only in the regions of *SCN1B* gene encoding $\beta 1B$. Screening for mutations was performed by PCR amplification of coding regions and flanking intronic sequences, followed by direct sequencing of amplicons on an ABI PRISM 3730 DNA Sequence Detection System (Applied Biosystems). Primer sequences are listed in Supplemental Table 2.

Control populations. We screened randomly selected and unrelated white Dutch individuals ($n = 176$); white individuals ($n = 702$) selected from the KORA S4 survey, which included population-based southern German individuals ($n = 4,261$) surveyed between 1999 and 2001 (53); unrelated white Turkish individuals ($n = 150$); and 4 different ethnic groups (white, African American, Hispanic, Asian; $n = 94$ for each group) from the Coriell Cell Repositories. The Coriell samples were resequenced as described above by the J. Craig Venter Institute through the NHLBI DNA Resequencing and Genotyping Program. The other control samples were genotyped at the identified mutation sites.

Subunit mRNA abundances in human cardiac tissue. Real-time RT-PCR was used to quantify subunit abundances. Assays were conducted in nondiseased human hearts obtained from the University of Szeged, Szeged, Hungary, that were technically unusable for transplantation based on logistic considerations (54). Before cardiac explantation, organ donor patients did not receive medication except dobutamine, furosemide, and plasma expanders. The investigations conformed to the principles outlined in the Helsinki Declaration of the World Medical Association. All experimental protocols were approved by the Ethical Review Board of the Medical Center of the University of Szeged (no. 51-57/1997 OEJ). The left ventricles from 6 donors and the right ventricles from 6 donors were dissected and stored in cardioplegic solution at 4°C for approximately 4–8 hours before being



frozen in liquid nitrogen. Purkinje fiber mRNA was extracted from false tendons dissected from the ventricles of 6 donors. Further information on the donors is presented in Supplemental Table 3.

Total RNA from each cardiac sample was isolated and DNase treated with the RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (QIAGEN) following the manufacturer's instructions. The quality of total RNA was assessed with PAGE (2100 Bioanalyzer; Agilent Technologies). Absence of genomic DNA contamination was verified by PCR. First-strand cDNA was synthesized from 2 μ g total RNA with High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). Real-time PCR was performed on a TaqMan system with predesigned 6-carboxyfluorescein-labeled (FAM-labeled) fluorogenic TaqMan probe and primers for β 1, custom-designed TaqMan probe and primers for β 1B (located in the retained segment of intron 3), and 1 \times TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). PCR efficiency of the β 1 and β 1B fluorescent probes was estimated at approximately 98%. After 2 minutes at 50°C and 10 minutes at 95°C, 40 cycles of amplification were performed with the ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Data were collected with instrument spectral compensation by Applied Biosystems SDS 2.1 software and analyzed with the Ct relative quantification method (55). Fluorescence signals were normalized to the housekeeping gene hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1 (*HPRT1*). For each sample, β 1 and β 1B transcripts were quantified in duplicate. The values were averaged and then used for the $2^{-\Delta C_t} \times 100$ calculation, where $2^{-\Delta C_t}$ corresponds to expression relative to *HPRT*. Primer and probe sequences are listed in Supplemental Table 4.

Generation of expression vectors. Full-length human β 1 cDNA (GenBank accession number NM_001037) subcloned into a bicistronic vector also carrying the cDNA for enhanced eGFP (pEGFP-IRES; BD Biosciences – Clontech) was supplied by Alfred George Jr. (Vanderbilt University, Nashville, Tennessee, USA). Full-length human β 1B cDNA (GenBank accession number NM_199037) was cloned from human ventricular mRNA, supplied by Katherine Murray (Vanderbilt University). The β 1B cDNA was subcloned into a pEGFP-IRES vector (BD Biosciences – Clontech). Mutant constructs were prepared using the QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. The inserts were subsequently sequenced to ensure that there was no other mutation besides the intended one.

Transient transfection in CHO cells. For functional analysis, cultured CHO cells were transiently transfected with the constructs described above using FuGENE 6 (Roche Applied Science). Constructs encoding β 1 or β 1B subunits (1 μ g, unless otherwise specified) were cotransfected with the pBK-CMV vector (1 μ g; Stratagene) encoding *SCN5A* (GenBank accession number NM_000335), supplied by Alfred George Jr. To study dominant negative effects, mutant β 1 or β 1B construct (0.5 μ g or 1 μ g) was cotransfected with the same amount of construct for WT β 1 or β 1B subunit that had been subcloned into a bicistronic vector also carrying cDNA for red fluorescent protein from *Discosoma* version T3 (pDsRed-IRES; supplied by Alfred George Jr.) along with *SCN5A* (1 μ g). When *SCN5A* was transfected without β subunits, the plasmid encoding the eGFP (pEGFP-IRES; BD Biosciences – Clontech) with no β subunit insert was cotransfected. Cells were grown for 48 hours after transfection before study.

Electrophysiology. Cells displaying green fluorescence were chosen for study; in experiments with transfection of both WT and mutant β subunits, cells displaying both green and red fluorescence were chosen. Sodium currents were measured at room temperature using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique with an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices). The extracellular bath solution contained (in mmol/l): 145 NaCl, 4.0 KCl, 1.0 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 10 glucose, 10 HEPES, pH 7.4 (NaOH). Patch pipettes (~1.5 M Ω) contained (in mmol/l): 10 NaF, 110 CsF, 20 CsCl, 10 EGTA, and 10 HEPES, pH 7.4 (CsOH). Currents were filtered at 5 kHz and digitized at 50 kHz. Cell capacitance and series resistance were compensated for by at

least 80%. Voltage control, data acquisition, and analysis were accomplished using pCLAMP 9.2 and Clampfit 9.2 software (Molecular Devices).

Sodium current properties were determined by voltage clamp protocols as shown in the relevant figures. Cells were held at -120 mV, and currents were elicited with 50-ms depolarizing pulses from -80 to 60 mV in 10-mV increments. Voltage dependence of inactivation was studied using 500-ms prepulses from -120 to -20 mV in 10-mV increments, followed by a test pulse to -20 mV. The rate of recovery from inactivation was examined by 50-ms conditioning pulse to -20 mV from a holding potential of -120 mV, followed by a varying recovery duration and a 10-ms test pulse to -20 mV. All currents were normalized to cell capacitance. The voltage dependence of sodium current was determined by fitting a Boltzmann function ($y = [1 + \exp\{(V - V_{1/2}) / k\}]^{-1}$), yielding the voltage required to achieve half-maximal conductance or channel availability ($V_{1/2}$) and slope factor (k). The time constants of recovery from inactivation were determined using a double-exponential function ($y = A_f[1 - \exp(-t / \tau_f)] + A_s[1 - \exp(-t / \tau_s)]$), where τ_f and τ_s are the time constants of fast and slow components, and A_f and A_s are the fractions of the fast and slow components.

Statistics. Electrophysiological data are expressed as mean \pm SEM. Gene expression data are expressed as median \pm median absolute deviation. All statistical analyses were conducted with SPSS version 12.0. To test for significant differences among groups, an unpaired 2-tailed *t* test or ANOVA was used. The level of statistical significance was $P < 0.05$.

Acknowledgments

We thank Leander Beekman, Peter van Tintelen, Arie O. Verkerk, Carol Ann Remme, Alfred George Jr., Katherine Murray, Sabina Kupersmidt, Kai Liu, Sameer Chopra, Nathalie Gaborit, Satoru Komura, Mahmut Akyol, and Moritz Sinner for their contributions to performing and/or analyzing this work and for helpful discussions. This work was supported by grants from the NIH (HL46681 and HL65962 to D.M. Roden), a Fondation Leducq Trans-Atlantic Network of Excellence grant (05 CVD 01, Preventing Sudden Death, to D. Escande, J.-J. Schott, A.M. Wilde, S. Käbb, and D.M. Roden), Netherlands Heart Foundation grant 2003T302 (to A.A.M. Wilde), the Interuniversity Cardiology Institute of The Netherlands (project 27, to A.A.M. Wilde), Agence Nationale de la Recherche grant 05-MRAR-028 (to J.-J. Schott), Agence Nationale de la Recherche grants 05-MRAR-028 and 06-MRAR-022 (to J.-J. Schott), German Federal Ministry of Education and Research (BMBF) grants 01GI0204, 01GS0499, 01GI0204, and 01GR0103 (to S. Käbb, A. Pfeufer, and H.-E. Wichmann), and a Sumitomo Life Social Foundation grant (to H. Watanabe). The KORA platform is funded by the BMBF and by the State of Bavaria. Resequencing of Coriell samples was performed by the J. Craig Venter Institute through the NHLBI Resequencing and Genotyping Program. We also thank Andras Varro (University of Szeged) for providing the human tissues. C.R. Bezzina is an Established Investigator of The Netherlands Heart Foundation (grant 2005/T024).

Received for publication September 11, 2007, and accepted in revised form March 19, 2008.

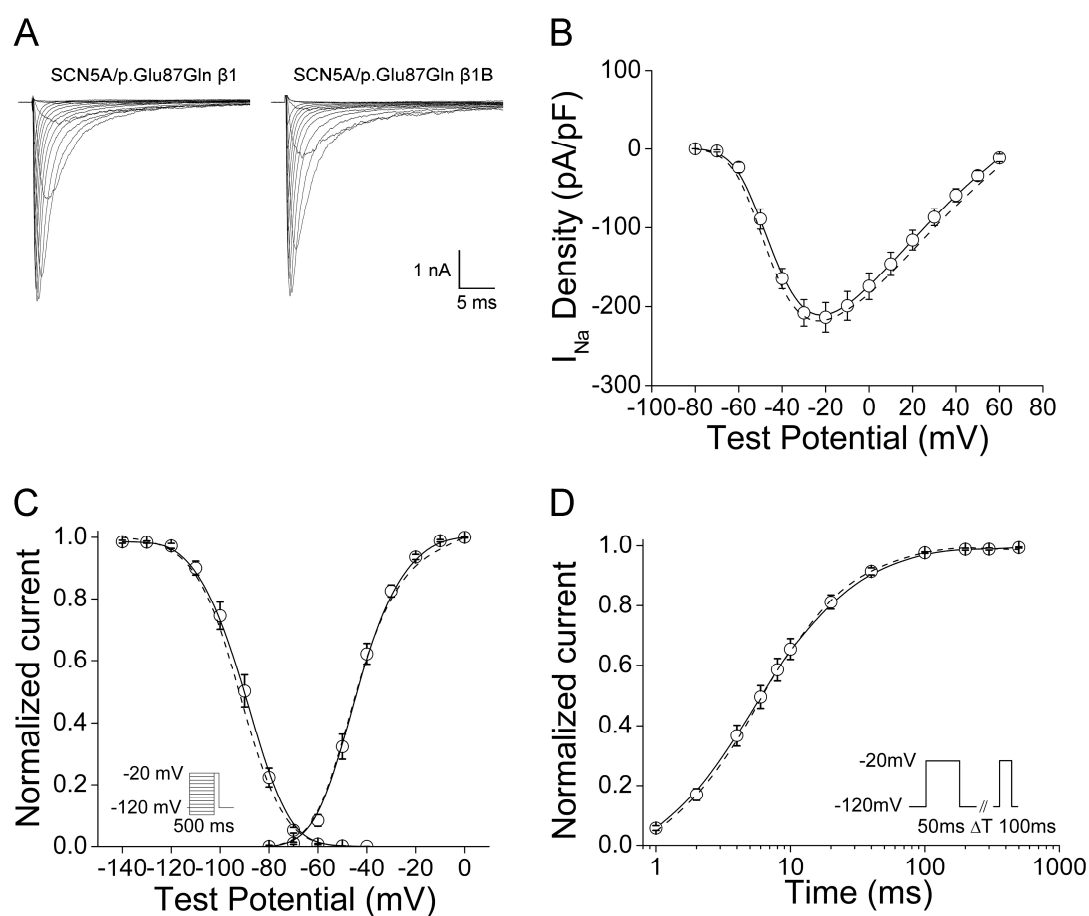
Address correspondence to: Connie R. Bezzina, Heart Failure Research Center, Department of Experimental Cardiology, L2-108-1, Meibergdreef 15, 1105 AZ Amsterdam, The Netherlands. Phone: 31-20-5665403; Fax: 31-20-6976177; E-mail: C.R.Bezzina@amc.uva.nl.

Hiroshi Watanabe, Tamara T. Koopmann, and Solena Le Scouarnec contributed equally to this work.



1. Wang, Q., et al. 1995. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell*. **80**:805-811.
2. Schott, J.J., et al. 1999. Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat. Genet.* **23**:20-21.
3. Tan, H.L., et al. 2001. A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature*. **409**:1043-1047.
4. Chen, Q., et al. 1998. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature*. **392**:293-296.
5. Tan, H.L., Bezzina, C.R., Smits, J.P., Verkerk, A.O., and Wilde, A.A. 2003. Genetic control of sodium channel function. *Cardiovasc. Res.* **57**:961-973.
6. Bezzina, C., et al. 1999. A single Na⁺ channel mutation causing both long-QT and Brugada syndromes. *Circ. Res.* **85**:1206-1213.
7. Kyndt, F., et al. 2001. Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation*. **104**:3081-3086.
8. Grant, A.O., et al. 2002. Long QT syndrome, Brugada syndrome, and conduction system disease are linked to a single sodium channel mutation. *J. Clin. Invest.* **110**:1201-1209.
9. Valdivia, C.R., et al. 2002. A novel SCN5A arrhythmia mutation, M1766L, with expression defect rescued by mexiletine. *Cardiovasc. Res.* **55**:279-289.
10. Remme, C.A., et al. 2006. Overlap syndrome of cardiac sodium channel disease in mice carrying the equivalent mutation of human SCN5A-1795insD. *Circulation*. **114**:2584-2594.
11. Shimizu, W., Aiba, T., and Kamakura, S. 2005. Mechanisms of disease: current understanding and future challenges in Brugada syndrome. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **2**:408-414.
12. London, B., et al. 2007. Mutation in glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) decreases cardiac Na⁺ current and causes inherited arrhythmias. *Circulation*. **116**:2260-2268.
13. Koopmann, T.T., et al. 2007. Exclusion of multiple candidate genes and large genomic rearrangements in SCN5A in a Dutch Brugada syndrome cohort. *Heart Rhythm*. **4**:752-755.
14. Antzelevitch, C., et al. 2007. Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation*. **15**:442-449.
15. Moric, E., et al. 2003. The implications of genetic mutations in the sodium channel gene (SCN5A). *Europace*. **5**:325-334.
16. Isom, L.L. 2001. Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist*. **7**:42-54.
17. Abriel, H., and Kass, R.S. 2005. Regulation of the voltage-gated cardiac sodium channel Nav1.5 by interacting proteins. *Trends Cardiovasc. Med.* **15**:35-40.
18. Kazen-Gillespie, K.A., et al. 2000. Cloning, localization, and functional expression of sodium channel beta1A subunits. *J. Biol. Chem.* **275**:1079-1088.
19. Qin, N., et al. 2003. Molecular cloning and functional expression of the human sodium channel beta1B subunit, a novel splicing variant of the beta1 subunit. *Eur. J. Biochem.* **270**:4762-4770.
20. Nuss, H.B., et al. 1995. Functional association of the beta 1 subunit with human cardiac (hH1) and rat skeletal muscle (mu 1) sodium channel alpha subunits expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Gen. Physiol.* **106**:1171-1191.
21. Wilde, A.A., et al. 2002. Proposed diagnostic criteria for the Brugada syndrome: consensus report. *Circulation*. **106**:2514-2519.
22. Dickinson, D.F. 2005. The normal ECG in childhood and adolescence. *Heart*. **91**:1626-1630.
23. Priori, S.G., Napolitano, C., and Schwartz, P.J. 1999. Low penetrance in the long-QT syndrome: clinical impact. *Circulation*. **99**:529-533.
24. Priori, S.G., et al. 2000. Clinical and genetic heterogeneity of right bundle branch block and ST-segment elevation syndrome: a prospective evaluation of 52 families. *Circulation*. **102**:2509-2515.
25. Viswanathan, P.C., Benson, D.W., and Balsler, J.R. 2003. A common SCN5A polymorphism modulates the biophysical effects of an SCN5A mutation. *J. Clin. Invest.* **111**:341-346.
26. Bezzina, C.R., et al. 2006. Common sodium channel promoter haplotype in Asian subjects underlies variability in cardiac conduction. *Circulation*. **113**:338-344.
27. Lopez-Santiago, L.F., et al. 2007. Sodium channel SCN1b null mice exhibit prolonged QT and RR intervals. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **43**:636-647.
28. Meregalli, P.G., Wilde, A.A., and Tan, H.L. 2005. Pathophysiological mechanisms of Brugada syndrome: depolarization disorder, repolarization disorder, or more? *Cardiovasc. Res.* **67**:367-378.
29. Baroudi, G., et al. 2001. Novel mechanism for Brugada syndrome: defective surface localization of an SCN5A mutant (R1432G). *Circ. Res.* **88**:e78-e83.
30. Yan, G.X., and Antzelevitch, C. 1999. Cellular basis for the Brugada syndrome and other mechanisms of arrhythmogenesis associated with ST-segment elevation. *Circulation*. **100**:1660-1666.
31. Antzelevitch, C., et al. 2005. Brugada syndrome: report of the second consensus conference: endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association. *Circulation*. **111**:659-670.
32. Meadows, L.S., and Isom, L.L. 2005. Sodium channels as macromolecular complexes: implications for inherited arrhythmia syndromes. *Cardiovasc. Res.* **67**:448-458.
33. Qu, Y., et al. 1995. Modulation of cardiac Na⁺ channel expression in *Xenopus* oocytes by beta 1 subunits. *J. Biol. Chem.* **270**:25696-25701.
34. Ko, S.H., Lenkowski, P.W., Lee, H.C., Mounsey, J.P., and Patel, M.K. 2005. Modulation of Na(v)1.5 by beta1- and beta3-subunit co-expression in mammalian cells. *Pflugers Arch.* **449**:403-412.
35. Johnson, D., Montpetit, M.L., Stocker, P.J., and Bennett, E.S. 2004. The sialic acid component of the beta1 subunit modulates voltage-gated sodium channel function. *J. Biol. Chem.* **279**:44303-44310.
36. Fahmi, A.I., et al. 2001. The sodium channel beta-subunit SCN3b modulates the kinetics of SCN5a and is expressed heterogeneously in sheep heart. *J. Physiol.* **537**:693-700.
37. Makita, N., Bennett, P.B., Jr., and George, A.L., Jr. 1994. Voltage-gated Na⁺ channel beta 1 subunit mRNA expressed in adult human skeletal muscle, heart, and brain is encoded by a single gene. *J. Biol. Chem.* **269**:7571-7578.
38. Chen, C., and Cannon, S.C. 1995. Modulation of Na⁺ channel inactivation by the beta 1 subunit: a deletion analysis. *Pflugers Arch.* **431**:186-195.
39. McCormick, K.A., et al. 1998. Molecular determinants of Na⁺ channel function in the extracellular domain of the beta1 subunit. *J. Biol. Chem.* **273**:3954-3962.
40. McCormick, K.A., Srinivasan, J., White, K., Scheuer, T., and Catterall, W.A. 1999. The extracellular domain of the beta1 subunit is both necessary and sufficient for beta1-like modulation of sodium channel gating. *J. Biol. Chem.* **274**:32638-32646.
41. Zimmer, T., and Benndorf, K. 2002. The human heart and rat brain IIA Na⁺ channels interact with different molecular regions of the beta1 subunit. *J. Gen. Physiol.* **120**:887-895.
42. Malhotra, J.D., Thyagarajan, V., Chen, C., and Isom, L.L. 2004. Tyrosine-phosphorylated and nonphosphorylated sodium channel beta1 subunits are differentially localized in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **279**:40748-40754.
43. Wong, H.K., et al. 2005. beta Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and gamma-secretase. *J. Biol. Chem.* **280**:23009-23017.
44. Kim, D.Y., Ingano, L.A., Carey, B.W., Pettinelli, W.H., and Kovacs, D.M. 2005. Presenilin/gamma-secretase-mediated cleavage of the voltage-gated sodium channel beta2-subunit regulates cell adhesion and migration. *J. Biol. Chem.* **280**:23251-23261.
45. Kim, D.Y., et al. 2007. BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity. *Nat. Cell Biol.* **9**:755-764.
46. Miyazaki, H., et al. 2007. BACE1 modulates filopodia-like protrusions induced by sodium channel beta4 subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **361**:43-48.
47. Wallace, R.H., et al. 1998. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺-channel beta1 subunit gene SCN1B. *Nat. Genet.* **19**:366-370.
48. Chen, C., et al. 2004. Mice lacking sodium channel beta1 subunits display defects in neuronal excitability, sodium channel expression, and nodal architecture. *J. Neurosci.* **24**:4030-4042.
49. Scheffer, I.E., et al. 2007. Temporal lobe epilepsy and GEFS+ phenotypes associated with SCN1B mutations. *Brain*. **130**:100-109.
50. Audenaert, D., et al. 2003. A deletion in SCN1B is associated with febrile seizures and early-onset absence epilepsy. *Neurology*. **61**:854-856.
51. Nashef, L., Hindocha, N., and Makoff, A. 2007. Risk factors in sudden death in epilepsy (SUDEP): the quest for mechanisms. *Epilepsia*. **48**:859-871.
52. Rugg-Gunn, F.J., Simister, R.J., Squirrell, M., Holdright, D.R., and Duncan, J.S. 2004. Cardiac arrhythmias in focal epilepsy: a prospective long-term study. *Lancet*. **364**:2212-2219.
53. Wichmann, H.E., Gieger, C., and Illig, T. 2005. KORA-gen - resource for population genetics, controls and a broad spectrum of disease phenotypes. *Gesundheitswesen*. **67**(Suppl. 1):S26-S30.
54. Gaborit, N., Le Bouter, S., Szuts, V., Varro, A., Escande, D., Nattel, S., and Demolombe, S. 2007. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J. Physiol.* **582**:675-693.
55. Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. **25**:402-408.

Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 1 Comparison of p.Glu87Gln mutant function in $\beta 1$ - and $\beta 1B$ -subunits. (A) Representative traces of sodium current. (B) Current-voltage relationships for the p.Glu87Gln $\beta 1B$ -subunit (open circles, $n = 15$). The dotted lines in panels B-D indicate data for the Glu87Gln $\beta 1$ -subunit shown in Figure 5. (C) Voltage dependence of activation and inactivation. (D) Recovery from inactivation. Biophysical properties are provided in Supplemental Table 4.

Supplemental Table 1 Biophysical parameters of p.Glu87Gln β 1B

	Voltage dependence of activation			Voltage dependence of inactivation			Recovery from inactivation		
	$V_{1/2}$, mV	k , mV	N	$V_{1/2}$, mV	k , mV	N	τ_f , ms (%)	τ_s , ms (%)	N
Nav1.5 ^C	-46.2±1.0	7.1±0.4	29	-83.8±1.8	7.6±0.2	17	7.7±1.1 (87.2±1.1)	56.4±9.8 (11.6±1.0)	12
Nav1.5/WT β 1B ^C	-50.6±0.7 ^A	6.3±0.3	28	-94.2±1.3 ^A	7.6±0.2	14	7.4±1.0 (86.5±1.2)	43.3±8.6 (13.1±1.1)	14
Nav1.5/p.Glu87Gln β 1B	-44.2±0.6 ^B	8.2±0.4	15	-90.6±0.8 ^A	6.7±0.2	12	7.4±1.0 (87.6±1.1)	48.9±4.1 (11.5±1.1)	12
Nav1.5/p.Glu87Gln β 1 ^{C,D}	-44.9±1.4	7.7±0.4	18	-92.5±1.7 ^A	6.8±0.2	12	7.7±1.1 (89.1±1.1)	52.0±9.5 (10.4±1.1)	10

Values are shown as mean \pm SEM. ^A $P < 0.01$ when comparing versus Nav1.5 alone; ^B $P < 0.01$ when comparing versus Nav1.5 / WT β 1B. ^CValues of Nav1.5, Nav1.5/WT β 1B, and Nav1.5/p.Glu87Gln β 1 are also shown in Tables 1 and 2.

^DValues of Nav1.5/p.Glu87Gln β 1 were not compared with those of Nav1.5/WT β 1B.

Supplemental Table 2 Sequence of oligonucleotide primers for *SCN1B* screening

Exon	Forward primer	Reverse primer
1	CCTCTCGCGCCGCTATTAATACC	CGTGTCCCGAGCGCCACTC
2	GTGAGGGGTCTGGCATTGCT	TCCAGGTCAGCAATCACAGCAT
3	GGGTCAGGTAAGGGAAGAGAGG	TGTCCCTCCATCTGGCTCTC
4	CCCAGGGAGGTTGAGCCACT	CCTCTCTGGCAAGTGTGACGG
5	ACCGCTACCTTCCCCCATCC	GACTTCGGCCCCTCCCAATC
3A	GTCTACCGCCTGCTCTTCTTCG	CAGGCGTGTGCCTGCAGCTG

Supplemental Table 3 Characteristics of non-diseased heart donors

Subject No.	Gender	Age (years)	Tissues
1	Female	65	LV, RV
2	Female	49	LV, RV
3	Female	41	LV, RV
4	Female	35	LV, RV
5	Male	43	LV
6	Male	42	LV
7	Male	38	RV
8	Female	18	RV
9	Male	18	Purkinje
10	Male	20	Purkinje
11	Female	46	Purkinje
12	Female	49	Purkinje
13	Female	28	Purkinje
14	Female	65	Purkinje

LV, left ventricle; RV, right ventricle.

Supplemental Table 4 Sequence of oligonucleotide primers for quantitative PCR

Gene isoform	GenBank accession No.	Target Exons	Forward primer	Reverse primer	Probe
<i>SCN1B</i> (transcript isoform β 1)	NM 001037	3-4			TaqMan® Gene Expression Assay Hs00168897_m1
<i>SCN1B</i> (transcript isoform β 1B)	NM 199037	3A	CCACCGGAGAGCCAGAT	GCCTGTCCTGTCCACTGC	CTGCCATCTGTCCCTCC
<i>HPRT1</i>	NM 000194	6-7			TaqMan® Gene Expression Assay Hs99999909_m1

HPRT1, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1.

II.3.3- Etude #3c : Approche familiale : recherche d'un nouveau gène de syndrome de Brugada

II.3.3.1- Résumé des travaux antérieurs

La famille Mo vit à l'île de la Réunion, elle est d'origine européenne, et est suivie par le Docteur Bertrand Petit au Centre Hospitalier Sud Réunion à Saint-Pierre (Figure 25). Elle a été explorée à la suite du décès brutal d'un individu pendant un repas (individu III-9), à l'âge de 43 ans. Son frère jumeau, (III-11), le propositus, présentait un ECG de base évocateur d'un syndrome de Brugada (SBr). La stimulation ventriculaire n'a déclenché aucun trouble du rythme pour ce patient, mais en raison du contexte familial, un défibrillateur a été implanté. Six autres patients ont été diagnostiqués atteints après un test à la flecaïnide : III-13, IV-5, IV-9, IV-21, IV-24 et IV-25 (Figure 25). D'autres patients présentant un aspect de syndrome de Brugada de type II ou des troubles de conduction majorés par le test pharmacologique ont été classés douteux. La présence de transmetteurs dont l'ECG est normal même après test pharmacologique illustre les défauts de pénétrance observés dans le SBr.

Le locus du gène *SCN5A* [Chen *et al.*, 1998] et le deuxième locus de SBr en 3p22-25 [Weiss *et al.*, 2002], ainsi que le locus du gène *KCNIP2*, ont été exclus par génotypage de marqueurs microsatellites sur l'ensemble de la première branche de la famille (Figure 25, branche 1). Le gène *SCN5A* a également été exclu par séquençage chez le propositus, ainsi que les gènes *KCNE1*, *KCNE2*, *KCND2*, *KCND3*. En effet, les gènes *KCND2*, *KCND3*, et *KCNIP2* (*voltage-gated K⁺ Channel-Interacting Protein*) codent respectivement pour des canaux potassiques responsables du courant $I_{to,f}$ qui selon l'hypothèse d'Antzelevitch est en cause dans le SBr, et une protéine partenaire qui modifie l'expression membranaire et la densité du courant I_{to} [revue par Patel & Campbell, 2005].

Grâce à une analyse de liaison pan-génomique sur la première branche de la famille Mo et une autre famille parisienne suivie à l'hôpital Lariboisière à Paris (famille 17841, 4 individus atteints vivants), un locus morbide potentiel a été localisé sur le chromosome 17 (17q23-q24) par Marie Allouis (Inserm U533, Nantes) et Laetitia Gouas (Inserm U582, Paris) (résultats non publiés, [thèses de doctorat, Gouas L, 2005 ; Allouis M, 2005]). Dans ces deux familles, la plupart des individus atteints vivants sont asymptomatiques avec un ECG de base normal, suggérant que le gène impliqué serait responsable d'un SBr à faible expressivité. Malgré tout dans ces deux familles le premier événement cardiaque a été fatal pour trois individus à 36, 40, et 43 ans, et dans deux cas la mort subite est survenue la nuit. Dans la famille Mo, cet intervalle de 5,4 Mb comprenait 51 gènes dont 32 à expression cardiaque. Les gènes candidats positionnels *SCN4A* (forme prédominante du canal sodique

α dans le muscle squelettique, mais exprimée également dans le ventricule humain [Pereon *et al.*, 2003]), *KCNH6* (*HERG2*, *a priori* non exprimé dans le coeur), *TBX2*, *TBX4*, *GNA13*, *HAN11* ont été exclus par DHPLC (*SCN4A*) ou séquençage.

II.3.3.2- Résultats

1- Identification d'une nouvelle branche familiale

Afin d'étendre la famille et réduire la taille du locus du chromosome 17, les apparentés de l'individu II-2 qui transmet l'haplotype morbide ont été contactés par le Docteur Petit. Ainsi, trois nouveaux individus atteints ont pu être identifiés : l'individu III-24, l'individu III-30, et son fils, l'individu IV-34 (Figure 25, branche 2).

2- Poursuite de l'hypothèse du locus du chromosome 17

Tout d'abord, de nouveaux gènes de l'intervalle candidat du chromosome 17 ont été exclus : *ACE*, *THRAP1*, *SMURF2*, *PECAM1*, *ICAM2*, *MAP3K3*. J'ai réalisé ce séquençage en association avec Hélène Pollard, ingénieur dans l'équipe.

D'autre part, le chromosome 17 est parmi ceux qui connaissent le plus de remaniements. Par exemple, il a été montré par CGH que la région chromosomique 17q22-q24 est souvent remaniée dans les tumeurs [Barlund *et al.*, 1997 ; Tirkkonen *et al.*, 1998]. Des réarrangements génomiques ont été exclus par CGH-array avec des puces à façon (résultat non montré, principe et protocole en annexe F-II.2.3, page 203, Figure 48).

Puis, plusieurs éléments sont venus remettre en question la liaison au locus du chromosome 17. Premièrement, suite à un épisode de fièvre en mars 2006 (lié au virus Chikungunya), un SBr a été révélé chez le patient IV-17 qui ne possédait pas l'haplotype commun. Son frère jumeau a subi un nouveau test pharmacologique à l'ajmaline qui a révélé un SBr (IV-18). Deuxièmement, le génotypage des marqueurs sur la nouvelle branche familiale a démontré une ségrégation imparfaite de l'haplotype avec le syndrome puisque le patient III-24 ne possédait pas l'haplotype commun (résultat non montré).

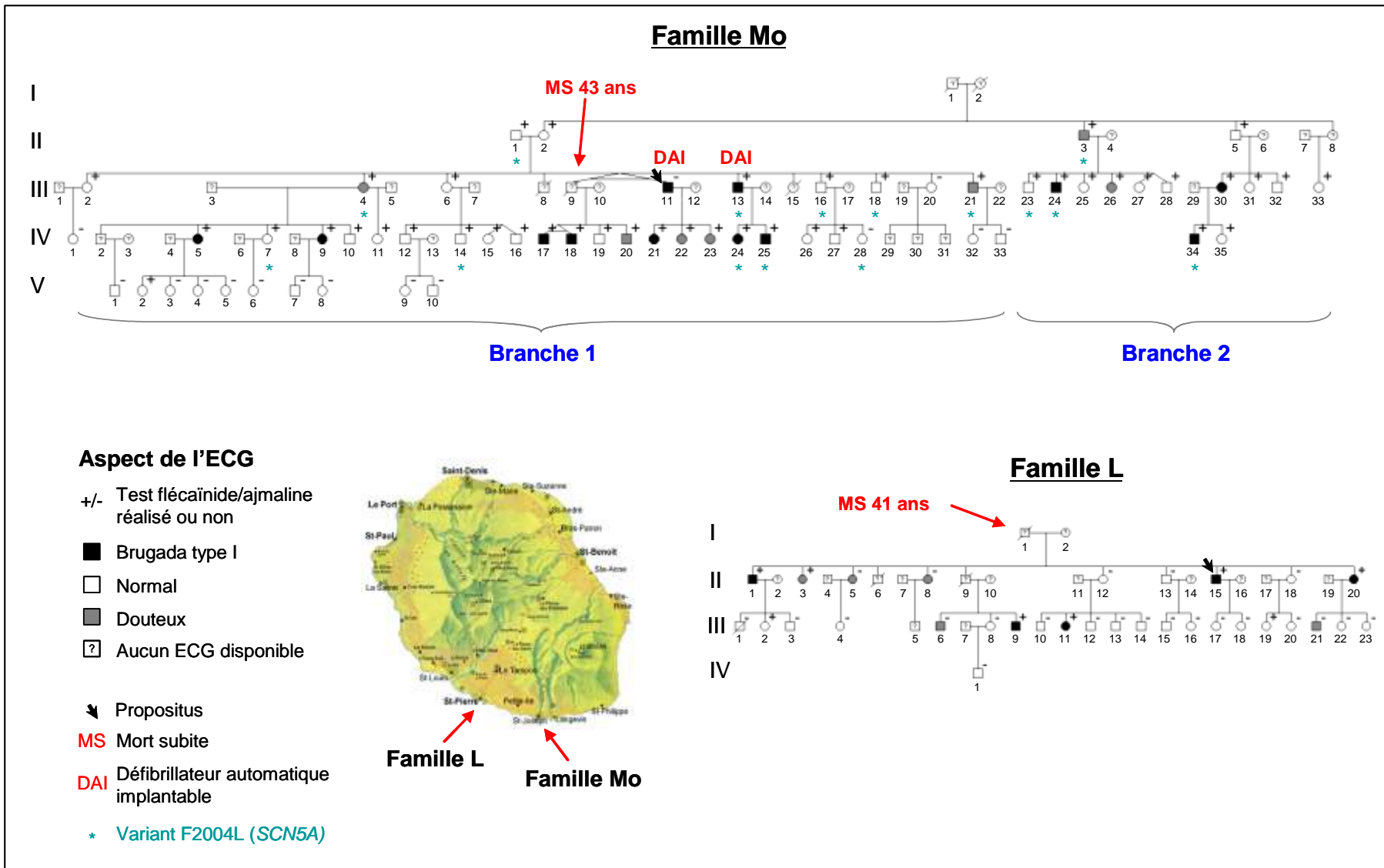


Figure 25 – Arbres généalogiques des famille Mo (branches 1 et 2) et famille L (île de la Réunion)

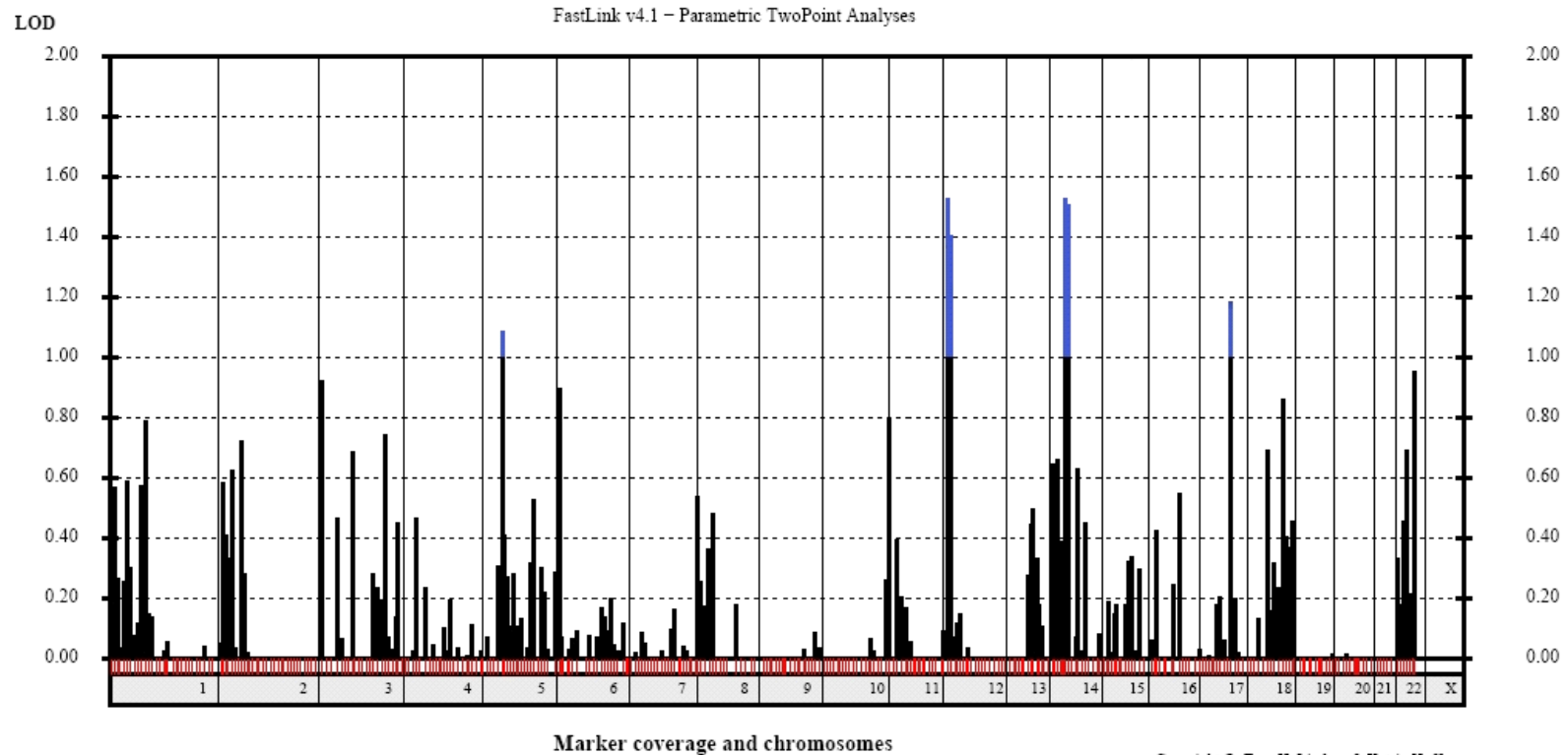
3- Identification d'un polymorphisme fréquent : SCN5A-F2004L

Etant donné la ségrégation imparfaite de l'haplotype du chromosome 17 dans la nouvelle branche familiale, les patients IV-17 et III-24 ont été séquencés pour le gène *SCN5A*, en faisant l'hypothèse qu'il pourrait s'agir de phénocopies. Un remaniement de type délétion ou duplication a été exclu par MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) sur ces deux patients (« SALSA MLPA KIT P108 SCN5A, Vs 03 », 17 sondes, MRC Holland) [Schouten *et al.*, 2002]. Le séquençage a identifié chez le patient III-24 un polymorphisme de l'exon 28 : F2004L. Ce variant est rare dans les populations caucasiennes et hispaniques [Ackerman *et al.*, 2004]. Il a été retrouvé chez trois cas de mort subite du nourrisson dans une cohorte norvégienne [Wang *et al.*, 2007a] et chez 2 femmes ayant succombé à une mort subite [Albert *et al.*, 2008]. Sa réexpression indique qu'il a peu d'effet fonctionnel, et il augmente le courant sodique persistant, ce qui est peu compatible avec un SBr. Ce polymorphisme ne ségrège pas avec le SBr dans la famille (Figure 25) mais il semble fréquent à l'île de la Réunion et pourrait être un facteur de modulation de l'expressivité du phénotype.

4- Analyse de liaison pan-génomique sur la nouvelle branche familiale

Après l'analyse de liaison pan-génomique sur la première branche de la famille Mo, plusieurs régions chromosomiques n'étaient pas informatives. En plus d'analyser plus finement ces régions en génotypant d'autres marqueurs, les résultats ont été mis en commun avec les analyses faites dans le laboratoire du Docteur Pascale Guicheney à Paris et avaient permis d'identifier un locus sur le chromosome 17 commun à la famille Mo étudiée à Nantes et une de leur famille. Cependant après la remise en cause de ce locus, l'identification d'une nouvelle branche familiale était une opportunité d'identifier un nouveau locus. Pour cela, j'ai entrepris une analyse de liaison pan-génomique sur la deuxième branche familiale. Le calcul des *LOD scores* deux-point (FastLink, protocole en annexe F-II.1.2.5, page 199) a identifié 4 régions avec un *LOD score* supérieur à 1 sur les chromosomes 5, 12, 14, et 17 (Figure 26). Les marqueurs du chromosome 17 correspondent à la région du chromosome 17 décrite dans le paragraphe II.3.3.1.

Project:	██████████	Inheritance:	Dominant	Marker	CHR	cM	LOD	Theta
Family name:	██████████	Common allele:	99.90 %	1. D12S99	12	12.60	1.5299	0.1000
Used map:	Marshfield STR (sex averaged)	Disease allele:	0.10 %	2. D14S1049	14	40.94	1.5260	0.1000
Marker positions:	386 ok	LC1 PCOPY rate:	0.00 %	3. D14S288	14	47.51	1.5080	0.0000
Allele frequencies:	All individuals (marker file)	LC1 PENET wt/mt:	80.00 %	4. D14S70	14	40.11	1.4769	0.1000
CALC interval:	Entire chromosome	LC1 PENET mt/mt:	80.00 %	5. D12S336	12	19.68	1.4052	0.0000



Copyright ©, Tom H. Lindner & Katrin Hoffmann
easyLINKAGE Plus v4.01beta, June 4, 2005

Figure 26 – Représentation graphique des valeurs de *LOD scores* pour l'analyse de liaison pan-génomique sur les deux branches de la famille Mo

Récemment, le docteur Petit a identifié une autre famille constituée de 5 patients atteints d'un SBr et qui habite à environ 10 km de la famille Mo (famille L, Figure 25). Un patronyme commun aux deux familles laissait penser qu'ils pouvaient avoir un ancêtre commun. La généalogie de l'île de la Réunion est entièrement connue jusqu'en 1810 et a permis de relier aisément la famille Mo et la famille L. Leur ancêtre commun est né vers 1642 dans la Nièvre (Bourgogne) et est arrivé à l' « île Bourbon » en 1674. Il a eu 12 enfants et est décédé en 1720 à Saint-Paul. Les loci identifiés par l'analyse de liaison pourront être testés sur la famille L, en faisant l'hypothèse que le SBr des deux familles est lié au même effet fondateur. Le séquençage du gène *SCN5A* chez le propositus de la famille L a exclu son implication.

D'autres familles réunionnaises atteintes de SBr ont été prises en charge par le CHU de Nantes pour un diagnostic génétique du gène *SCN5A*, le plus fréquemment impliqué dans le SBr à ce jour. Ces familles présentaient les mutations D84N (G250A) dans l'exon 2, R1232W (C3694T) dans l'exon 21, et E1784K (G5350A) dans l'exon 28. J'ai exclu ces mutations chez tous les atteints et probablement atteints des familles Mo et L pour réduire le risque de phénocopies.

II.3.4-Discussion (projet #3, recherche de nouveaux gènes pour le syndrome de Brugada)

La faible pénétrance du SBr et la fluctuation dans le temps de sa manifestation électrocardiographique rendent difficile l'identification de grandes familles pour des analyses de liaison pan-génomiques. L'étude #3a illustre que même dans les familles où le gène est identifié (*SCN5A*), la transmission est complexe, et qu'il est donc difficile d'identifier de nouveaux gènes par analyse de liaison. En effet, certains patients n'ont pas la mutation familiale et de nombreux porteurs de la mutation familiale sont non-pénétrants.

L'île de la Réunion est un isolat géographique et par conséquent l'identification de familles y est plus aisée même si le défaut de pénétrance reste un problème majeur. L'étude génétique de la grande famille Réunionnaise (famille Mo) illustre à nouveau la difficulté de l'élucidation de nouveaux gènes pour le SBr par une approche familiale. Malgré l'identification d'une grande famille, la variabilité des phénotypes complique l'analyse de liaison. En effet la piste d'un nouveau locus sur le chromosome 17 a été invalidée, après plusieurs mois de travail pour tenter d'identifier le gène morbide, par deux nouveaux cas de SBr ne partageant pas l'haplotype morbide, dont un était précédemment considéré sain.

L'hétérogénéité génétique manifeste du SBr et les enjeux thérapeutiques et préventifs invitent à poursuivre activement la recherche de nouveaux gènes morbides dans cette famille de l'île de la Réunion et dans d'autres familles locales étudiées au laboratoire. Pour la famille Mo, nous projetons de réaliser une analyse de liaison pan-génomique avec des marqueurs SNP, à l'image des résultats concluants obtenus pour l'analyse de la famille B (paragraphe II.2.2.2, page 117). Ces marqueurs permettraient de couvrir les régions encore non informatives ou peu couvertes par les marqueurs microsatellites notamment dans les régions télomériques, et potentiellement d'identifier un nouveau locus.

Compte tenu des difficultés de l'approche familiale, une approche largement utilisée pour le syndrome de Brugada est l'approche gène candidat. Une collaboration entre notre équipe et les équipes de Connie Bezzina (Academic Medical Center, Amsterdam, Pays-Bas) et Dan Roden (Vanderbilt University, Nashville, Etats-Unis) a permis d'identifier un nouveau gène pour le syndrome de Brugada : *SCN1B* (**Article 4**). A l'image du gène *SCN4B* impliqué récemment dans le syndrome du QT long [Medeiros-Domingo *et al.*, 2007], il s'agit d'une forme génétique rare puisqu'un nombre limité de familles est concerné. Ces données soulignent l'importance des sous-unités régulatrices dans le maintien de l'activité électrique cardiaque normale et leur implication dans les pathologies héréditaires. Depuis, des variants

dans les gènes *SCN1B* et *SCN2B* ont été identifiés chez des individus atteints de fibrillation auriculaire [abstract AHA : Watanabe *et al.*, 2007] et viennent appuyer ces observations.

Le phénotype majeur chez les patients porteurs d'une mutation *SCN1B* est, comme pour les mutations *SCN5A* un trouble de conduction. Certains patients mutés dans l'un de ces deux gènes présentent uniquement un syndrome de Brugada, d'autres présentent uniquement des troubles de conduction, et d'autres présentent les deux phénotypes associés. Le fond génétique est donc déterminant dans l'expressivité des mutations sodiques. Ce qui détermine le phénotype observé est inconnu. Les objectifs futurs seront d'identifier les polymorphismes, par exemple dans *SCN5A* (paragraphe I-2.8.1.3, page 53), et les gènes modificateurs agissant sur l'expressivité du phénotype.

En conclusion, ces résultats ainsi que les données de la littérature démontrent clairement la plus grande efficacité de l'approche gène candidat pour identifier de nouveaux gènes à effet majeur pour le syndrome de Brugada [Chen *et al.*, 1998 ; Antzelevitch *et al.*, 2007]. L'utilisation de technologies haut-débit d'analyse de liaison (marqueurs SNP et CNV) pour les formes familiales, et la détection de réarrangements et le re-séquençage d'exons à l'échelle du génome entier sur de grandes cohortes de patients, pourraient permettre d'identifier de nouveaux gènes à effet majeur ou modulateurs.

III- Génétique des troubles du rythme héréditaires : discussion générale

La compréhension du lien entre génotype et phénotype améliore le diagnostic et le traitement des arythmies cardiaques. Le phénotype peut être analysé à différents niveaux d'intégration. L'anomalie peut être observée au niveau de la protéine, du phénotype cellulaire, et du phénotype de l'organe (observé à l'ECG et par les manifestations cliniques chez les patients). A chaque niveau, les facteurs environnementaux et les facteurs génétiques peuvent affecter le phénotype.

Plusieurs approches, études familiales ou cas-témoin, sont utilisées pour étudier le lien entre génotype et phénotype clinique. L'identification du gène ne permet toutefois pas à elle seule de comprendre le phénotype. L'étape indispensable est donc de caractériser les effets de la mutation au niveau cellulaire, souvent en étudiant le gène muté en système de réexpression hétérologue (ovocytes de Xénope ou cellules COS, CHO, HEK) dans le domaine des canalopathies. Cependant cette étape est limitée puisqu'elle ne permet que d'évaluer les courants et le trafic des protéines, sans tenir compte de la physiologie complexe d'un cardiomyocyte. Cette approche est d'autant plus inadaptée pour les protéines non canalaire, comme l'ankyrine-B, pour lesquelles une approche *in vivo* est souvent nécessaire. Les modèles animaux notamment les approches de transgénèse chez la souris ont permis d'élucider les mécanismes physiopathologiques de nombreux variants responsables d'arythmies. De part leur physiologie cardiaque différente de l'homme, l'utilisation de ces modèles est toutefois limitée. Par exemple, l'absence de segment ST sur l'ECG murin ne permet pas d'utiliser la souris pour l'étude du syndrome de Brugada. Enfin les mutations peuvent également être étudiées par réexpression dans des cardiomyocytes isolés mais proviennent toujours de modèles animaux où l'électrophysiologie diffère de celle de l'homme en particulier les cellules néonatales qui sont plus faciles à cultiver et à transfecter. Les cardiomyocytes dérivés de cellules souches embryonnaires humaines pourraient représenter une alternative pour de telles études si les difficultés techniques sont surmontées [He *et al.*, 2003].

A défaut d'avoir des modèles murins invalidés pour chaque gène à expression cardiaque, les études génétiques sont déterminantes pour la compréhension des phénotypes cliniques observés. Malgré tout à ce jour, aucune explication génétique n'est trouvée pour 25% des syndromes du QT long, 35% des syndromes d'Andersen, 75% des syndromes de Brugada, et 40% des tachycardies ventriculaires polymorphes catécholergiques [Lehnart *et al.*, 2007].

Génétique des troubles du rythme cardiaque : perspectives

Les technologies récentes de génomique et les outils bioinformatiques en développement permettent d'envisager de mieux prédire le risque de mort subite pour les maladies cardiaques rares ou communes [revue par Arking *et al.*, 2004]. Un des défis de ces prochaines années sera d'identifier les variations génétiques de susceptibilité à la mort subite cardiaque. Ces variations génétiques sont plus fréquentes dans la population générale que les mutations à effet majeur mais sont associées à un risque individuel plus faible. Leur identification nécessite la mise en place d'études d'association portant sur un grand nombre d'individus. L'objectif du réseau transatlantique Leducq « *Alliance Against Sudden Cardiac Death* » dont fait partie l'institut du thorax est d'identifier ces facteurs génétiques majeurs ou facteurs de susceptibilité. Un projet est actuellement en cours pour identifier les gènes modificateurs pour le syndrome du QT long de type 2. L'étude inclut 642 patients porteurs d'une mutation dans le gène *KCNH2* et présentant un aspect électrocardiographique normal ou LQT2. Ces patients sont génotypés pour 1 536 TagSNP répartis dans 19 gènes codants principalement pour des canaux ioniques ou des protéines régulatrices de ces canaux et impliqués dans des arythmies (« *GoldenGate Genotyping Assay* », Illumina). Un autre projet a été initié dans le cadre du réseau Leducq par le CHU de Nantes et l'institut du thorax pour identifier des facteurs de susceptibilité à la mort subite. Ce protocole d'investigation clinique consiste à créer un registre de surveillance épidémiologique exhaustive de la mort subite extrahospitalière de l'adulte. Parallèlement à la création de ce registre nommé FASTER (*France Atlantic Sudden death Epidemiologic Registry*), une banque d'ADN pour la réalisation d'une étude cas-témoin est en cours de constitution. L'inclusion de patients ayant succombé ou survécu à une mort subite cardiaque a débuté l'année dernière en Loire-Atlantique.

Génétique des troubles du rythme cardiaque : conclusion

Dans ce domaine complexe de la génétique des cardiopathies rythmiques, mes recherches ont permis de préciser le rôle de l'anhydrase carbonique-2 dans la dysfonction sinusale et d'améliorer la compréhension des relations génotype-phénotype des mutations du gène *ANK2*, d'identifier un premier locus pour un nouveau syndrome de repolarisation précoce maligne, et un nouveau gène, *SCN1B*, pour le syndrome de Brugada et les troubles de conduction.

D- Génétique du rétrécissement aortique calcifié

I- Introduction

I.1- Généralités sur le rétrécissement aortique

Le rétrécissement aortique sévère symptomatique est responsable d'une mortalité non négligeable chez les sujets âgés. Il s'agit de la troisième cause principale de cardiopathie chez l'adulte, de la valvulopathie la plus commune, et de la première cause de remplacement chirurgical valvulaire en Europe et aux Etats-Unis. Sa prévalence augmente rapidement avec le vieillissement de la population. Malgré sa fréquence élevée, peu d'éléments sont connus sur les mécanismes physiopathologiques et les traitements pharmacologiques préventifs sont inexistants.

Pendant près d'un siècle, le mécanisme a été attribué à un processus passif dégénératif. Il était supposé que l'usure et la déchirure (« *wear and tear* ») de la valve avec l'âge conduisaient à un dépôt passif de calcium. Depuis une dizaine d'années, de nombreuses études cliniques et expérimentales ont démontré que le mécanisme pathologique est en fait un **processus actif de remodelage tissulaire**, biologiquement régulé. Après une brève description de ce qu'est le rétrécissement aortique calcifié (RAC, *CAVS*, *Calcific Aortic Valve Stenosis*) et ses étiologies, je décrirai dans cette partie les aspects cliniques de cette valvulopathie cardiaque et les hypothèses sur les voies cellulaires et les facteurs de prédisposition impliqués dans son développement et sa progression [revues par Chan, 2003 ; Rajamannan *et al.*, 2003a ; Freeman & Otto, 2005 ; Aronow, 2007 ; Goldberg *et al.*, 2007 ; Rajamannan *et al.*, 2007].

La valve aortique permet le passage du sang oxygéné du ventricule gauche vers l'aorte de façon unidirectionnelle et s'ouvre au moment de la contraction du muscle cardiaque, la systole (Figure 34, Figure 35, page 181). Son ouverture et sa fermeture dépendent de la différence de pression de chaque côté de la valve. La différence de pression entre l'amont et l'aval, le **gradient transvalvulaire**, est faible (< 5 mmHg).

Cette valve est normalement tricuspide, constituée de trois feuillets appelés sigmoïdes ou *cusps*, fines et séparées par des commissures, et la **surface valvulaire aortique** est de 2 à 4 cm² (Figure 27). Le feuillet valvulaire comprend trois couches : le « *ventricularis* » du côté ventriculaire (fibres d'élastine), la « *fibrosa* » du côté aortique (fibroblastes, fibres de collagène), et la « *spongiosa* », tissu conjonctif, située entre les deux autres couches (fibroblastes, cellules mésenchymateuses, mucopolysaccharides).



Figure 27 – Valve aortique humaine saine

Cette valve non sclérosée ni sténosée qui provient d'une femme de 84 ans décédée d'un infarctus du myocarde est tricuspide, lisse, et fine, dépourvue de nodules calcifiés. D'après [Olsson et al., 1994].

Quand le sang s'écoule par une valve trop étroite (**sténose** ou **rétrécissement**, qui est précédée d'une **sclérose** ou épaissement), ou quand il reflue si la valve fuit (**insuffisance**), il est possible de détecter un souffle à l'auscultation.

Le RAC est défini comme une sténose de la valve aortique, causée par une calcification progressive qui diminue la surface par laquelle le sang peut être éjecté dans l'organisme (Figure 28). Les nodules calcifiés sont formés de cristaux d'hydroxyapatite, de protéines matricielles de l'os, et d'ostéoblastes et ostéoclastes matures [O'Brien et al., 1995 ; Mohler et al., 2001 ; Rajamannan et al., 2003b]. La diminution de la surface aortique constitue un obstacle à l'éjection du sang du cœur vers le reste de l'organisme. Cela provoque une augmentation du gradient transvalvulaire et peut avoir pour conséquence une hypertrophie du ventricule gauche par compensation pour maintenir une fraction d'éjection normale, et par la suite une insuffisance cardiaque. Le suivi des patients à long terme montre une évolution progressive du rétrécissement de 0,1 cm² par an en moyenne, associée à une augmentation de gradient de 7 à 10 mmHg. Ces valeurs varient d'un patient à l'autre [Brener et al., 1995], et de nombreux facteurs pourraient intervenir dans l'aggravation de l'évolution notamment le profil lipidique [Palta et al., 2000 ; Yilmaz et al., 2004].

L'âge d'apparition de la calcification et des symptômes est dépendante du type de rétrécissement aortique (RA, [Campbell, 1968]), le plus fréquent en Europe étant le RAC dégénératif (~82%), suivi par le RA rhumatismal (~11%), congénital (~5%), et conséquent à une endocardite (~1%) [Lung et al., 2003]. L'aspect anatomique des valves calcifiées permet de distinguer plusieurs étiologies majeures :

- **RA calcifié** ou **dégénératif** ou « *senile* » (Figure 28, A et B) : c'est la valvulopathie la plus fréquente dans les pays développés. Elle apparaît chez les patients âgés [Passik et al.,

1987]. Sa prévalence est de 2% à 4% chez les patients de plus de 65 ans et elle atteint 5,5% après 85 ans [Lindroos *et al.*, 1993 ; Stewart *et al.*, 1997 ; Freeman & Otto, 2005]. Le RA est dû à des calcifications progressives de la périphérie vers le centre de l'anneau valvulaire, ce qui aboutit à la formation d'un bloc calcifié immobile. Les commissures ne sont pas fusionnées comme dans le RA rhumatismal. Les calcifications peuvent atteindre le faisceau de His et créer des troubles de conduction. Elle apparaît souvent sur valve bicuspidie, la bicuspidie aortique étant la malformation cardiaque la plus fréquente chez l'homme, touchant 1 à 2% de la population [Fedak *et al.*, 2002 ; Hoffman & Kaplan, 2002] et qui de plus a peut être été sous-estimée [Martin *et al.*, 2007a]. Les turbulences conséquentes à l'ouverture incomplète de la valve conduisent à une usure prématurée et favorisent la survenue de fibrose et calcification précoces [Pomerance, 1972 ; Beppu *et al.*, 1993 ; Roberts & Ko, 2005]. Le remplacement chirurgical a lieu entre la 50^e et 60^e année de vie, alors que sur valve tricuspide, la chirurgie devient nécessaire plus tardivement entre la 70^e et 80^e année (67 ans contre 74 ans en moyenne, [Roberts & Ko, 2005]). Les mécanismes pathologiques semblent être en partie similaires, notamment l'infiltration de cellules inflammatoires [Wallby *et al.*, 2002]. On associe cette forme à la maladie de Mönckeberg [Mönckeberg, 1904]. Il faut la distinguer de la sclérose de Mönckeberg [Mönckeberg, 1903] qui touche les artères et est caractérisée par la présence de nombreuses cellules musculaires lisses et peu d'ostéopontine [Shanahan *et al.*, 1999].

- **RA rhumatismal** (Figure 28, C) : complication fréquente du rhumatisme articulaire aigu dû à une infection au streptocoque. La symphyse des commissures valvulaires provoque un épaissement par fibrose des valves, et plus tard de calcifications au niveau des commissures. La valve mitrale est très souvent atteinte également. Cette forme de RA devient symptomatique plus tôt au cours de la troisième ou quatrième décennie de vie, et nécessite une chirurgie plus précoce par rapport à la forme « dégénérative ». Cette cause représentait la majorité des cas de valvulopathie acquise, mais elle est devenue mineure dans les pays développés grâce notamment à l'utilisation des antibiotiques en traitement des angines.

- **RA congénital** : l'obstruction est innée et peut siéger au niveau sous-valvulaire, valvulaire ou supra-valvulaire. Le rétrécissement aortique congénital valvulaire est dû à une fusion des commissures que la valve soit tricuspide, bicuspidie, ou unicuspidie. On retrouve généralement une importante hypertrophie du ventricule gauche et le risque de mort subite est plus élevé même en l'absence de symptômes. Le diagnostic se fait le plus souvent dans l'enfance et avant 30 ans.

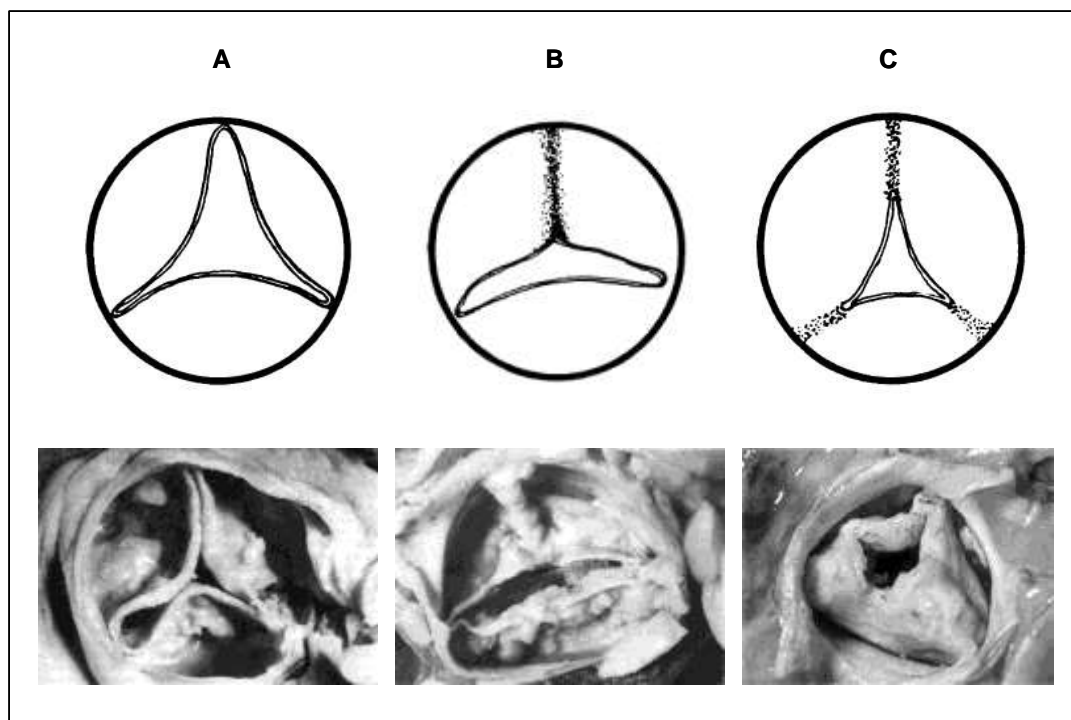


Figure 28 – Valves aortiques humaines avec RA dégénératif sur valve tricuspide (A) ou bicuspide (B) et RA rhumatismal (C)

En haut : Représentation schématique des différentes causes de sténose acquise de la valve aortique.

En bas : Vue photographique du versant aortique. Modifié d'après [Pomerance, 1972].

I.2- Aspects cliniques

I.2.1- Facteurs de risque, symptômes, et pronostic

Les facteurs de risque sont similaires aux maladies cardio-vasculaires et en particulier à l'athérosclérose : âge, hypercholestérolémie, tabagisme, sexe masculin, hypertension, et diabète [Mohler *et al.*, 1991 ; Stewart *et al.*, 1997 ; Peltier *et al.*, 2003]. L'hypercholestérolémie familiale a été corrélée au développement de rétrécissement aortique [Sprecher *et al.*, 1984 ; Rallidis *et al.*, 1998]. De plus, l'aspect des lésions précoces des valves associant inflammation et infiltration lipidique ressemble aux lésions athérosclérotiques. Cependant, il existe des disparités entre les caractéristiques des deux pathologies surtout à un stade plus avancé. En effet, la calcification est moins étendue dans le cas de l'athérosclérose, alors que la sclérose valvulaire évolue progressivement vers une calcification majeure responsable d'une sténose et les cellules musculaires lisses sont moins nombreuses [Otto *et al.*, 1994]. De plus seuls 50% des patients présentant un RAC sévère ont une maladie coronarienne associée et la plupart des patients présentant une maladie coronarienne n'ont pas de RAC [Otto & O'Brien, 2001].

La sclérose aortique qui est fréquente (~25% des individus de 65-75 ans) [Otto *et al.*, 1999] peut évoluer ou non vers une sténose aortique. Dans une étude sur 2 000 patients, le risque a été évalué à 16%, et l'intervalle de temps moyen entre le diagnostic de sclérose aortique et la sténose aortique sévère était de 8 ans [Cosmi *et al.*, 2002].

Par ailleurs, l'insuffisance rénale a été évoquée comme pouvant être responsable de l'aggravation de l'évolution du RA [Urena *et al.*, 1999]. En effet l'anomalie du métabolisme phosphocalcique en cas d'insuffisance rénale chronique est impliquée dans les processus de calcifications vasculaires et valvulaires [Maher *et al.*, 1987 ; Beck *et al.*, 2000 ; Reynolds *et al.*, 2004 ; Torun *et al.*, 2005] [revue par Moe & Chen, 2004].

Même si les patients restent asymptomatiques pendant longtemps alors que la maladie progresse, le risque d'événement cardiaque est plus grand. En effet, les patients qui présentent une sclérose aortique ont un risque augmenté de 50% d'infarctus du myocarde [Otto *et al.*, 1999] et les facteurs de risque sont similaires [Pohle *et al.*, 2001]. Le risque de mort subite est faible chez les patients asymptomatiques (< 2%). Le degré de calcification qui contribue à l'épaississement et la rigidité des valves est important dans la prédiction clinique de la rapidité de progression. Une calcification sévère même sans symptôme est de mauvais pronostic et nécessite un suivi régulier [Rosenhek *et al.*, 2000 ; Rosenhek *et al.*, 2004a]. La mesure du taux de peptides natriurétiques de type B au niveau plasmatique pourrait aider au pronostic chez les patients asymptomatiques puisqu'il évolue avec la sévérité de la sténose et la dysfonction ventriculaire gauche [Gerber *et al.*, 2003 ; Bergler-Klein *et al.*, 2004 ; Bergler-Klein *et al.*, 2007]. Les peptides natriurétiques A, B, C sont différenciellement touchés et pourraient réguler l'évolution du RAC [Peltonen *et al.*, 2007].

Le rétrécissement serré de la valve provoque un obstacle à l'éjection du sang dans l'aorte, qui se traduit par une inadaptation du débit cardiaque à l'effort dont la manifestation clinique commune est l'essoufflement (dyspnée).

Les symptômes classiques survenant en cas de RA sévère sont l'angine de poitrine ou angor (35% des patients), la syncope (15% des patients), et dans les formes les plus graves l'insuffisance cardiaque. Dans ce dernier cas la survie devient courte (1,5 à 2 ans) alors qu'elle est de 3 ans après la première apparition des deux autres symptômes. Des études avaient montré sur un suivi à long terme qu'en cas de RAC sévère non opéré, 52% des patients meurent à 5 ans, et 90% à 10 ans [Frank *et al.*, 1973 ; Braunwald, 1990].

La sévérité du rétrécissement et les symptômes font partie des critères de décision pour le remplacement chirurgical valvulaire et le suivi échocardiographique dont les indications sont discutées [Bonow *et al.*, 2006 ; Pai *et al.*, 2006].

I.2.2- Diagnostic

Avant l'apparition de symptômes, un souffle systolique au foyer aortique, témoignant de la valvulopathie, peut être détecté en visite médicale de routine par **auscultation**, et nécessiter des examens complémentaires par un cardiologue. Malgré tout, le diagnostic est souvent tardif car il se fait la plupart du temps à l'apparition des premiers symptômes, quand le RAC est déjà sévère.

L'examen de choix est l'**échographie cardiaque** qui permet de visualiser directement l'aspect, l'épaisseur, le mouvement des sigmoïdes et d'apprécier la fonction du muscle cardiaque, en particulier de détecter une hypertrophie du ventricule gauche consécutive au RA. Elle est couplée au **Doppler** (ultrasons) qui analyse la vitesse du sang au niveau de l'orifice aortique (gradient de pression transvalvulaire) et permet de visualiser une fuite associée (insuffisance aortique) et de quantifier un rétrécissement (surface valvulaire aortique diminuée) [Skjaerpe *et al.*, 1985 ; Zoghbi *et al.*, 1986 ; Come *et al.*, 1988 ; lung *et al.*, 2002]. Pour mieux visualiser les détails des valves et mesurer directement la surface aortique, cet examen peut être complété par une échographie trans-oesophagienne. L'ECG peut révéler des signes d'hypertrophie du ventricule gauche.

Des recommandations ont été données pour classier le RAC en fonction notamment de la surface valvulaire aortique et du gradient transvalvulaire moyen. Elles sont représentées dans le Tableau 13.

Tableau 13 – Critères simplifiés pour le diagnostic du RAC

Sténose	Surface valvulaire aortique	Gradient transaortique moyen
Légère	> 1,5 cm ²	< 25 mmHg
Modérée	1-1,5 cm ²	25-40 mmHg
Sévère	< 1 cm ²	> 40 mmHg

D'après [Bonow et al., 2006].

La méthode « *Electron-beam Computed Tomography* » utilisée pour mesurer la calcification coronarienne pourrait être complémentaire pour évaluer la sévérité du RAC [Messika-Zeitoun *et al.*, 2004].

I.2.3- Prise en charge thérapeutique : le remplacement chirurgical valvulaire

Depuis le début des années 60 et les premières chirurgies de remplacement valvulaire aortique, l'espérance de vie des patients symptomatiques a considérablement augmenté

[Lindblom *et al.*, 1990]. Le RAC « dégénératif » constitue aujourd'hui la première cause de remplacement chirurgical valvulaire dans les pays développés.

Deux types de prothèses existent : les valves **mécaniques** (longue durée de vie, mais traitement anticoagulant à vie), et les valves **biologiques** (souvent porcines, risque plus élevé de dégénérescence, mais pas de traitement anticoagulant). Le choix de la valve sera donc fonction de l'âge du patient, de sa capacité à respecter le traitement, et de son mode de vie [Rahimtoola, 2003]. Le risque de mortalité opératoire est plus élevé chez les patients très âgés, et est inférieur à 5% [Connolly *et al.*, 1997 ; Kolh *et al.*, 1999].

Récemment une nouvelle option thérapeutique expérimentale a émergé mais elle est encore controversée : le remplacement valvulaire aortique percutané [Cribier *et al.*, 2004 ; Webb *et al.*, 2007]. Elle pourrait un jour se substituer à l'opération à cœur ouvert, nécessitant une mise sous circulation extracorporelle temporaire. Elle n'est actuellement utilisée que dans certains centres médicaux et pour certaines indications, en particulier les patients récusés par la chirurgie classique.

Malgré les progrès considérables dans la prise en charge chirurgicale ces dernières décennies, très peu de progrès ont été réalisés dans la compréhension de la physiopathologie de la maladie et il n'existe pas de traitement pharmacologique efficace pour ralentir ou stopper l'évolution du rétrécissement. La seule solution thérapeutique est actuellement la chirurgie, intervention lourde en particulier pour les patients âgés. Certains traitements sont administrés aux patients inopérables (digitaliques, diurétiques), mais ils permettent seulement une amélioration transitoire des symptômes.

Etant donné les ressemblances histologiques entre RAC et athérosclérose, le traitement par les statines (inhibiteurs de la 5-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase) agissant comme anti-hypercholestérolémiants et/ou anti-inflammatoires a été proposé pour diminuer la progression de la calcification et la sténose. Pour l'instant les résultats des études cliniques sont mitigés [Novaro *et al.*, 2001 ; Pohle *et al.*, 2001 ; Aronow *et al.*, 2001 ; Bellamy *et al.*, 2002 ; Shavelle *et al.*, 2002 ; Rosenhek *et al.*, 2004b] [revue par Liebe *et al.*, 2006] et peu d'études prospectives ont été menées [Cowell *et al.*, 2005 ; Moura *et al.*, 2007]. D'autres études sur de plus larges cohortes de patients sont nécessaires pour établir des recommandations thérapeutiques. Les conclusions d'études prospectives en cours comme ASTROMER (*Canadian Aortic Stenosis Progression Observation Measuring Effects of Rosuvastatin*) [Chan *et al.*, 2007] dont les résultats sont annoncés pour fin 2008 et SEAS (*European Simvastatin and Ezetimibe in Aortic Stenosis*) [Rossebo *et al.*, 2007] sont très attendues.

D'autre part, les enzymes de conversion de l'angiotensine-II (ACE, *Angiotensin-Converting Enzyme*) sont exprimées [O'Brien *et al.*, 2002] et sur-représentées dans les valves atteintes [Helske *et al.*, 2004]. L'angiotensine-II pourrait participer à la progression de la fibrose et est une cible thérapeutique éventuelle. Cependant comme pour les études concernant l'effet des statines, les premiers résultats sur l'utilisation d'inhibiteurs de l'ACE sont contradictoires [Rosenhek *et al.*, 2004b ; O'Brien *et al.*, 2005].

Une revue des traitements pharmacologiques envisageables étant donné les voies touchées dans le développement du RAC a été réalisée [Helske *et al.*, 2007a]. Ces traitements devront être administrés dès les premiers indices de RAC pour être efficaces, avant que la calcification ne soit sévère.

Devant l'enjeu d'identifier des cibles thérapeutiques, les études sur le RAC sont nombreuses mais souvent descriptives et s'intéressent surtout aux aspects cliniques et cellulaires. De nombreuses voies physiopathologiques ont été incriminées et elles seront parcourues dans la partie qui suit.

I.3- Hypothèses physiopathologiques

Les mécanismes conduisant à la sténose aortique sont sans doute multiples, associant des facteurs génétiques déterminant le métabolisme du calcium et l'anatomie des valves (bicuspidés ou tricuspides) et des facteurs environnementaux et hémodynamiques, conduisant conjointement à une perte de l'homéostasie tissulaire du calcium.

Les lésions précoces sont un épaissement sous-endothélial du versant aortique du feuillet valvulaire ou sclérose. L'épaississement est dû à un dépôt lipidique, une infiltration de cellules inflammatoires, macrophages et lymphocytes-T, et une rupture de la membrane basale [Otto *et al.*, 1994 ; Olsson *et al.*, 1994]. Le remodelage de la matrice extracellulaire incluant la synthèse de collagène et la dégradation d'élastine par les métalloprotéases et les cathepsines contribuent à la rigidification des feuillets (Figure 29, Figure 30). Les myofibroblastes effectuent une transdifférenciation vers un phénotype de cellules ostéoblastiques conduisant à des nodules calcifiés. Cette prolifération des cellules musculaires lisses et des cellules riches en lipides ressemble aux lésions retrouvées au niveau des plaques d'athérosclérose [Otto *et al.*, 1994]. Puis, l'épaississement de la valve et la calcification conduisent progressivement à une apparence d'os mature lamellaire avec des néovaisseaux, des ostéoblastes, ostéoclastes, des micro-fractures, et parfois une ossification endochondrale [Mohler *et al.*, 2001].

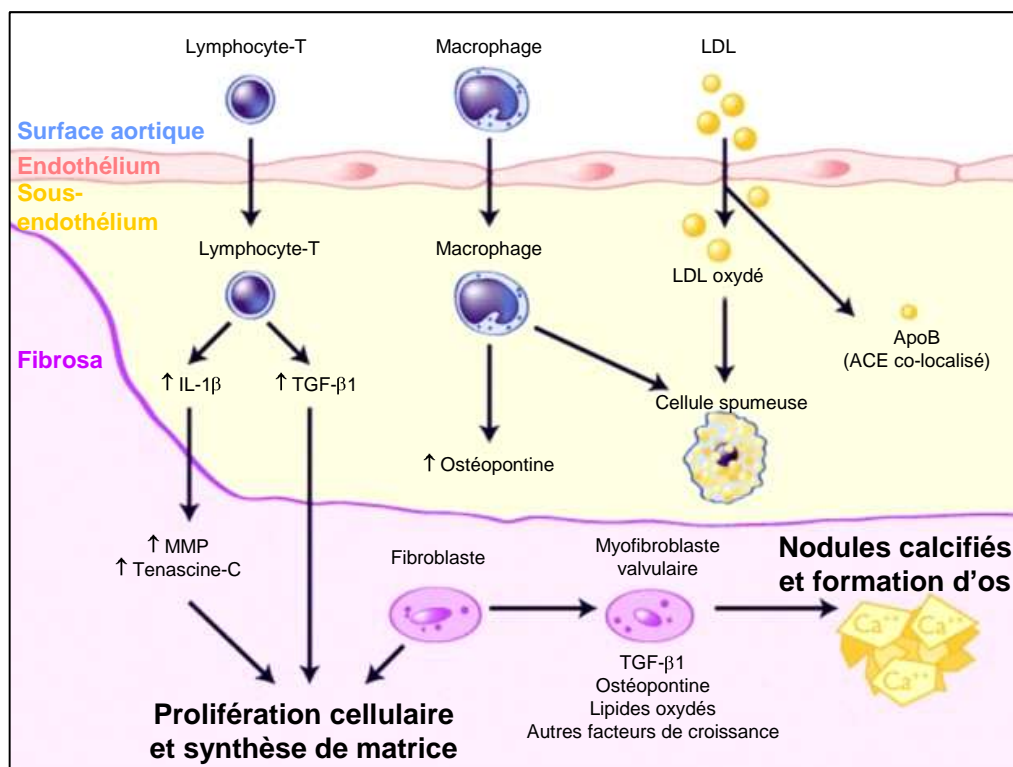


Figure 29 – Mécanismes potentiels simplifiés de l'inflammation et l'infiltration lipidique conduisant à la calcification de la valve aortique

ACE, Angiotensin-converting enzyme, *ApoB* : Apolipoprotéine B, *IL-1β* : Interleukin-1β, *LDL* : Low-density lipoprotein, *MMP* : Matrix metalloproteinase, *TGF-β1* : Transforming growth factor β1. Modifié d'après [Freeman & Otto, 2005].

Différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer les mécanismes de la calcification cardio-vasculaire : perte d'inhibition, induction de formation osseuse, complexes phosphocalciques circulants, et mort cellulaire [revue par Speer & Giachelli, 2004].

Ainsi, le RAC précédemment considéré comme « dégénératif », lié uniquement au vieillissement, est en fait un phénomène actif [revues par Freeman & Otto, 2005 ; O'Brien, 2006 ; Helske *et al.*, 2007a]. Le stress mécanique pourrait être à l'origine des lésions de l'endothélium sur le versant aortique ouvrant la possibilité d'infiltration par les cellules inflammatoires.

Chez l'homme comme chez le porc, les dépôts lipidiques et les lésions calcifiées se forment préférentiellement dans la « fibrosa » située sous l'endothélium sur la face aortique de la valve [Otto *et al.*, 1994 ; O'Brien *et al.*, 1996 ; Simmons *et al.*, 2005]. En plus du stress mécanique plus important sur ce côté de la valve, l'expression différentielle de gènes entre les versants ventriculaires et aortiques pourrait contribuer à ce phénomène de susceptibilité plus accrue à la calcification.

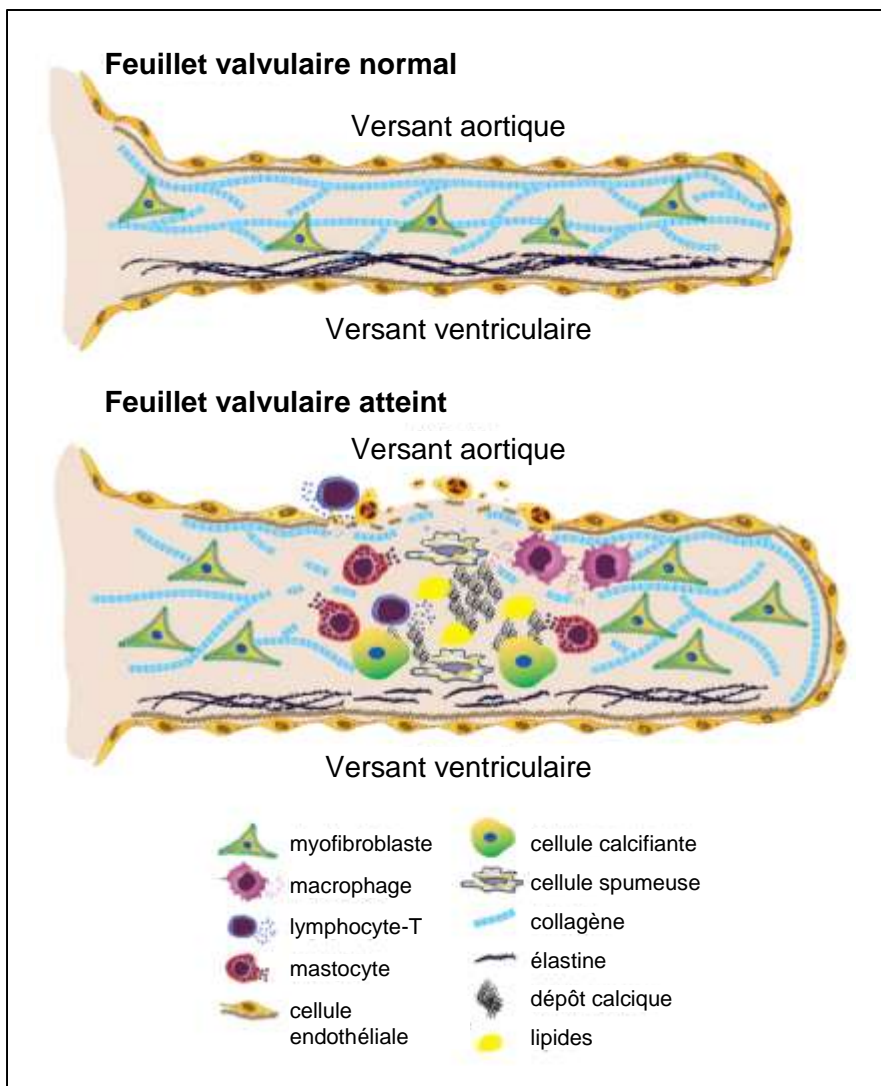


Figure 30 – Représentation schématique de l'épaississement d'un feuillet de valve sténosée en comparaison avec une valve normale

Modifié d'après [Helske et al., 2007a].

En effet l'hétérogénéité du profil transcriptionnel de l'endothélium des deux versants a été démontrée à partir de valves normales porcines [Simmons *et al.*, 2005]. Parmi les 584 gènes différentiellement exprimés, les inhibiteurs de la calcification telle que l'ostéoprotégérine sont moins exprimés dans l'endothélium côté aortique alors que des gènes associés à la formation osseuse comme BMP-4 (*Bone Morphogenic Protein*) sont plus exprimés. Cependant, l'expression de gènes « antioxydants » y est plus élevée et il n'y a pas d'expression différentielle des gènes du système inflammatoire [Simmons *et al.*, 2005]. Ces résultats impliquent que l'endothélium participerait à la régulation de la calcification et protégerait contre l'inflammation et les lésions initiales.

I.3.1- Aspects histologiques

I.3.1.1- Réaction inflammatoire

Au niveau des valves sténosées, on peut observer la présence de cellules inflammatoires de type macrophages, lymphocytes-T, cellules mastocytaires activées (dégranulées) et capable de sécréter histamine, héparine, cytokines proinflammatoires, protéases (chymase, cathepsine G) (Figure 29, Figure 30, [Helske *et al.*, 2004 ; Helske *et al.*, 2006a]). Le complément, activé dans les valves sténosées, est un stimulateur potentiel de la dégranulation des mastocytes [Helske *et al.*, 2007c]. Certains médiateurs sécrétés ont été incriminés dans la pathogenèse de la calcification de ces valves : **TNF- α** (*tumor necrosis factor- α*) [Kaden *et al.*, 2005a ; Kaden *et al.*, 2005c], **TGF- β 1** (*transforming growth factor- β 1*) [Jian *et al.*, 2003], **VEGF** impliqué dans l'angiogenèse (*vascular endothelial growth factor*) [Soini *et al.*, 2003 ; Rajamannan *et al.*, 2005a], **IL-1 β** (*interleukin-1 β*) [Kaden *et al.*, 2003b], et les **MMP** (*Matrix MetalloProteinases*) (Figure 29, Figure 30, [Edep *et al.*, 2000 ; Jian *et al.*, 2001 ; Satta *et al.*, 2003 ; Fondard *et al.*, 2005]).

Le recrutement des cellules inflammatoires serait facilité par des molécules d'adhésion exprimées sur l'endothélium des valves sténosées : **ICAM1** (*Intracellular Cell Adhesion Molecule 1*), **VCAM1** (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*), et **E-sélectine** [Mazzone *et al.*, 2004]. Ces molécules sont retrouvées sous la forme soluble en quantité plus importante dans le sérum des patients [Shahi *et al.*, 1997]. Le taux d'E-sélectine se normalise 18 mois après le remplacement chirurgical valvulaire [Ghaisas *et al.*, 2000].

La néoangiogenèse dont le rôle est suggéré dans l'athérosclérose faciliterait l'entrée des cellules inflammatoires et des infiltrats lipidiques à travers l'endothélium et la formation osseuse [Mohler *et al.*, 2001 ; Soini *et al.*, 2003]. Elle est activée dans les cellules endothéliales des valves sténosées [Chalajour *et al.*, 2004]. La protéine chaperone Hsp60 (*Heat Shock Protein*) est exprimée dans les valves calcifiées, ce qui est cohérent avec les conditions de stress vécues par les cellules [Mazzone *et al.*, 2004]. La chondromoduline-1, facteur antiangiogénique, est sous-exprimée dans les valves atteintes et pourrait avoir un rôle majeur dans le maintien de l'absence de vascularisation des valves normales [Yoshioka *et al.*, 2006].

D'autres signes d'inflammation ont été décrits. La *C-reactive protein* **CRP** est présente dans les valves sténosées [Skowasch *et al.*, 2006] et à des concentrations plasmatiques plus élevées chez les patients [Galante *et al.*, 2001 ; Sanchez *et al.*, 2006]. Des éléments *in vitro*

suggèrent qu'elle pourrait participer à la calcification [Warrier *et al.*, 2005] [revue par Sanchez & Mazzone, 2006].

D'autre part, la bactérie *Chlamydia pneumoniae* déjà impliquée dans l'athérosclérose a été détectée dans les valves saines et atteintes. Son lien avec le RA n'est pas clairement démontré mais une association possible entre une densité plus élevée de *C. pneumoniae* et la calcification des valves sténosées a été rapportée [Juvonen *et al.*, 1997 ; Juvonen *et al.*, 1998 ; Rose, 2002 ; Kaden *et al.*, 2003a ; Pierri *et al.*, 2006].

I.3.1.2- Accumulation de lipides

Dès l'apparition des premières lésions des valves, une accumulation de lipides est observable [Otto *et al.*, 1994], en particulier les **apolipoprotéines B, a, et E** [O'Brien *et al.*, 1996]. Les infiltrats de cellules inflammatoires et dépôts de calcium sont associés à des LDL oxydés (Figure 29, Figure 30, [Olsson *et al.*, 1999]). Ils continuent à s'accumuler avec la progression de l'épaississement jusqu'à la calcification. Le lien entre les lipides et la calcification a été établi à la fois dans les tissus vasculaires et valvulaires [Demer, 2001], et les produits de l'oxydation du cholestérol accélèrent la calcification des valves *in vitro* [Mohler *et al.*, 1999]. La calcification des valves aortiques due à une hypercholestérolémie semble médiée par le Lrp5 sur-exprimé (*LDL receptor-related protein 5*) qui est un acteur important dans l'ostéogenèse et le métabolisme du cholestérol [Rajamannan *et al.*, 2005b ; Caira *et al.*, 2006]. Le Lrp5 fait partie de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine impliquée dans la régulation de la formation des valves cardiaques [Hurlstone *et al.*, 2003]. Cette voie est également mise en cause dans la calcification cardio-vasculaire induite par le facteur de transcription Msx2 [Shao *et al.*, 2005], qui est sur-exprimé dans les souris déficientes en récepteur au LDL [Towler *et al.*, 1998]. L'hypothèse d'un défaut lipidique dans le développement du RAC est confortée par l'étude de modèles animaux (paragraphe I.3.2).

I.3.1.3- Remodelage de la matrice extracellulaire (MEC)

La production de collagène par les fibroblastes en excès provoque une fibrose et la dégradation accrue d'élastine dans les valves sténosées une désorganisation de la MEC. La manifestation directe est l'épaississement des feuillets valvulaires (Figure 30, [Helske *et al.*, 2006a]). La fibrose pourrait impliquer l'**angiotensine-II** qui a des propriétés pro-inflammatoires et pro-fibrotiques [Mehta & Griendling, 2007] étant donné l'augmentation de l'activité de l'*angiotensin-converting enzyme* (ACE) dans les valves sténosées [O'Brien *et al.*, 2002 ; Helske *et al.*, 2004]. Conjointement, on observe une inactivation de molécules anti-fibrotiques [Helske *et al.*, 2007b].

La variation du niveau d'expression et de l'activité enzymatique des **MMP** (*Matrix MetalloProteinases*) a également été incriminée dans le remodelage de la MEC, en particulier les MMP-1, 2, 3, et 9 [Edep *et al.*, 2000 ; Jian *et al.*, 2001 ; Soini *et al.*, 2001 ; Satta *et al.*, 2003 ; Kaden *et al.*, 2004c].

Différents acteurs comme RANKL [Kaden *et al.*, 2005b], l'IL-1 β (*interleukin-1 β*) [Kaden *et al.*, 2003b], le TNF- α [Kaden *et al.*, 2005a] et la ténascine-C [Jian *et al.*, 2001 ; Satta *et al.*, 2002] auraient une action sur l'expression des MMP. Le remodelage de la MEC serait également provoqué par un déséquilibre entre les MMP et leurs inhibiteurs, les **TIMP** (*Tissue Inhibitor of MMP*) [Soini *et al.*, 2001 ; Satta *et al.*, 2003 ; Fondard *et al.*, 2005 ; Kaden *et al.*, 2005a].

En plus de la voie des MMP, l'implication des **cathépsines S, K, et V** a été évoquée dans le remodelage puisqu'elles participent à la dégradation matricielle et peuvent dégrader les fibres d'élastine *in vitro* [Helske *et al.*, 2006b].

I.3.1.4- Processus de calcification et ossification

Le mécanisme de calcification des valves est complexe et lié à un déséquilibre entre facteurs pro- et anti-calcification faisant intervenir de nombreux acteurs [revue par Mohler, 2004]. Certaines cellules présentes au niveau des valves, les myofibroblastes, se différencient en deux catégories de cellules osseuses : les **ostéoblastes** impliqués dans la formation osseuse, et les **ostéoclastes** impliqués dans la résorption osseuse.

Dans les valves atteintes sont exprimées des protéines spécifiques de l'os telles que la **phosphatase alcaline** [Mathieu *et al.*, 2005], l'**ostéopontine** [O'Brien *et al.*, 1995 ; Mohler *et al.*, 1997], l'**ostéocalcine**, l'**ostéonectine** [Srivatsa *et al.*, 1997] et la **sialoprotéine osseuse** [Mohler *et al.*, 2001 ; Rajamannan *et al.*, 2003b ; Kaden *et al.*, 2004b]. Un facteur de transcription spécifique des ostéoblastes, **Cbfa1 (Runx2)** [Ducy *et al.*, 1997], est sur-exprimé dans les modèles de calcification valvulaire de souris et de lapin [Steitz *et al.*, 2001 ; Rajamannan *et al.*, 2002]. Il active les gènes codant pour l'ostéopontine, l'ostéocalcine, et la phosphatase alcaline.

Une surexpression de la **ténascine-C** [Satta *et al.*, 2002], et des **BMP**, inducteurs de la différenciation des ostéoblastes (*Bone Morphogenic Protein*) [Mohler *et al.*, 2001 ; Kaden *et al.*, 2004b] a été observée dans les valves atteintes. Il faut noter qu'un rôle majeur des BMP a été mis en évidence dans la cardiogenèse et la maturation des valves [revue par Delot, 2003]. La **MGP** (*Matrix Gla Protein*) inhibe la précipitation minérale en se complexant au calcium et en inhibant les BMP [Zebboudj *et al.*, 2002]. Son expression est augmentée au niveau des cellules musculaires lisses formant des nodules calcifiés en culture. Cette

augmentation pourrait s'expliquer par une activation de la transcription du gène en réponse à la détection de l'accumulation de calcium [Proudfoot *et al.*, 1998]. Son inhibition provoque des calcifications vasculaires et valvulaires [Price *et al.*, 1998]. La souris déficiente en MGP présente une calcification artérielle progressive [Luo *et al.*, 1997] et des mutations dans le gène codant pour la MGP ont été corrélées au syndrome de Keutel, caractérisé par le développement de calcification de matrice extracellulaire dans divers organes [Munroe *et al.*, 1999]. Les animaux déficients en **fétuine-A** développent également des calcifications ectopiques indiquant son rôle comme inhibiteur de la minéralisation indésirable [Schafer *et al.*, 2003]. Une étude sur un groupe de patients insuffisants rénaux a montré une diminution des taux plasmatiques de fétuine-A alors qu'elle était sur-représentée au niveau artériel [Moe *et al.*, 2005]. Leur rôle dans la sténose aortique n'a pas été évalué.

La formation des nodules calcifiés est accélérée *in vitro* par le cholestérol oxydé, le BMP-2, et les médiateurs de l'inflammation TNF- α et TGF- β 1 (Figure 29) [Mohler *et al.*, 1999 ; Kaden *et al.*, 2005c]. La différenciation des cellules interstitielles est inhibée par l'atorvastatine alors qu'elle est induite par les facteurs favorisant l'ostéogenèse en culture, ce qui renforce l'hypothèse d'un rôle majeur des infiltrats lipidiques dans le mécanisme de calcification [Osman *et al.*, 2006b]. La culture de cellules interstitielles en présence d'ATP extracellulaire augmente significativement le taux de phosphatase alcaline, marqueur des ostéoblastes, indiquant que les nucléotides extracellulaires pourraient être une cible thérapeutique potentielle. Cette activation de la phosphatase alcaline par l'ATP est inhibée par l'atorvastatine [Osman *et al.*, 2006a].

En ce qui concerne l'acquisition du phénotype d'ostéoclaste, la diminution du taux d'**ostéoprotégérine** pourrait contribuer à la calcification valvulaire [Kaden *et al.*, 2004a]. Il s'agit d'un récepteur soluble de la famille des TNF et d'un inhibiteur de la résorption osseuse en empêchant la liaison de **RANKL** (*Receptor Activator of Nuclear factor- κ B Ligand*) sur son récepteur **RANK** qui active la différenciation des ostéoclastes [revue par Horowitz *et al.*, 2001].

La **vitamine D** a une origine endogène (dérivée du cholestérol) ou exogène (alimentation) et contrôle l'homéostasie du calcium tout en permettant son absorption par l'organisme. Elle se fixe sur son récepteur intracellulaire, nucléaire (**VDR**, *Vitamin D Receptor*) qui agit comme facteur de transcription, contrôlant l'expression de différents gènes. Notamment, il active l'expression de l'ostéocalcine et la différenciation des ostéoclastes. Chez le rat, la calcification artérielle liée à la résorption osseuse induite par un traitement à la vitamine D et la warfarine (antagoniste de la vitamine K, inhibition de la MGP) est empêchée par un traitement à l'ostéoprotégérine [Price *et al.*, 2001].

D'autre part, la calcification pourrait être induite par des mécanismes impliquant l'**apoptose** [Lee & Chou, 1998 ; Rajamannan *et al.*, 2001 ; Jian *et al.*, 2003]. L'apoptose des cellules endothéliales serait induite par le LDL oxydé [Sata & Walsh, 1998]. Les cellules apoptotiques expriment des chémokines et des cytokines qui contribuent potentiellement à la réponse inflammatoire [Miwa *et al.*, 1998 ; Schaub *et al.*, 2000]. Une étude récente a montré par immunohistochimie que la mort cellulaire impliquée dans la calcification semblait plutôt liée à l'**autophagie** qu'à l'apoptose [Somers *et al.*, 2006].

I.3.2- Modèles animaux

Etant donné les enjeux pour développer des thérapies préventives et le lien entre RAC et athérosclérose, en particulier les facteurs de risque communs (hypercholestérolémie, âge...), plusieurs modèles *in vivo* de souris et de lapin présentant une atteinte valvulaire par induction d'un défaut lipidique ont été décrits [revue par Guerraty & Mohler, 2007]. Ceux récemment étudiés sont exposés ci-dessous.

La souris déficiente en apoE (*ApoE*^{-/-}) développe avec l'âge une sclérose aortique similaire à celle observée chez les humains. Les valves sclérosées présentent des cellules apoptotiques et expriment des chémokines. Les cellules musculaires lisses observées dans les valves et impliquées dans le remodelage pourraient provenir en partie de la moelle osseuse et être recrutées par la libération des chémokines et cytokines [Tanaka *et al.*, 2005].

Un régime gras et riche en glucides représentant une combinaison de facteurs de risque de l'athérosclérose (obésité, dyslipidémie et hyperglycémie), induit une maladie de la valve aortique chez la souris *LDL*^{r/-}. En effet l'induction expérimentale d'hypercholestérolémie induit un épaississement de la valve aortique et une infiltration de lipides et de macrophages sur un suivi de quatre mois [Drolet *et al.*, 2006].

La souris hypercholestérolémie *LDL*^{r/-} *ApoB*^{100/100} est susceptible de développer avec le vieillissement une calcification et du stress oxydatif au niveau de la valve aortique, mimant le syndrome clinique. Une réduction de la surface valvulaire aortique de plus de 75% a été observée chez 8 souris sur 24 alors que les souris contrôles conservaient une surface normale. En conséquence, chez ces souris présentant un RA, le gradient transvalvulaire, la masse du ventricule gauche sont augmentées, et la fraction d'éjection diminuée de 30% [Weiss *et al.*, 2006].

L'induction de RA chez le lapin par un régime hypercholestérolémiant (cholestérol) est observée lorsque ce régime est combiné à une supplémentation en vitamine D2. Les

différences notées entre les animaux en hypercholestérolémie avec ou sans addition de vitamine D2 suggèrent un rôle important du calcium dans le développement du RA. Cependant les lapins ingérant de la vitamine D2 ont une hypercholestérolémie plus élevée et les effets réels de la vitamine D2 ne sont pas élucidés [Drolet *et al.*, 2003]. D'autres études ont également rapporté des anomalies de la valve aortique dans ce modèle d'athérosclérose de lapin [Rajamannan *et al.*, 2001 ; Cimini *et al.*, 2005].

L'hypercholestérolémie augmente le contenu en cholestérol des valves aortiques et cause une prolifération cellulaire et production de matrice osseuse suite à l'épaississement des valves. Ce processus peut être inhibé par l'atorvastatine [Rajamannan *et al.*, 2002]. L'atorvastatine augmente la concentration en eNOS (*endothelial Nitric Oxidase Synthase*) et en nitrite sérique dans ces valves, empêchant ainsi la minéralisation osseuse [Rajamannan *et al.*, 2005c]. Précédemment il avait été montré que les souris eNOS^{-/-} peuvent présenter une malformation congénitale de la valve aortique, la bicuspidie [Lee *et al.*, 2000].

L'étude de ces modèles expérimentaux conforte le lien supposé entre athérosclérose, vieillissement, et RA. Cependant ces modèles reposent sur l'hypothèse d'un défaut lipidique extrême comme déclencheur de la genèse du RA, en créant en parallèle une maladie athérosclérotique des vaisseaux. Ni la souris ni le lapin ne développent spontanément de lésions valvulaires avec le vieillissement. D'autres espèces présentent spontanément des lésions athérosclérotiques vasculaires et valvulaires mais sont moins abordables en recherche [revue par Guerraty & Mohler, 2007]. La description de modèles animaux de RAC isolé comme il en existe chez des patients qui ne présentent pas d'hypercholestérolémie sera déterminante pour mieux comprendre la physiopathologie de la maladie et tester des traitements pharmacologiques autres que ceux ciblant la voie lipidique (statines). La création de ces modèles, par exemple un modèle de souris invalidée, serait aidée par l'identification de facteurs génétiques à effet majeur. Des facteurs de prédispositions génétiques, qui créent un déséquilibre de la balance pro- et anti-calcification, ont été associés au RAC.

1.3.3- Aspects génétiques

Des formes familiales de RA ont été décrites, mais elles concernent essentiellement des RA sur valves bicuspidées [Gale *et al.*, 1977 ; Emanuel *et al.*, 1978 ; McDonald & Maurer, 1989 ; Glick & Roberts, 1994 ; Clementi *et al.*, 1996]. Quelques cas familiaux de RA sur valves tricuspides ont été rapportés, cependant le RA était alors associé à une calcification de l'aorte [McLoughlin *et al.*, 1974 ; Rose & Forman, 1976 ; Goldbaum *et al.*, 1986 ; Tentolouris *et al.*, 1993]. Ainsi contrairement au prolapsus mitral valvulaire pour lequel une composante familiale est clairement établie avec plusieurs loci décrits [Disse *et al.*, 1999 ;

Freed *et al.*, 2003 ; Nesta *et al.*, 2005], il n'y a pas de démonstration qu'un facteur familial puisse intervenir dans le RAC.

Néanmoins, une composante héréditaire a été suggérée en observant le risque familial pour la mortalité liée aux valvulopathies mitrales et aortiques [Horne *et al.*, 2004]. La forte héritabilité de la bicuspidie, environ 89% [Huntington *et al.*, 1997 ; Cripe *et al.*, 2004], suggère un déterminisme monogénique mais à ce jour seules deux mutations dans le gène **NOTCH1** ont été identifiées [Garg *et al.*, 2005] [revue par Garg, 2006]. Les patients des deux familles où les mutations ségrègent ont des malformations cardiaques congénitales et parfois un RAC apparaissant avec l'âge. Le gène **NOTCH1** code pour un récepteur transmembranaire impliqué dans la différenciation cellulaire, la prolifération, l'apoptose, en particulier pendant la morphogenèse [revue par Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999]. Certains patients dont la valve aortique est tricuspide ont développé une calcification, laissant penser que la calcification n'est pas uniquement due au flux hémodynamique perturbé dans les valves bicuspides. Les auteurs ont montré que les transcrits de *Notch1* sont plus abondants dans le cœur en développement de la souris, et Notch1 inhibe l'activité de Runx2, un facteur de transcription essentiel dans la régulation des ostéoblastes. Ainsi chez les patients, les mutations **NOTCH1** causeraient un défaut dans le développement des valves expliquant la bicuspidie ou les malformations cardiaques, puis un défaut dans le métabolisme calcique par son effet sur Runx2, qui causerait une calcification progressive de ces valves [Garg *et al.*, 2005]. Précédemment, une mutation dans le gène **KCNJ2** causant un syndrome polymalformatif, le syndrome d'Andersen avait été associée entre autres à la bicuspidie aortique [Andelfinger *et al.*, 2002]. Ces deux gènes semblent impliqués dans une faible proportion de cas familiaux de bicuspidie aortique ce qui suggère une hétérogénéité génétique élevée.

Des mutations du gène codant pour la filamine-A, protéine du cytosquelette (**FLNA**) ont été décrites par notre équipe dans une forme de dystrophie valvulaire non syndromique liée à l'X [Kyndt *et al.*, 1998 ; Trochu *et al.*, 2000 ; Kyndt *et al.*, 2007]. Les patients présentent une atteinte plurivalvulaire aortique, mitrale et/ou pulmonaire. La réduction de l'intervalle candidat identifié en 1998 et qui comportait un très grand nombre de gènes a été possible grâce à l'identification de nouvelles branches familiales reliées à un ancêtre commun né au 18e siècle.

Le développement de RA a été associé à des facteurs de prédisposition génétiques, comme le génotype (BB) du gène du récepteur à la vitamine D **VDR** [Ortlepp *et al.*, 2001b]. Les polymorphismes du VDR sont associés à la densité minérale osseuse [Gong *et al.*, 1999]. Un allèle du gène **APOE** (apoE4) codant pour l'apolipoprotéine E, qui est important dans l'athérosclérose et la maladie d'Alzheimer, avait été lié au RAC [Novaro *et al.*, 2003].

Cette hypothèse a été remise en cause par une étude sur un plus grand effectif de patients [Ortlepp *et al.*, 2006]. De plus, des polymorphismes dans l'**interleukine-10**, le **CTGF** (*Connective Tissue Growth Factor*) et le **CR5** (*Chemokine Receptor 5*) semblent influencer le degré de calcification [Ortlepp *et al.*, 2004]. L'association de cinq polymorphismes du système rénine-angiotensine et de l'hypertrophie cardiaque avec le RAC a été exclue par une autre étude [Ortlepp *et al.*, 2001a]. Une étude sur 193 individus (64 RAC, 129 contrôles) âgés d'au moins 70 ans a montré une association entre télomères plus courts et RAC, qui pourrait contribuer à la progression du RAC avec le vieillissement en agissant sur les capacités de régénération [Kurz *et al.*, 2006].

Ces études sont limitées par les petits effectifs de patients et le peu de polymorphismes inclus dans la recherche d'association avec le RAC. D'autres études sont nécessaires pour comprendre l'étiologie de cette pathologie [revue par Bosse *et al.*, 2008]. La complexité du processus physiopathologique dont on commence tout de même à comprendre les mécanismes grâce aux approches histologiques a soulevé un nombre de gènes candidats potentiels considérable.

Génétique du rétrécissement aortique calcifié : objectifs de la thèse

Aucun gène à ce jour n'a été décrit pour la forme de rétrécissement aortique calcifié (RAC) sans malformation congénitale associée. Il est communément nommé « dégénératif » même si, comme nous l'avons vu dans cette introduction il est maintenant clair que le mécanisme pathologique est actif et biologiquement régulé.

Dans le domaine des troubles du rythme, les travaux de l'équipe avaient permis d'identifier un premier gène pour une pathologie du vieillissement précédemment considérée exclusivement non génétique, les troubles de la conduction dégénératifs isolés (maladie de Lenègre, [Schott *et al.*, 1999]) et montré que des pathologies cardio-vasculaires dites « du vieillissement » étaient abordables par les techniques classiques de génétique moléculaire.

Notre hypothèse est qu'il peut exister des gènes à effet majeur, où la progression du RAC serait bien sûr modulée par les facteurs environnementaux, mais où la transmission de la pathologie serait monogénique. L'identification de formes familiales de RAC « dégénératif » sur valve tricuspide par notre équipe nous permet d'expérimenter cette hypothèse. Notamment, l'identification d'une grande famille atteinte de RAC ne présentant pas d'hypercholestérolémie ou d'insuffisance rénale familiale, a permis d'entamer une analyse de liaison pan-génomique avec l'objectif d'identifier le premier gène responsable de RAC « dégénératif » (projet #4).

II- Résultats - Projet #4 : Recherche du premier gène de rétrécissement aortique calcifié

II.1- Enquête clinique et génétique : identification de formes familiales

II.1.1- Article 5 : Objectifs

Le rétrécissement aortique calcifié (RAC, CAVS, *Calcific Aortic Valve Stenosis*) affecte 2 à 4% des individus de plus de 65 ans [revue par Freeman & Otto, 2005] et est la cause majeure de remplacement chirurgical valvulaire. Son évolution est progressive jusqu'à l'apparition de symptômes. Il constitue alors un risque important de mort subite. Jusqu'à présent, de nombreuses études ont consisté en des approches histologiques, mais la génétique du RAC reste peu investiguée. Une composante héréditaire a été suggérée [Horne *et al.*, 2004] mais aucune famille présentant une forme isolée de la maladie n'a été décrite dans la littérature et les bases moléculaires sont à ce jour inconnues.

L'objectif de cette étude était d'identifier des formes familiales de RAC pour cette pathologie longtemps considérée à tort comme dégénérative. L'apparition tardive de la pathologie rend difficile l'identification de grandes familles. Pour y parvenir, une approche d'épidémiologie génétique a été utilisée. Cette approche est basée sur l'hypothèse que comme la population locale est très sédentaire, si un ancêtre était atteint d'une forme génétique de la maladie, il a dû transmettre la mutation à ses descendants. Par conséquent, les communes dans lesquelles des formes familiales de la maladie sont présentes doivent avoir une fréquence anormalement élevée de la maladie (foyers ou « *clusters* »). L'identification de ces familles suggérant une composante génétique majeure permettrait d'entamer des approches d'analyse de liaison pour identifier le premier gène de RAC, alors que jusqu'à présent seuls des polymorphismes de susceptibilité génétique ont été rapportés.

II.1.2- Article 5 : Résultats

Les résultats sont décrits dans l'**Article 5, page 163**. Brièvement, les fichiers hospitaliers des patients opérés d'un remplacement chirurgical au CHU de Nantes ont été anonymisés et les 3 chiffres du numéro de sécurité sociale correspondant au lieu de naissance ont été extraits. La fréquence de la maladie a été calculée pour chaque commune en comparant le nombre de patients opérés nés dans la commune à la population vivant dans la commune. La population de la commune a été estimée par la moyenne des recensements réalisés en 1926, 1931, et 1936. Une carte des fréquences d'opération du RAC par commune de naissance a été construite par Valérie Jousseume (CNRS Cestan,

Nantes). Cette carte montre une hétérogénéité géographique de la distribution du RAC, avec certaines communes présentant une fréquence 8 fois supérieure à la moyenne (**Figure 1, Article 5**). L'analyse de certains de ces foyers traduisant l'agrégation familiale a permis d'identifier cinq familles (**Figure 2, Article 5**). La faible fréquence de la maladie dans les grandes villes peut s'expliquer par le fait de migrations de population plus importantes.

Régine Valéro, infirmière de recherche clinique, a été chargée d'examiner les individus de plus de 60 ans originaires de la commune de la famille A, pour rechercher d'autres cas de RAC. Cette analyse consistait en une auscultation puis, si un souffle était détecté, une échocardiographie-Doppler. Ceci a permis d'identifier au total 48 patients originaires de cette commune. Par une vaste enquête généalogique, ces patients ont tous été reliés à un ancêtre commun né au 17^e siècle (famille A, **Figure 3, Article 5**). Les polymorphismes associés au RAC dans les gènes *APOE* et *VDR* ne sont pas liés au développement du RAC dans la famille A.

Cette étude a permis de montrer que par une approche d'épidémiologie génétique, il était possible d'identifier de grandes familles atteintes de pathologie dégénérative. L'étude génétique de la famille A, constituée de 48 patients atteints de RAC, est décrite dans le paragraphe II.2. La contribution des facteurs environnementaux est supposée faible puisque des patients âgés habitant dans la même commune, certains étant apparentés à la famille A, sont sains. De plus un patient atteint de la famille A vit en dehors de la commune.

Ces familles ne présentent pas d'hypercholestérolémie ou d'insuffisance rénale familiales et représentent donc la première description de formes familiales de RAC « dégénératif » sur valve aortique tricuspide.

Article 5

Familial aggregation of calcific aortic valve stenosis in the western part of France

Vincent Probst^{1,2}, Solena Le Scouarnec², Antoine Legendre¹, Valérie Jousseume³, Philippe Jaafar¹, Jean-Michel Nguyen⁴, André Chaventré⁵, Hervé Le Marec^{1,2}, Jean-Jacques Schott²

Circulation (2006), 113:856-860

¹l'institut du thorax, Service de cardiologie, Nantes, France

²l'institut du thorax, INSERM U533, Nantes, France

³CNRS CESTAN, Nantes, France

⁴PIMESP, CHU Nantes, Nantes, France

⁵Laboratoire d'étude de génétique des populations, Université de Bordeaux 2, Bordeaux, France

Familial Aggregation of Calcific Aortic Valve Stenosis in the Western Part of France

Vincent Probst, MD, PhD; Solena Le Scouarnec, MSc; Antoine Legendre, MD; Valérie Jousseau, PhD; Philippe Jaafar, MD; Jean-Michel Nguyen, MD; André Chaventré, PhD; Hervé Le Marec, MD, PhD; Jean-Jacques Schott, PhD

Background—Calcific aortic valve stenosis (CAVS) is the most common valvular defect in developed countries. Unlike mitral valve prolapse, there is no demonstration that a familial factor could play a role in the occurrence of this disease. The aim of this study was to demonstrate a familial aggregation for CAVS.

Methods and Results—We used the files of 2527 consecutive patients operated on for CAVS in our institution between 1992 and 2002 to map the distribution of operated CAVS in the western part of France. In a second step, we investigated clinically and genealogically the clusters with the highest rates of operated CAVS to detect familial forms of the disease. The geographic distribution of CAVS is highly heterogeneous, with an average frequency of operated CAVS of 1.13 per 1000 inhabitants but up to 9.38 per 1000 in specific parishes. A screening of the population from the parishes with the highest rate of operated CAVS allowed us to identify 5 families with ≥ 3 sibs affected by CAVS. A large genealogical analysis performed in one of these families allowed us to link 48 patients who derived from 34 nuclear families. Genealogical information could be traced to a common ancestor within 13 generations.

Conclusions—Identification of clusters and large families affected by a classic form of CAVS demonstrates a familial aggregation for this disease. (*Circulation*. 2006;113:856-860.)

Key Words: aorta ■ epidemiology ■ genetics ■ stenosis ■ valves

Calcific aortic valve stenosis (CAVS) is the most common valvular defect in developed countries. This condition increases in prevalence with advancing age, afflicting 2% of the population by 65 years of age.¹ It is a progressive disease, well tolerated for several years or decades until the occurrence of symptoms such as cardiac failure, angina pectoris, or syncope that mark a sudden change in its mortality rate.²

Clinical Perspective p 860

Despite the high prevalence of this condition and the increasing morbidity and mortality, very little is known about the cellular basis of CAVS. Several risk factors are associated with calcific aortic valve disease, including hypertension, age, male sex, smoking, diabetes, hyperuremia, hypercholesterolemia, increased body mass index, and hyperparathyroidism.^{1,3-5} Arteriosclerosis has also been evoked to play a critical role in the occurrence of aortic valve stenosis, and preliminary data are in favor of a reduction in the progression of CAVS by statin treatment. However, most patients with arteriosclerosis risk factors have a normal aortic valve.⁶⁻¹⁰

Polymorphisms in vitamin D receptor and apolipoprotein E (apoE) genes have been linked to an increased risk for CAVS,

suggesting a genetic background for the disease.^{11,12} Familial inheritance has been demonstrated for mitral valve prolapse (MVP), the other main valvular disease, and a familial study is recommended when a case of MVP is identified.¹³ Until now, there has been no description of familial forms of CAVS, probably because of the late onset of the disease and the frequently unknown genealogical background and health status of the proband. However, familial factors could play a role in the occurrence of the disease because a recent study has demonstrated a heritable component in death resulting from aortic disease.¹⁴

The aim of our study, as a first step in the identification of a genetic basis for the disease, was to evaluate by an epidemiological approach whether a familial factor could play a role in the occurrence of CAVS.

Methods

Epidemiological and Genealogical Surveys of the Disease

We used our hospital files to identify all the patients operated on for CAVS in our area. These files showed that 2527 patients were operated on for CAVS in our institution between 1992 and 2002. The place of birth for each patient was determined through the use of the

Received June 16, 2005; revision received October 24, 2005; accepted December 2, 2005.

From l'Institut du thorax, Service de Cardiologie, Nantes (V.P., A.L., P.J., H. L. M.); Institut du Thorax, INSERM U533, Nantes (V.P., S.L.S., A.C., H.L.M., J.-J.S.); CNRS CESTAN, Nantes (V.J.); PIMESP, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Nantes (J.-M.N.); and Laboratoire D'étude de Génétique des Populations, Université de Bordeaux, Bordeaux (A.C.), France.

Correspondence to Dr Vincent Probst, Service de Cardiologie du CHU de Nantes, CHU de Nantes, Hôpital Nord, Bd Jacques Monod, 44093 Nantes Cedex, France. E-mail vincent.probst@chu-nantes.fr

© 2006 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at <http://www.circulationaha.org>

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.569467

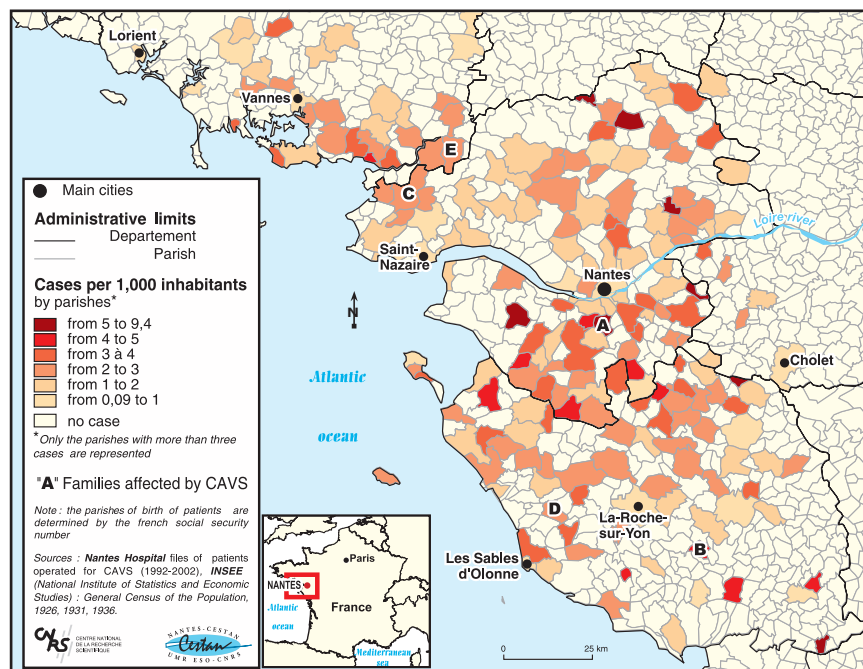


Figure 1. Map of the repartition of operated CAVS in the western part of France. Disease frequency was calculated for each parish by comparing the number of native cases of operated CAVS to the population living in the village. Population was estimated from the mean of the censuses performed in 1926, 1931, and 1936. This map shows an obvious spatial heterogeneity. Two clusters of high frequency can be described, 1 on the northern part of the map and 1 between the southern part of Nantes and La Roche-sur-Yon and between the Atlantic coast and Cholet, corresponding to a well-known isolate called “vendee-cholletaise.” The letters represent parishes in which familial aggregation of the disease has been identified.

French social security number coding system, specifying the place of birth for each individual. We took advantage of this coding system to trace all operated patients. The frequency of the disease was calculated for each parish by comparing the number of native cases of operated CAVS with the population living in the parish. The population was estimated from the mean of the censuses performed in 1926, 1931, and 1936, corresponding to the average period of birth for the patients who underwent an aortic valve replacement. To prevent a bias in small parishes with 1 or 2 cases of CAVS, only the parishes with >2 cases have been considered in the analysis.

The map was constructed with the MapInfo software (MapInfo Corp).

As a first approach, we focused on the parishes with high incidence of CAVS (frequency of operated CAVS, >3 per 1000 inhabitants) and at least 2 operated patients sharing a common family name. Patients sharing the same family name and originating from the same parish were contacted; if the interview revealed a third affected member, an extended familial study was performed.

This method led to the identification of a large family in 1 parish. To extend the size of this family, we looked in our hospital files for patients operated on for CAVS who originated from this parish, and we performed a systematic screening of the population >60 years of age who originated from this parish. For this screening, a nurse examined the inhabitants in the parish using an electronic stethoscope (Littmann model 4000), allowing the heart sounds of the subjects to be recorded. All the recordings were reevaluated by 2 investigators, and an echocardiography was proposed for all patients with an abnormal auscultation. A genealogical study was performed for all the affected subjects identified in this parish to find an ancestor in common with the initial family.

Clinical Evaluation of CAVS

The study was conducted according to the French guidelines for genetic research and was approved by the ethics committee of Nantes University Hospital. Informed written consent was obtained for each patient who agreed to participate in the study. Clinical investigation included a review of medical history, a physical examination, a 12-lead ECG (Mac Vu Marquette Inc), and a transthoracic echocardiography (Hewlett-Packard Sonos 5500) with a 3.5-MHz probe. Data were recorded according to the criteria of the American Society of Echocardiography.¹⁵ Examinations were stored for further analysis. The aortic valve area (AVA) was calculated by means of the

continuity equation.¹⁶ The mean aortic valve gradient was obtained by tracing the continuous-wave flow velocity across the aortic valve.

Patients were considered to be affected by CAVS if they underwent an aortic valve replacement for aortic valve stenosis or if the echocardiography revealed an aortic valve stenosis with an AVA <1.2 cm². For the operated patients, a careful anatomic examination was performed to confirm that the aortic valve was tricuspid and that there was no lesion indicative of rheumatic fever. Patients with AVA >1.2 cm², aortic stenosis without obstruction of the left ventricular outflow, and significant aortic valve regurgitation were considered undetermined. Patients with any abnormalities in favor of a history of rheumatic fever (ie, calcifications of the mitral valve) or bicuspid valves also were considered undetermined.

Blood samples for all participating individuals were collected for serum and genetic analyses.

Statistical Analysis

The heterogeneity of the prevalence of operated CAVS in the parishes was tested with a χ^2 test. Clinical data are expressed as mean \pm SD. The levels of cholesterol and creatinine were compared by use of the Student *t* test. A value of $P < 0.05$ was considered significant. The distribution of the alleles for vitamin D receptor and apoE genes between affected and nonaffected family members was compared by use of a χ^2 test.

Results

Starting from hospital records of patients operated for CAVS, we were able to trace the city of birth for each individual using the French social security number.

The map of the frequency of CAVS in the native population shows a clear spatial clustering (Figure 1). The average frequency of operated CAVS in the western part of France between 1992 and 2002 is 1.13 per 1000 inhabitants. In the parishes with the highest rate of operated CAVS, this level is up to 9.38 per 1000 inhabitants. On the contrary, in the main city, the frequency is 0.93 operated CAVS patients per 1000 inhabitants. A χ^2 test showed a significant ($P < 0.001$) difference between the observed and expected number of CAVS between the geographic

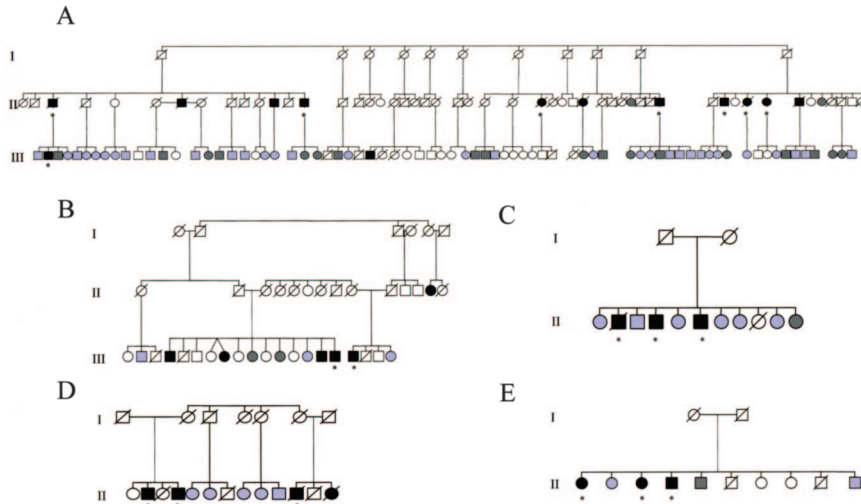


Figure 2. Partial pedigrees of the families. Circles denote female family members; squares, male family members. Patients represented in black are affected by severe CAVS; gray symbols depict patients affected by nonsevere CAVS; and blue symbols identify patients with an undetermined phenotypic status because they did not reach the critical age of 65 years or have not been examined. Open symbols represent unaffected patients >65 years of age. Stars indicate patients operated on for CAVS.

clusters. The results showed a nonrandom distribution of CAVS, reflecting clusters of patients with the same disease.

In a first step, to test whether this geographic clustering of CAVS reflected a potential familial aggregation, we looked to find common family names in the parishes with highest incidences of CAVS. In the parishes with at least 2 patients with the same name, we performed a familial study to detect other family members affected by CAVS who were not yet identified. This approach led to the identification of 5 different families (Figures 1 and 2).

Family A was a large family made up of 135 members, 83 of whom were still alive (Figure 2A). Thirteen patients were clearly affected by severe CAVS (mean age, 81 ± 7 years). Of them, 9 were still alive at the time of the study. Eight underwent an aortic valve replacement for symptomatic CAVS associated in 2 cases with a coronary artery bypass surgery (patients II-3, II-14, II-28, II-39, II-41, II-43, II-44, and III-2). The mean age for aortic valve replacement was 73 ± 8 years. Five other patients were diagnosed with a severe CAVS with an average AVA of 0.8 ± 0.2 cm² (patients II-7, II-12, II-32, II-45, and III-30). Three patients >80 years of age were clearly unaffected (individuals II-5, II-42, and II-46). Clinical status for patients from generation I could not be ascertained. Twenty other family members were diagnosed with aortic valve abnormalities not severe enough to allow them to be classified as affected. These family members were younger than patients with severe CAVS (58 ± 10 versus 81 ± 7 years; $P < 0.001$). Most of them originated from affected patients, suggesting that these abnormalities should be the first manifestation of CAVS. The aortic valve abnormalities were aortic valve insufficiency (3 patients), aortic valve sclerosis with moderate aortic valve stenosis (15 patients), and aortic valve insufficiency associated with moderate aortic valve stenosis (2 patients).

Family B was composed of 40 members (Figure 2B). Among them, 6 were affected by severe CAVS (patients II-13, III-4, III-8, III-15, III-16, and III-17). Patients III-16 and III-17 underwent an aortic valve replacement. The average AVA in the other affected patients was 0.7 ± 0.1 cm². Patient III-13 had a grade 1 mitral insufficiency. Patients III-10 and III-12 were classified as undetermined because of nonsevere CAVS (AVA,

1.5 cm² and 1.4 cm², respectively). Nine other family members were unaffected.

Family C was made up of 13 members (Figure 2C). Of them, 3 were affected by CAVS (patients II-2, II-4, and II-6), 2 still alive at the time of the study. All 3 underwent surgery for severe symptomatic CAVS at 71 ± 4 years of age. Patient II-11 was classified as undetermined because we found a nonsevere CAVS. The 6 other alive family members were unaffected.

Family D had 20 members (Figure 2D). Of the 20, 4 were affected by CAVS (patients II-2, II-4, II-11, and II-13), 2 still alive at the time of the study. Three of them have been operated on for severe symptomatic CAVS at 72 ± 1 years of age (patients II-2, II-4, and II-11). A fourth patient refused surgery and died of severe symptomatic CAVS at 72 years of age. The other 6 family members were unaffected.

Family E was composed of 12 members (Figure 2E). Among them, 3 were affected by CAVS (patients II-1, II-3, and II-4). All of them have been operated on for severe symptomatic CAVS at 68 ± 4 years of age. Patient II-5 was classified as undetermined because of nonsevere CAVS. The 4 other sibs were unaffected.

In all these families, blood exams revealed no familial history of renal insufficiency or hypercholesterolemia.

To increase the size of family A, we looked in our hospital files to detect patients who originated from the parish of family A and were operated on for CAVS. We identified 15 additional patients operated on for CAVS who originated from the same parish. We also performed a systematic screening of the population >60 years of age who originated from the parish of family A. During this screening, we examined 199 individuals. This screening allowed us to detect 53 patients with an abnormal auscultation. An echocardiography was proposed for all of these patients and accepted by 45. The echocardiography showed that 20 patients were affected by severe CAVS. A nonsevere CAVS was also identified in 11 other patients.

We hypothesized that all affected patients could be related. We then performed a genealogical analysis for these patients for >400 years and found a unique common ancestor born in 1650, 13 generations before (Figure 3).

To ensure that CAVS is not due to familial hypercholesterolemia or renal insufficiency in this pedigree, we compared the cholesterol and creatinine levels of affected family members

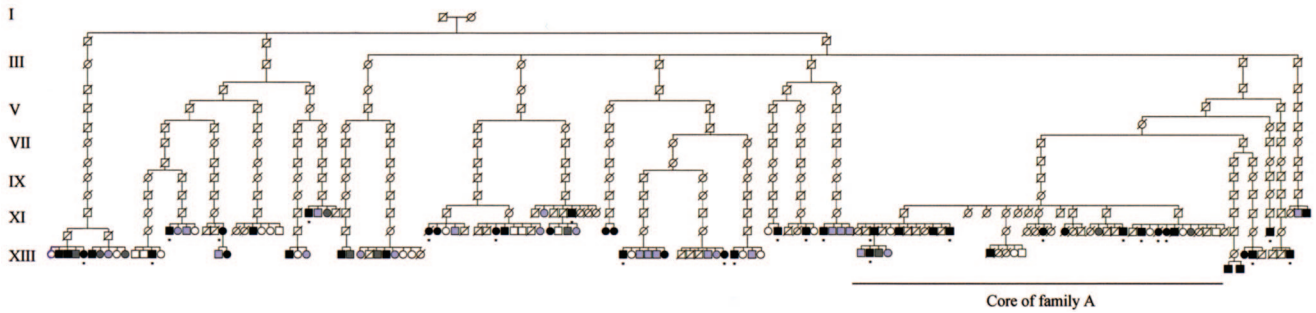


Figure 3. Pedigree of the family A showing 48 patients with severe CAVS. Patients with CAVS (solid symbols), previously thought to be largely unrelated, could be traced to a common ancestor within 13 generations. Circles denote female family members; squares, male family members. Stars indicate patients operated on for CAVS (25 patients). Patients in black are affected by severe CAVS; patients in white are unaffected and >65 years of age; patients in blue have an undetermined phenotypic status because they did not reach the critical age of 65 years or have not been examined; patients in gray are affected by a nonsevere CAVS.

with 20 nonaffected family members belonging to the same sibs who were >65 years of age. The mean cholesterol levels were 5.7 ± 1.2 mmol/L in the affected patients and 5.43 ± 1.3 mmol/L in nonaffected family members ($P=NS$). Fifteen patients were treated with cholesterol-lowering drugs in the affected group, whereas 9 patients were treated in the nonaffected group ($P=NS$). The creatinine level was significantly higher in the affected group (97.4 ± 26 versus 77.8 ± 18 mmol/L; $P=0.006$). Among the 25 patients who underwent an aortic valve replacement in the affected group, 5 also underwent a coronary artery bypass surgery.

Testing vitamin D receptor and apoE genes did not reveal an association between vitamin D receptor B allele or apoE 4 allele in CAVS patients.^{11,12}

In this cluster, systematic screening of the first-degree relatives of patients affected by CAVS allowed us to identify 11 severe CAVS patients of 33. The first-degree familial recurrence of the disease in this cluster could then be estimated to be 33%.

The analysis of this pedigree provides us with several lines of evidence for a major genetic trait causing CAVS. X-linked transmission of the disease could be excluded with the identification of 1 demonstrated father-to-son transmission (patient II-3 to III-2 in Figure 2A) and 18 potential father-to-son transmissions even if the clinical status of the deceased father was not determined. Recessive transmission should also be excluded because 3 clinical records of both parents revealed monoparental affection. In patients of family A >50 years of age (Figure 2A), echocardiographies performed on offspring of affected members identified 10 of the 25 individuals with aortic valve stenosis or sclerosis. Finally, despite the late onset of the disease, it appears that the disease segregates in a 50:50 ratio, strongly suggesting an autosomal dominant mode of inheritance.

Discussion

In this study, we evaluated the contribution of familial factors to CAVS by performing an epidemiological and a genealogical investigation to identify families affected by CAVS.

Probably because of the late onset of the disease, there is no description of large pedigrees for this disease, and familial factors are not considered to play a role in the occurrence of the disease. Genealogical approaches in isolated populations have shown their efficiency in identifying genetic contributions for common diseases.¹⁷⁻¹⁹ We hypothesized that be-

cause the population in our area has a low geographic mobility, if a hereditary factor is present for CAVS, the frequency of this disease must be higher in certain areas corresponding to geographic isolates in which an ancestor has transmitted the disease to his offspring. To demonstrate the familial aggregation of CAVS, we took advantage of 2 major characteristics of our area in the western part of France. First, our cardiology center is the only referring hospital for cardiac surgery for >2 millions inhabitants, leading to a comprehensive view of operated CAVS in the area. Second, a part of this population originates from a geographic isolate in which the population is very sedentary. For example, in the parish of the family A, 97% of the population born in this parish before 1945 are still living in the parish today.

In the clusters with the highest rates of CAVS, we have identified 5 cases of familial aggregation of the disease. A large genealogical study performed in the cluster of the largest family allowed us to determine that all the patients detected to be affected by a severe CAVS in this area are related to the same common ancestor, suggesting that a major genetic trait is involved in the disease. In this cluster, all the affected patients are >65 years of age, and anatomic examination or echocardiography confirmed that the aortic valve was tricuspid. The disease affecting this cluster should then be considered a classic form of CAVS.

The ascertainment of the mode of inheritance cannot be evaluated easily because only patients in generation XIII fulfill the clinical criteria for CAVS diagnosis (Figure 3). However, in this cluster, we also identified 20 family members affected by minor abnormalities of the aortic valve. These family members were younger than patients with severe CAVS (58 ± 10 versus 81 ± 7 years; $P<0.001$). Most of them were the offspring of affected patients, suggesting that these abnormalities should be the first manifestation of CAVS. A periodic evaluation of the evolution of the AVA in these patients should confirm this hypothesis. Once these undetermined patients reach the critical age, our dominant-transmission hypothesis will be formally clarified.

The 2 largest families (families A and B) that we identified originated from a historic geographic isolate where the frequency of the disease is high. The complete isolation of this area for centuries should facilitate the anchoring of a potential genetic disease and then make possible the identi-

fication of a familial factor for the disease. An opposing view is that common environmental factors in an isolated population also could contribute to the disease. These factors cannot be formally excluded. However, the identification of related and unrelated strictly unaffected individuals >70 years of age sharing the same environment and the detection of 1 affected patient (patient XIII-45; Figure 2A) living outside the parish but belonging to family A are in favor of a low environmental contribution to the disease.

Conclusions

This study demonstrates for the first time a familial aggregation of CAVS. The factors responsible for this familial aggregation and its frequency in the general population are still to be determined. This study is the first step toward the identification of a genetic defect in this disease.

Acknowledgments

This study was supported by a grant from PHRC BRD 02/4-Q, Fondation de France, Fédération Française de Cardiologie, and GIS Longévité et Vieillesse. We thank Régine Valéro, Monique Dupas, and Théodora Allard for assistance and the families for participation.

The authors had full access to the data and take full responsibility for its integrity. All authors have read and agree to the manuscript as written.

Disclosures

None.

References

- Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, Smith VE, Kitzman DW, Otto CM. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease: Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol*. 1997;29:630–634.
- Horstkotte D, Loogen F. The natural history of aortic valve stenosis. *Eur Heart J*. 1988;9(suppl E):57–64.
- Wilmschurst PT, Stevenson RN, Griffiths H, Lord JR. A case-control investigation of the relation between hyperlipidaemia and calcific aortic valve stenosis. *Heart*. 1997;78:475–479.
- Deutscher S, Rockette HE, Krishnaswami V. Diabetes and hypercholesterolemia among patients with calcific aortic stenosis. *J Chronic Dis*. 1984;37:407–415.
- Maher ER, Pazianas M, Curtis JR. Calcific aortic stenosis: a complication of chronic uraemia. *Nephron*. 1987;47:119–122.
- Novaro GM, Tiong IY, Pearce GL, Lauer MS, Sprecher DL, Griffin BP. Effect of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on the progression of calcific aortic stenosis. *Circulation*. 2001;104:2205–2209.
- Branch KR, O'Brien KD, Otto CM. Aortic valve sclerosis as a marker of active atherosclerosis. *Curr Cardiol Rep*. 2002;4:111–117.
- Peltier M, Trojette F, Sarano ME, Grigioni F, Slama MA, Tribouilloy CM. Relation between cardiovascular risk factors and nonrheumatic severe calcific aortic stenosis among patients with a three-cuspid aortic valve. *Am J Cardiol*. 2003;91:97–99.
- Davies MJ, Treasure T, Parker DJ. Demographic characteristics of patients undergoing aortic valve replacement for stenosis: relation to valve morphology. *Heart*. 1996;75:174–178.
- Otto CM, O'Brien KD. Why is there discordance between calcific aortic stenosis and coronary artery disease? *Heart*. 2001;85:601–602.
- Ortlepp JR, Hoffmann R, Ohme F, Lauscher J, Bleckmann F, Hanrath P. The vitamin D receptor genotype predisposes to the development of calcific aortic valve stenosis. *Heart*. 2001;85:635–638.
- Novaro GM, Sachar R, Pearce GL, Sprecher DL, Griffin BP. Association between apolipoprotein E alleles and calcific valvular heart disease. *Circulation*. 2003;108:1804–1808.
- Cheitlin MD, Armstrong WF, Aurigemma GP, Beller GA, Bierman FZ, Davis JL, Douglas PS, Faxon DP, Gillam LD, Kimball TR, Kussmaul WG, Pearlman AS, Philbrick JT, Rakowski H, Thys DM, Antman EM, Smith SC Jr, Alpert JS, Gregoratos G, Anderson JL, Hiratzka LF, Hunt SA, Fuster V, Jacobs AK, Gibbons RJ, Russell RO. ACC/AHA/ASE 2003 guideline update for the clinical application of echocardiography: summary article: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/ASE Committee to Update the 1997 Guidelines for the Clinical Application of Echocardiography). *J Am Soc Echocardiogr*. 2003;16:1091–1110.
- Horne BD, Camp NJ, Muhlestein JB, Cannon-Albright LA. Evidence for a heritable component in death resulting from aortic and mitral valve diseases. *Circulation*. 2004;110:3143–3148.
- Schiller NB, Shah PM, Crawford M, DeMaria A, Devereux R, Feigenbaum H, Gutgesell H, Reichek N, Sahn D, Schnittger I, et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography: American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J Am Soc Echocardiogr*. 1989;2:358–367.
- Skjaerpe T, Hegrenaes L, Hatle L. Noninvasive estimation of valve area in patients with aortic stenosis by Doppler ultrasound and two-dimensional echocardiography. *Circulation*. 1985;72:810–818.
- Rosenberg MJ, Agarwala R, Bouffard G, Davis J, Fiermonte G, Hilliard MS, Koch T, Kalikin LM, Makalowska I, Morton DH, Petty EM, Weber JL, Palmieri F, Kelley RI, Schaffer AA, Biesecker LG. Mutant deoxynucleotide carrier is associated with congenital microcephaly. *Nat Genet*. 2002;32:175–179.
- Sveinbjörnsdóttir S, Hicks AA, Jonsson T, Petursson H, Gugmundsson G, Frigge ML, Kong A, Gulcher JR, Stefansson K. Familial aggregation of Parkinson's disease in Iceland. *N Engl J Med*. 2000;343:1765–1770.
- Aulchenko YS, Vaessen N, Heutink P, Pullen J, Snijders PJ, Hofman A, Sandkuij LA, Houwing-Duistermaat JJ, Edwards M, Bennett S, Oostra BA, Van Duijn CM. A genome-wide search for genes involved in type 2 diabetes in a recently genetically isolated population from the Netherlands. *Diabetes*. 2003;52:3001–3004.

CLINICAL PERSPECTIVE

Calcific aortic valve stenosis (CAVS) is the most common valvular defect in developed countries. Despite its high prevalence and the increasing morbidity and mortality, very little is known about the pathophysiology of CAVS. Several risk factors have been associated with CAVS; however, most of the patients with risk factors have a structurally normal aortic valve. Familial inheritance has been demonstrated for mitral valve prolapse and for bicuspid valve disease but not for CAVS. The present study describes for the first time a familial aggregation of CAVS indicating genetic inheritance for this disease. Although the causative genes and the frequency in the general population are still to be determined, this study constitutes the first step toward the identification of a genetic defect and the understanding of the pathophysiology in this disease. Today, the only cure for this degenerative condition is replacement of the calcified valve when the patients become symptomatic. Ideally, less invasive and preventive therapeutic approaches will become available once the pathophysiology is better elucidated and “at-risk” patients are identified. Familial screening for CAVS is still not warranted as for mitral valve prolapse, but the practicing clinician should be aware of a possible hereditary component in CAVS.

II.2- Analyse de liaison pan-génomique

Dans la famille A (**Figure 3, Article 5, page 163**), la transmission du rétrécissement aortique calcifié semble dominante puisque les cas d'affection mono-parentale excluent une transmission récessive. Il y a au moins un cas de transmission père/fils, tous deux opérés, et même si les informations cliniques ne sont pas disponibles, il semble y avoir plusieurs autres cas de transmission père/fils, ce qui exclut une liaison au chromosome X. Le gène *FLNA* codant pour la filamine-A, localisé sur le chromosome X, a tout de même été exclu par génotypage étant donné son implication dans les dystrophies plurivalvulaires [Kyndt *et al.*, 2007]. Les patients présentant une bicuspidie ou pseudo-bicuspidie de la valve aortique ont été exclus de l'étude. En revanche, compte tenu de la fréquence du RAC chez les individus de plus de 65 ans (2 à 4%), l'intégration de phénocopies est probable puisque ces patients ne peuvent pas être détectés sur le plan clinique.

Une sous-famille de la famille A (« *Core of family A* »), qu'on nommera famille A' dans cette partie par souci de clarté, est constituée de 13 patients présentant un RAC qui est apparu avec le vieillissement et a nécessité un remplacement chirurgical dans 9 cas. Parmi ces 13 patients, un prélèvement d'ADN a pu être collecté pour 9 patients, les autres étant décédés (Figure 31, Tableau 14).

Une analyse de liaison pan-génomique avec des marqueurs microsatellites autosomiques (ABI PRISM™ Linkage Mapping Set Version 2.5, Applied Biosystems, version 10 cM, protocole en annexe F-II.1.2.3, page 196) a été réalisée sur 31 individus de la famille A' (Tableau 14). Parmi ces 31 individus, 9 sont atteints (dont 6 opérés), 11 sont sains, et pour 11 le statut n'est pas déterminé car ils présentent une forme mineure de RAC ou ont une valve aortique légèrement remaniée (6 probablement atteints, 5 probablement sains).

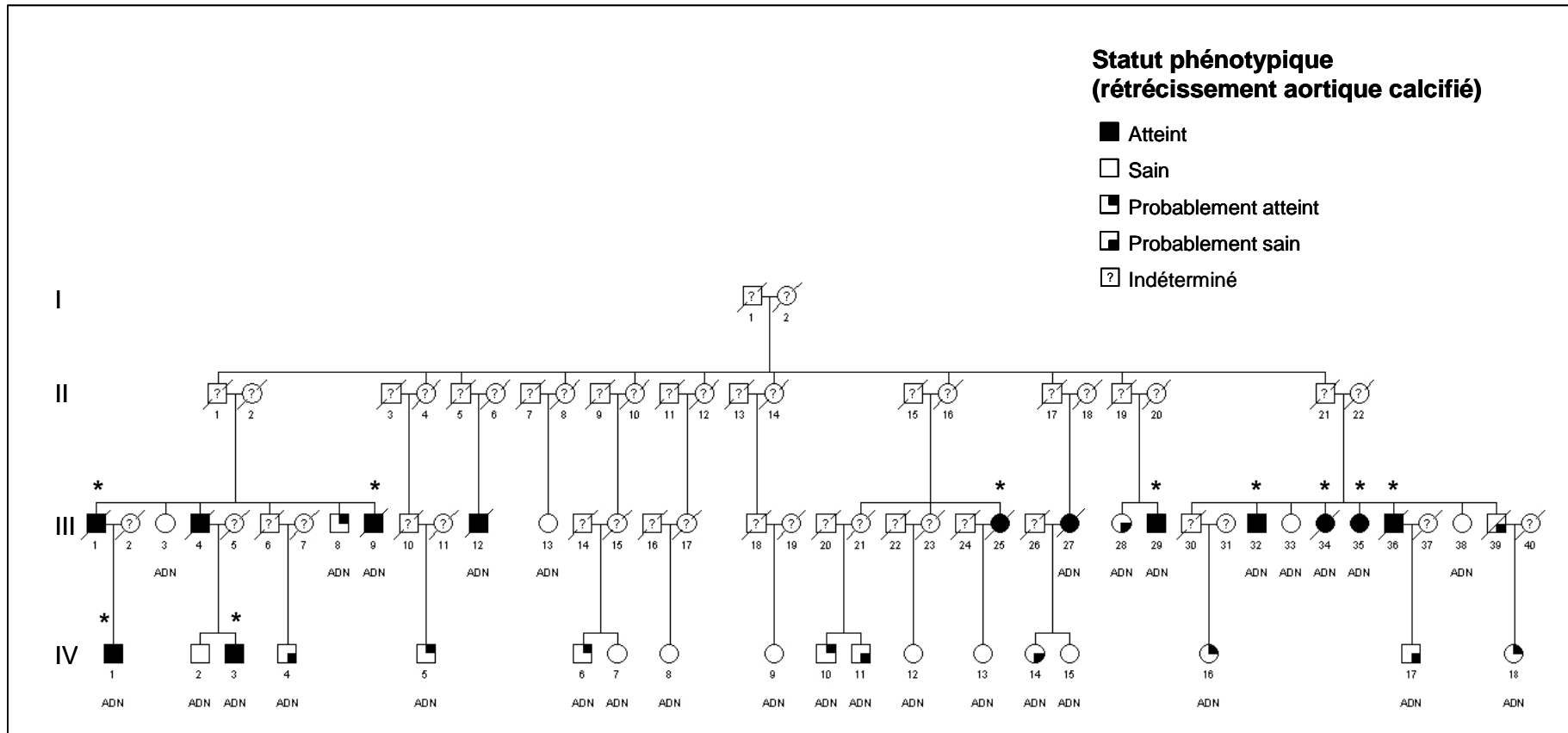


Figure 31 – Arbre généalogique de la famille A'

*Les étoiles indiquent les patients opérés et « ADN » indiquent les individus pour lesquels un prélèvement est disponible.
Les caractéristiques cliniques des individus génotypés sont indiquées dans le Tableau 14.*

Tableau 14 – Caractéristiques des individus de la famille A' inclus dans l'analyse de liaison

Individu	Statut	Age actuel	Age examen	Age opération	Surface aortique (cm ²)	Gradient transaortique moyen (mmHg)	Aspect valve aortique	Aspect valve mitrale
III-3	S	99	92	-	2,22	2	fine	fine
III-8	PA	92	85	-	1,5	15	calcifiée	fine
III-9*	A	† 84	73	73	1	50	calcifiée	fine
III-12	A	† 80	78	-	0,9	21	ND	ND
III-13	S	95	89	-	> 2	< 3,5	fine	fine
III-27	A	† 90	85	-	0,36	43	calcifiée	calcifiée
III-28	PS	86	79	-	1,95	5	fine	fine
III-29*	A	94	80	80	0,6	78	calcifiée	fine
III-32*	A	78	71	71	0,72	61	calcifiée	fine
III-33	S	84	77	-	1,88	< 3,5	remaniée	fine
III-34*	A	† 84	77	77	0,9	55	calcifiée	fine
III-35*	A	96	77	77	0,56	64	calcifiée	fine
III-38	S	81	74	-	1,93	< 3,5	fine	remaniée
IV-1*	A	72	65	65	0,88	60	calcifiée	fine
IV-2	S	69	62	-	> 2	3	fine	fine
IV-3*	A	62	60	62	0,9	46	calcifiée	fine
IV-4	PS	70	63	-	2,49	4	fine	fine
IV-5	PA	74	66	-	1,8	6	calcifiée	fine
IV-6	PA (RAA ?)	88	78	-	1,1	39	calcifiée	calcifiée
IV-7	S	82	75	-	1,88	3	fine	fine
IV-8	S	80	73	-	3,43	4	fine	fine
IV-9	S	68	61	-	2,78	2	fine	fine
IV-10	PA	69	62	-	1,8	10	calcifiée	fine
IV-11	PS	65	57	-	> 2	< 3,5	fine	remaniée
IV-12	S	73	66	-	2,23	3	fine	fine
IV-13	S	70	63	-	2,5	2	fine	fine
IV-14	PS	69	65	-	2,8	< 3,5	remaniée	fine
IV-15	S	65	57	-	1,79	4	fine	fine
IV-16	PA	50	47	-	1,8	7	très remaniée	remaniée
IV-17	PS	69	62	-	2,02	5	remaniée	fine
IV-18	PA	59	52	-	2,65	3	un peu remaniée	fine

Les étoiles indiquent les patients opérés d'un remplacement de valve aortique. A : Atteint, S : Sain, PA : Probablement atteint, PS : Probablement sain, RAA : Rhumatisme articulaire aigu, ND : Non déterminé.

Les premières analyses des résultats au laboratoire ne montraient pas de liaison significative avec la maladie. Une cinquantaine de marqueurs étaient potentiellement liés ou non informatifs et ont été génotypés sur 23 patients atteints de RAC et 9 individus sains de la famille A. Le génotypage de marqueurs adjacents si nécessaire (protocole en annexe F-II.1.2.3, page 196) a exclu une liaison significative (résultats non montrés). C'est pourquoi nous avons débuté une collaboration avec Catherine Bonaïti et Emmanuelle Génin (Inserm U535, Villejuif) pour analyser les génotypes avec différents modèles génétiques.

Pour les analyses deux-point et multi-point, nous avons considéré que la fréquence de l'allèle morbide « D » était de 0,001. L'allèle non muté est noté « d ». La pénétrance « Pen », probabilité d'être atteint pour les porteurs de l'allèle morbide D, n'est pas connue et 3 modèles de pénétrances dominants ont donc été testés :

- **Modèle A** : Pen(DD)=Pen(Dd)=0,99 ; Pen(dd)=0
- **Modèle B** : Pen(DD)=Pen(Dd)=1,0 ; Pen(dd)=0,1
- **Modèle C** : Pen(DD)=Pen(Dd)=0,90 ; Pen(dd)=0,1

Les fréquences alléliques utilisées sont celles fournies par le CEPH (Centre d'Etude du Polymorphisme Humain) [<http://www.cephb.fr/cephdb/php/fr/>]. Pour les marqueurs non référencés dans la base de données du CEPH, les allèles ont été définis comme équifréquents avec une fréquence de $1/n$, n étant le nombre total d'allèles. Pour les allèles pour lesquels aucune fréquence n'était fournie ou qui avaient une fréquence de 0, ces fréquences ont été fixées à 0,01.

II.2.1- LOD scores deux-point

Pour les analyses deux-point, le programme FASTLINK a été appliqué sur la généalogie entière. Différentes analyses ont été réalisées en incluant ou non les individus probablement sains, probablement atteints et sains. Pour chaque analyse, nous avons considéré le *LOD score* maximum (Z_{\max}) obtenu sur les 3 modèles.

- **Configuration ①** (probablement sains → sains ; probablement atteints → atteints) :

Un marqueur présente un Z_{\max} supérieur à 3, il s'agit du marqueur **D18S68**. Le *LOD score* est de 3,02 à $\theta=0$ sous le modèle C.

Les résultats obtenus pour ce marqueur et les deux marqueurs adjacents sont présentés dans le Tableau 15. Sous un modèle de pénétrance à 80% avec un taux de phénotopies de 5%, le *LOD score* du marqueur D18S68 atteint 3,4 à $\theta=0$. Aucun autre marqueur n'atteint un

LOD score supérieur à 3 mais on obtient des *LOD scores* supérieurs à 1,5 pour 3 autres marqueurs : **D5S2073** ($Z_{\max}=1,55$; $\theta=0,2$; modèle A), **D7S502** ($Z_{\max}=1,51$; $\theta=0,1$; modèle B) et **D10S212** ($Z_{\max}=2,19$; $\theta=0$; modèle C).

• **Configuration ②** (probablement sains → indéterminés ; probablement atteints → atteints) :

Un Z_{\max} de 3,36 est obtenu pour le même marqueur **D18S68** à $\theta=0,10$ sous le modèle A. Des *LOD scores* supérieurs à 1,5 sont obtenus pour les marqueurs **D5S647** ($Z_{\max}=1,87$; $\theta=0,1$; modèle A) et **D7S630** ($Z_{\max}=1,77$; $\theta=0,05$; modèle A).

• **Configuration ③** (probablement sains et probablement atteints → indéterminés) :

Le Z_{\max} du marqueur **D18S68** est 2,28 à $\theta=0,05$ sous le modèle A. Seul un autre marqueur atteint un *LOD score* supérieur à 1,5 : **D5S424** ($Z_{\max}=1,57$; $\theta=0$; modèle A).

• **Configuration ④** (probablement sains, probablement atteints, et sains → indéterminés) :

Le Z_{\max} du marqueur **D18S68** est de 1,61 à $\theta=0$ sous le modèle B. Le *LOD score* maximum est obtenu pour un autre marqueur : **D5S2073** ($Z_{\max}=1,91$; $\theta=0$; modèle B). Un *LOD score* de 1,74 est obtenu pour le marqueur **D10S212** ($\theta=0$, modèle A).

Tableau 15 – Analyse de liaison sur la famille A' : *LOD scores* deux-point

	θ	0	0,01	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
D18S1147	Mod A	-8,90	-6,57	-3,36	-1,66	-0,25	0,14	0,09
	Mod B	-2,41	-2,32	-1,66	-1,04	-0,37	-0,10	-0,05
	Mod C	-2,00	-1,68	-1,00	-0,56	-0,13	0,00	-0,01
	Z_{\max}	-2,00	-1,68	-1,00	-0,56	-0,13	0,14	0,09
D18S68	Mod A	-0,76	0,64	2,20	2,69	2,54	1,80	0,80
	Mod B	2,24	2,32	2,41	2,30	1,83	1,18	0,47
	Mod C	3,02	2,98	2,80	2,53	1,89	1,18	0,45
	Z_{\max}	3,02	2,98	2,80	2,69	2,54	1,80	0,80
D18S55	Mod A	-6,20	-2,95	-0,38	0,56	1,02	0,82	0,36
	Mod B	1,00	1,03	1,07	1,04	0,85	0,55	0,19
	Mod C	1,24	1,24	1,23	1,15	0,89	0,55	0,19
	Z_{\max}	1,24	1,24	1,23	1,15	1,02	0,82	0,36

LOD scores obtenus pour le marqueur **D18S68** et deux marqueurs adjacents pour la configuration ①.
Mod : Modèle, Z_{\max} : *LOD score* maximum, θ : Fraction de recombinaison.

II.2.2- *LOD* scores multi-point

Pour l'analyse multi-point le programme ALLEGRO 1.2 a été utilisé sur les individus atteints uniquement, car l'algorithme ne gère pas un pedigree aussi grand que celui de la famille A'. Pour chacun des 3 modèles de pénétrance considérés, nous avons calculé les *LOD* scores multi-point maximum obtenus sur chacun des chromosomes. Les résultats sont présentés dans le Tableau 16.

L'analyse multi-point des marqueurs du chromosome 18 exclut la liaison en 18q21-22 (Tableau 16). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que le marqueur D18S1147 qui est situé à 5 cM du marqueur D18S68 exclut la liaison (Tableau 15).

En revanche, l'analyse multi-point indique une liaison possible avec le locus 5q35. Le *LOD* score maximum du marqueur **D5S2073** qui était de 2,17 sous le modèle A atteint la valeur de 2,45 sous le modèle B (Tableau 16). L'analyse des génotypes de ce marqueur et de deux marqueurs adjacents (D5S498 et D5S408) montre que les malades sont généralement porteurs de l'haplotype « 2-6-6 » à l'exception de la patiente III-35 (résultat non montré). Si on fait l'hypothèse qu'il s'agit d'une phénocopie (statut indéterminé), le *LOD* score multi-point est de 3,73 sous le modèle A.

En conclusion, les résultats de l'analyse deux-point qui pointaient sur la région du marqueur D18S68 (intervalle de 6,5 cM ou 3,1 Mb entre D18S1147 et D18S969) ne sont pas confirmés par l'analyse multi-point et sont peut-être dus à une mauvaise spécification des fréquences alléliques. En effet, l'analyse deux-point est très sensible à la spécification des fréquences alléliques quand de nombreux individus ne sont pas génotypés comme c'est le cas ici.

Les résultats de l'analyse multi-point suggèrent une liaison possible avec l'extrémité du chromosome 5 en 5q35 (région autour du marqueur D5S2073). Les individus atteints sont généralement porteurs d'un haplotype commun aux marqueurs D5S498-D5S2073-D5S408 (11 cM ou 6 Mb), sauf la patiente III-35 qui a toutefois été opérée de la forme de RAC classique dans la famille (Tableau 14). Plusieurs individus sains sont également porteurs de cet haplotype ce qui suggérerait une pénétrance incomplète (III-33, III-38, IV-2, IV-7). Le génotypage de 23 autres patients atteints de RAC (famille A) n'est pas en faveur de ce locus puisque la majorité des patients ne possèdent pas l'haplotype « 2-6-6 ».

Tableau 16 – Analyse de liaison sur la famille A' : LOD scores multi-point

Chr	Modèle A			Modèle B			Modèle C		
	Z _{max}	Position	Marqueur	Z _{max}	Position	Marqueur	Z _{max}	Position	Marqueur
1	-0,3643	61,45	-	0,1031	61,45	-	0,1333	61,45	-
2	0,7684	239,4	D2S396	0,5884	140,9	D2S112	0,6189	140,9	D2S112
3	0,2804	177,4	D3S1614	0,0187	229,2	D3S1311	0,0501	224,2	-
4	-0,9527	128,83	D4S1615	-0,5487	31	D4S419	-0,4975	31	D4S419
5	2,1744	211,48	D5S408	2,449	210,22	D5S2073	2,4337	210,22	D5S2073
6	-0,4744	16,25	-	-0,2336	16,25	-	-0,2216	16,25	-
7	0,0464	20,5	D7S507	-0,2196	64,9	D7S519	-0,1877	64,9	D7S519
8	-1,2814	57	D8S505	-0,8719	67,5	D8S285	-0,8325	67,5	D8S285
9	-0,159	147,95	-	0,6315	73,1	D9S167	0,6555	73,1	D9S167
10	-0,1731	28,4	D10S547	-0,1527	28,4	D10S547	-0,1152	28,4	D10S547
11	2,1055	106,3	D11S908	1,7942	106,3	D11S908	1,7573	106,3	D11S908
12	0,095	8,3	D12S336	-0,1633	8,3	D12S336	-0,1891	8,3	D12S336
13	1,0743	67	D13S159	0,5968	8,3	D13S171	0,6188	8,3	D13S171
14	-0,242	90,5	D14S280	0,9925	90,5	D14S280	0,9902	90,5	D14S280
15	-2,0298	22	D15S1007	-0,8865	22	D15S1007	-0,807	22	D15S1007
16	-0,3831	60,57	D16S419	0,8636	17,4	D16S3075	0,898	17,4	D16S3075
17	2,3037	0	D17S849	1,806	0	D17S849	1,7549	0	D17S849
18	-1,1303	129,4	D18S70	-0,2469	96,1	D18S68	-0,222	0	D18S59
19	1,154	0	D19S209	0,9315	0	D19S209	0,9135	0	D19S209
20	0,1177	20	D20S115	-0,0091	20	D20S115	0,0182	20	D20S115
21	0,4018	45,19	D21S266	0,1331	45,19	D21S266	0,1426	45,19	D21S266
22	1,0612	52,35	-	1,8123	53,9	D22S1170	1,8054	53,9	D22S1170

Z_{max} : LOD scores maximum obtenus pour chaque chromosome selon les 3 modèles de pénétrance.

Chr : Chromosome. Pour chaque modèle, le Z_{max} est donné ainsi que la position sur le chromosome et le marqueur concerné (le signe - indique que le Z_{max} n'est pas trouvé sur un marqueur).

III- Génétique du rétrécissement aortique calcifié : discussion et perspectives

Les maladies communes dans la population générale sont dans la majorité des cas multifactorielles, résultant de l'association de facteurs génétiques et environnementaux. L'étude des facteurs de susceptibilité génétique de ces maladies est en pleine expansion. L'approche principalement utilisée aujourd'hui est l'étude d'association sur de grandes cohortes de patients. Des facteurs de susceptibilité génétique pour des pathologies communes telles que la maladie coronarienne et le diabète de type 2 ont ainsi été identifiés [The Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007 ; Sladek *et al.*, 2007].

Le rétrécissement aortique calcifié (RAC) est une pathologie fréquente du sujet âgé puisqu'elle touche 2 à 4% des individus de plus de 65 ans [revue par Freeman & Otto, 2005]. Les voies physiopathologiques décrites dans l'origine et la progression du rétrécissement aortique calcifié sont multiples : inflammation, métabolisme des lipides, métabolisme calcique... Ainsi, le remodelage tissulaire est important dans les valves atteintes et les mécanismes sont de mieux en mieux compris, mais le défaut à l'origine de cette cascade de transdifférenciations est inconnu. L'identification d'un gène majeur par une approche familiale d'analyse de liaison, ne nécessitant aucune hypothèse au préalable, pourrait orienter les recherches vers une voie majeure ou révéler de nouvelles voies non suspectées. Nous avons donc entrepris la recherche de formes familiales de rétrécissement aortique calcifié, avec l'objectif d'identifier le premier gène afin d'ouvrir de nouvelles perspectives.

L'approche d'épidémiologie génétique a mis en évidence des foyers de haute fréquence de RAC, et par une analyse de certains de ces foyers, une grande famille (famille A) et d'autres familles de taille plus modeste ont pu être identifiées (**Article 5, page 163**). Les patients de ces familles sont atteints d'un RAC qui apparaît avec le vieillissement, sur valve tricuspide, et qui peut donc être considéré comme un RAC « dégénératif ». Il s'agit de la première description de formes familiales de ce type. L'identification de ces familles est rendue difficile par l'âge d'apparition de la pathologie, survenant souvent après 65 ans. Dans notre cas, l'identification a été facilitée par les caractéristiques historiques de la région avec l'existence d'un isolat social et culturel appelé « Vendée choletaise » ayant connu très peu de migrations de population, expliquant la sédentarité de la population locale. L'identification de ces formes familiales suggère l'existence de formes héréditaires du RAC. Une mutation à effet majeur dans un gène unique conduirait à une manifestation classique de la pathologie, identique à celle observée plus fréquemment dans la population générale.

Une analyse de liaison pan-génomique a été réalisée sur une partie de la famille A (famille A') à l'aide de marqueurs microsatellites. La stratégie était de géotyper dans un second temps les marqueurs potentiellement liés chez les autres patients de la famille A. En dépit de nos efforts, le défaut génétique responsable du RAC dans la famille A n'a pu être identifié à ce jour. Ainsi, malgré l'identification de ces grandes familles les caractéristiques cliniques de la pathologie font qu'une seule génération est exploitable pour les analyses génétiques. L'approche similaire utilisée pour identifier le premier gène de dystrophie plurivalvulaire avait été concluante mais était facilitée par une apparition plus précoce de la pathologie et une liaison à l'X [Kyndt *et al.*, 2007]. En effet dans le cas du RAC, les parents des patients sont décédés et leurs enfants sont trop jeunes (~50 ans) pour être diagnostiqués. Cela diminue considérablement l'informativité génétique des familles. D'autre part nous disposons de peu d'informations sur l'histoire naturelle de la maladie et en particulier de la pénétrance. C'est pourquoi plusieurs modèles de pénétrance ont été utilisés pour l'analyse de liaison. La fréquence de la maladie qui augmente avec l'âge accroît le risque de phénocopies qui résultent probablement d'une combinaison de facteurs de risque. L'intégration potentielle de phénocopies au sein de la famille est actuellement impossible à détecter sur le plan clinique. Le risque d'inclusion de phénocopies est réduit puisque les patients de la famille ne présentent pas de pathologie coronaire, ni de forme familiale d'hypercholestérolémie ou d'insuffisance rénale. L'impact des facteurs environnementaux, probablement importants dans le développement du RAC dans la population générale, est sans doute réduit dans cette famille qui partage le même environnement.

Deux locus potentiels ont tout de même été identifiés pour la famille A' sur les chromosomes 5 (**5q35**) et 18 (**18q21-22**). Cependant à l'échelle de la famille A, la majorité des patients ne partagent pas l'haplotype commun. Les nombreuses recombinaisons ayant eu lieu au cours des générations, depuis l'apparition de la mutation ancestrale, pourraient avoir comme conséquence qu'une région chromosomique très petite soit partagée par l'ensemble des patients. De façon intéressante, le locus du chromosome 18 contient le gène *RANK*, excellent gène candidat pour le RAC, et le locus du chromosome 5 contient le gène *SQSTM1*, dont la protéine est associée à la voie RANK. Ils sont tous deux impliqués dans la maladie de Paget : *RANK* dans la forme 2 (OMIM 603499, [Hughes *et al.*, 2000]) et *SQSTM1* dans la forme 3 (OMIM 602080, [Laurin *et al.*, 2002]). La maladie de Paget est une maladie chronique apparaissant généralement après 40 ans. C'est une maladie du métabolisme osseux, caractérisée par une résorption et une formation osseuse excessive due à l'activation d'ostéoclastes. L'incidence du RAC dans les formes sévères de la maladie de Paget est élevée (24% sur 27 autopsies *versus* 3,5% chez 201 contrôles) même si la plupart

des cas semblent avoir une étiologie rhumatismale [Hultgren, 1998]. J'ai tout de même exclu ces deux gènes par séquençage direct chez le patient III-32 de la famille A' (Figure 31).

Une étude récente de l'équipe de Woodrow Benson (Cincinnati, Etats-Unis) avait pour objectif d'identifier des régions liées à la bicuspidie de la valve aortique et/ou aux anomalies congénitales associées. Pour cela, ils ont réalisé une analyse de liaison pan-génomique (400 marqueurs microsatellites) sur 38 familles représentant 353 individus. Les résultats ont montré la liaison potentielle de marqueurs situés dans les régions 18q, 5q, 13q. En comparant leurs résultats aux nôtres, des marqueurs communs à ceux potentiellement liés au RAC dans la famille A' sont associés aux anomalies cardiaques. Ainsi la région la plus significativement liée est la région **18q22.1** (*LOD score* non paramétrique multi-point de 3,8 pour le marqueur D18S61), et une autre région significative en plus des régions 5q21.2 et 13q34.3 est la région **5q35.3** (*LOD score* non paramétrique multi-point de 2,7 pour le marqueur D5S408) [Martin *et al.*, 2007a]. On peut imaginer qu'un même gène pourrait être impliqué à la fois dans des cas de bicuspidies aortiques et le RAC dégénératif, surtout si on tient compte du fait que le facteur de transcription Notch1, seul gène mis en évidence à ce jour dans le RAC sur valve bicuspidie, est impliqué à la fois dans des anomalies du développement et dans la calcification ([Garg *et al.*, 2005], paragraphe I.3.3). Pour la bicuspidie aortique et les malformations congénitales associées, toutes les familles de l'étude de Martin *et al.* ne sont pas associées aux mêmes loci ce qui suggère une forte hétérogénéité génétique [Martin *et al.*, 2007a]. Une petite proportion de familles est associée à deux loci laissant penser qu'il pourrait y avoir des cas de transmission complexe avec deux gènes impliqués. Leurs travaux actuels consistent à redéfinir plus finement ces régions pour entamer le séquençage de gènes candidats.

D'autre part, un locus de prédisposition à la sclérose de la valve aortique a été identifié en 16q22.1-q22.3 par une autre analyse de liaison pan-génomique sur des paires de germains atteints d'hypertension (1 014 sujets provenant de 858 familles). D'autres loci sont possiblement liés : 19p13.11-p11, 1q42, et 2q37 [Bella *et al.*, 2007]. Il faut remarquer que l'hypertension est un facteur de risque reconnu dans le RAC [Mohler *et al.*, 1991 ; Stewart *et al.*, 1997 ; Peltier *et al.*, 2003], cependant la sclérose n'évolue que dans 16% des cas vers une sténose de la valve aortique [Cosmi *et al.*, 2002].

Les populations isolées et de grandes familles d'une structure parfois similaire à celle de la famille A (**Figure 3, Article 5, page 163**) ont prouvé leur efficacité, en permettant de démontrer l'existence d'une composante génétique, ou d'identifier loci ou gènes, parfois pour des pathologies d'apparition tardive ou fréquentes. Nous pouvons citer l'étude des formes à apparition tardive de la maladie de Parkinson en Islande [Sveinbjornsdottir *et al.*, 2000] et de

la maladie d'Alzheimer dans un isolat néerlandais [Liu *et al.*, 2007], le diabète de type 2 dans une population isolée néerlandaise [Aulchenko *et al.*, 2003] et la microcéphalie congénitale chez les Amish dans une famille récessive [Rosenberg *et al.*, 2002]. Dans les populations isolées, les méthodes statistiques doivent être choisies et employées avec précaution puisque l'homogénéité génétique est plus grande à cause du nombre limité d'ancêtres fondateurs et les facteurs de risque environnementaux sont généralement plus uniformes [revue par Bourgain & Genin, 2005].

Génétique du rétrécissement aortique calcifié : Perspectives

Jusqu'à présent, nous avons réalisé une analyse de liaison sur une sous-famille (A') avec des marqueurs microsatellites. Dans les prochains mois, nous allons réaliser un génotypage de SNP avec des puces pan-génomiques sur l'ensemble des patients de la famille A. L'utilisation d'une puce dense de marqueurs SNP permettrait d'apporter plus d'information étant donné que les génotypes parentaux sont rarement disponibles dans cette famille (Figure 32, [Evans & Cardon, 2004]).

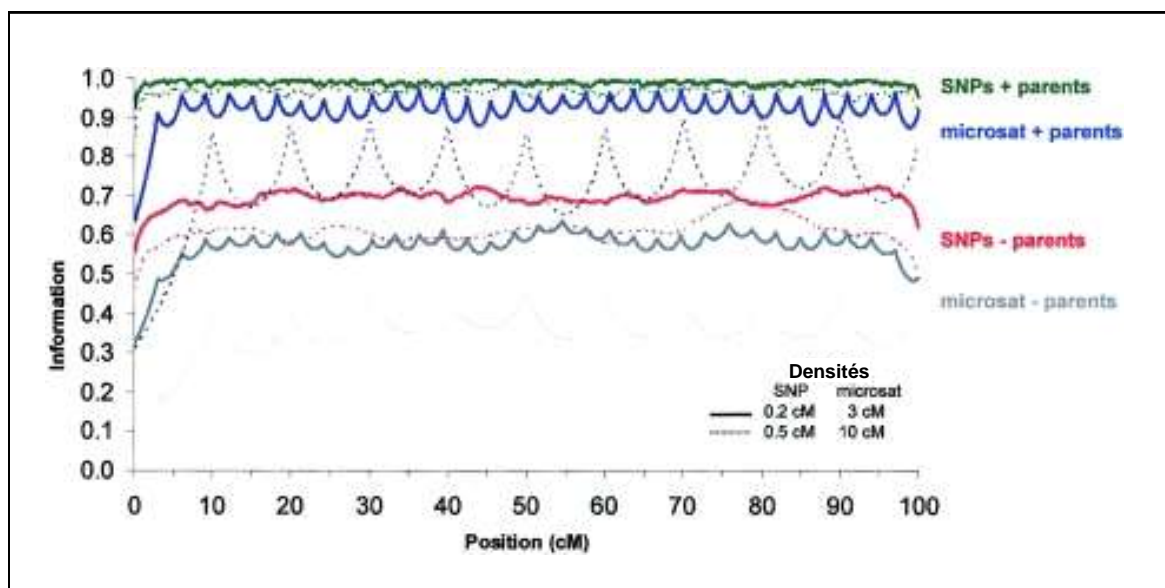


Figure 32 – Information associée aux SNP ou aux microsatellites selon la disponibilité ou non des génotypes parentaux

Simulation réalisée sur une région de 100 cM avec une paire de germains par famille (200 familles). Tous les SNP avaient une fréquence d'allèle minoritaire de 30%, et les microsatellites avaient 5 allèles équi-fréquents ou une hétérozygotie supérieure à 80%. D'après [Evans & Cardon, 2004].

Récemment, la publication d'une carte des variants de nombre de copies (CNV) dans le génome a transformé notre perception de la variabilité génétique entre les individus [Redon *et al.*, 2006]. Certains CNV sont communs dans la population générale et peuvent être utilisés comme marqueurs génétiques. D'autres CNV sont moins fréquents et pourraient être responsables de phénotypes pathologiques. L'identification de CNV absents dans la population générale mais présents chez des patients avec une maladie particulière peuvent permettre d'identifier efficacement des gènes candidats. Des mutations ponctuelles dans de tels gènes peuvent ensuite être identifiées par séquençage de cohortes de patients et cette stratégie a déjà prouvé son efficacité [Visser *et al.*, 2004 ; Amiel *et al.*, 2007]. Si le génotypage haut-débit de SNP ne permet pas d'identifier un locus et la mutation causale, nous pourrions appliquer ces nouvelles technologies utilisant les CNV. Nous avons très récemment initié une collaboration avec l'équipe de cytogénétique moléculaire de Nigel Carter au Wellcome Trust Sanger Institute (Cambridge, Grande-Bretagne) pour réaliser ces expérimentations et profiter de leur maîtrise des outils bioinformatiques d'analyse des SNP et CNV. Pour les plus petites familles (Figure 33), l'analyse sera restreinte à la détection de CNV. Si un gène est identifié, nous pourrions cribler ce gène dans une grande cohorte en cours de constitution (estimation de 1 000 patients à la fin 2008). Cette grande cohorte sera également utilisée à plus long terme pour une étude d'association cas-témoin. Dans cette optique, un groupe de réplication est en cours de constitution au CHU de Rennes (5 890 opérés entre 1973 et 2006), ainsi qu'une cohorte d'individus contrôles âgés de plus de 65 ans.

Ces deux approches, l'approche « cohorte » et l'approche « familiale », sont complémentaires et devrait permettre d'identifier à la fois des gènes majeurs, mais aussi à plus long terme des facteurs génétiques et environnementaux ayant un effet sur l'expressivité de la pathologie. En effet, la progression de la calcification est variable selon les patients, et aujourd'hui l'évolution du degré de sévérité du rétrécissement est impossible à déterminer. Notre population qui s'apparente à un isolat géographique pourrait être un modèle pertinent pour identifier et évaluer ces facteurs modificateurs puisqu'il s'agit d'une population homogène [Wright *et al.*, 1999 ; Peltonen, 2000 ; Peltonen *et al.*, 2000 ; Shifman & Darvasi, 2001 ; Escamilla, 2001 ; Heutink & Oostra, 2002].

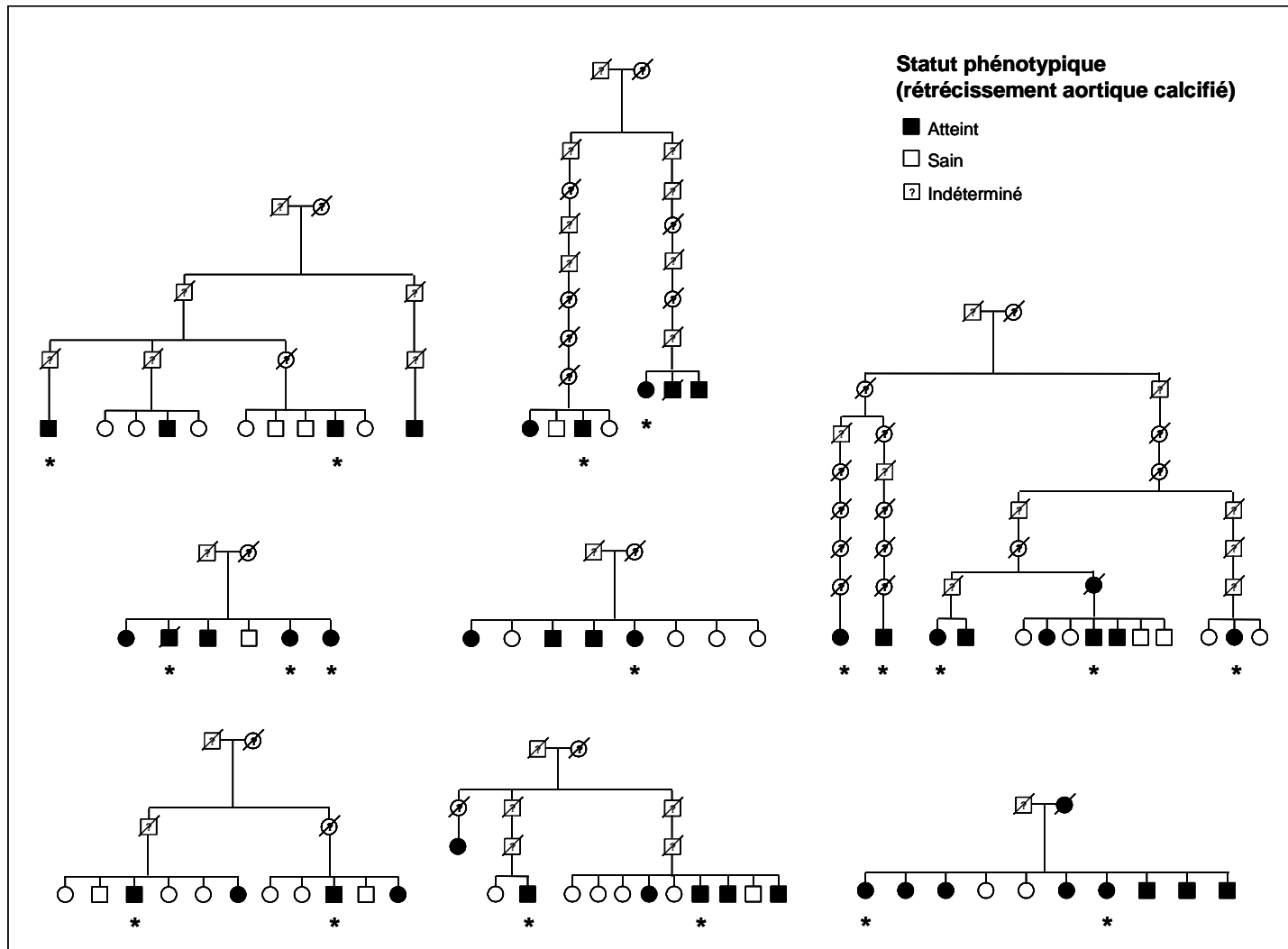


Figure 33 – Arbres généalogiques des petites familles atteintes de RAC (au moins 4 individus atteints)

Les étoiles indiquent les patients ayant subi un remplacement chirurgical de la valve aortique.

La constitution d'une banque de tissu valvulaire a également débuté. A l'image de nos travaux récents d'étude du transcriptome pour la pathologie valvulaire myxoïde (résultats non publiés), elle pourrait permettre de confirmer ou d'identifier de nouvelles voies, et donner des indices pour le choix des gènes candidats. Une étude de l'équipe de Nalini Rajamannan (Chicago, Etats-Unis) sur 27 valves aortiques tricuspides calcifiées a déjà été réalisée, mais à petite échelle, puisque le niveau d'expression de 9 gènes (tous des marqueurs de la différenciation ostéoblastique) a été évalué par quantification semi-quantitative du taux de transcrit ou Western Blot [Caira *et al.*, 2006]. Leurs résultats ont mis en évidence une surexpression de marqueurs de la voie du Lrp5 (*LDL receptor-related protein 5*) dans les valves calcifiées. Nous envisageons d'utiliser pour ce projet des puces pan-génomiques d'expression sur des valves aortiques tricuspides calcifiées. Nous disposons de 140 valves dans notre banque de tissu à ce jour.

Génétique du rétrécissement aortique calcifié : Conclusion

Les investigations de l'équipe dans le domaine des valvulopathies mitrales et aortiques ont montré qu'à l'image des maladies neurodégénératives, une composante héréditaire contribue à une fraction des cas observés dans la population générale. Bien que la physiopathologie moléculaire de la neurodégénérescence soit complexe, des avancées importantes ont été accomplies en identifiant les défauts génétiques de formes mendéliennes de ces pathologies [revue par Vila & Przedborski, 2004]. L'utilisation de nouvelles technologies haut-débit utilisant SNP et CNV à haute densité devrait nous permettre d'identifier dans les prochains mois le premier gène de RAC.

Malgré la progression de nos connaissances sur les mécanismes physiopathologiques du RAC, l'efficacité des traitements pharmacologiques préventifs proposés à ce jour n'est pas démontrée. L'identification des bases moléculaires du RAC dont la prévalence augmente avec le vieillissement de la population pourrait permettre le développement de solutions thérapeutiques alternatives à la chirurgie.

E- Conclusion générale

Les cardiopathies **rythmiques** rares ou les cardiopathies **dégénératives** telles que les valvulopathies, plus fréquentes dans la population générale, sont aujourd'hui abordables tant par une approche familiale qu'une approche gène candidat grâce à nos connaissances du génome humain et aux outils de génétique moléculaire haut-débit. L'objectif de mon travail était (i) d'identifier de nouveaux gènes pour ces pathologies essentiellement monogéniques, mais génétiquement et phénotypiquement hétérogènes, (ii) améliorer la compréhension des relations génotype-phénotype pour les gènes à l'origine de larges spectres phénotypiques.

De grandes avancées sont réalisées actuellement dans le domaine de la génétique et la génomique avec l'identification de mutations pathogènes responsables de maladies rares et des variations de susceptibilité aux maladies communes qui améliorent la stratification du risque. Le transfert vers le diagnostic permet aux patients de bénéficier de ces résultats auxquels ils ont contribué en acceptant de participer aux projets de recherche.

Pour de nombreux locus rapportés grâce à des approches familiales, le gène n'a pas encore été identifié. Dans un certain nombre de cas, cet échec pourrait être dû à des réarrangements génomiques non détectés par la technique de séquençage. En effet, environ 10% des mutations dans les gènes morbides connus correspondent à des réarrangements. Dans les prochaines années l'identification de ces gènes morbides sera facilitée grâce à une amélioration des annotations du génome et au développement de techniques pour cribler les régions non-codantes, les exons alternatifs et les réarrangements génomiques.

Les objectifs à long terme sont la **médecine prédictive** qui permettra d'évaluer le risque génétique de développer une maladie et la **pharmacogénomique** qui permettra d'administrer un traitement individualisé en fonction du fond génétique. Ces approches seront toutefois limitées par les facteurs environnementaux qui sont très certainement déterminants dans l'expressivité des maladies. La médecine prédictive soulève également de nombreux problèmes éthiques.

F- Annexes

I- Annexe 1 : L'activité normale du cœur

I.1- Anatomie et fonctionnement du cœur

Le cœur humain est un organe creux et musculaire composé de quatre cavités : deux oreillettes et deux ventricules. Au centre du système circulatoire, il a pour rôle de transmettre aux poumons le sang non oxygéné puis de pomper le sang oxygéné vers le reste de l'organisme. L'oxygène dont le cœur a besoin pour fonctionner est apporté par les artères coronaires.

Le sang non oxygéné arrive par les veines caves inférieures et supérieures dans l'oreillette droite, est conduit dans le ventricule droit, puis vers les poumons par les artères pulmonaires droites et gauches. Le sang oxygéné revient dans l'oreillette gauche par la veine pulmonaire, passe dans le ventricule gauche, et est éjecté vers la circulation générale par l'aorte (Figure 34).

Le passage du sang d'un compartiment à l'autre est rendu possible par la contraction de chacun, provoquée par l'influx nerveux qui se propage grâce au système de conduction dans les oreillettes puis dans les ventricules.

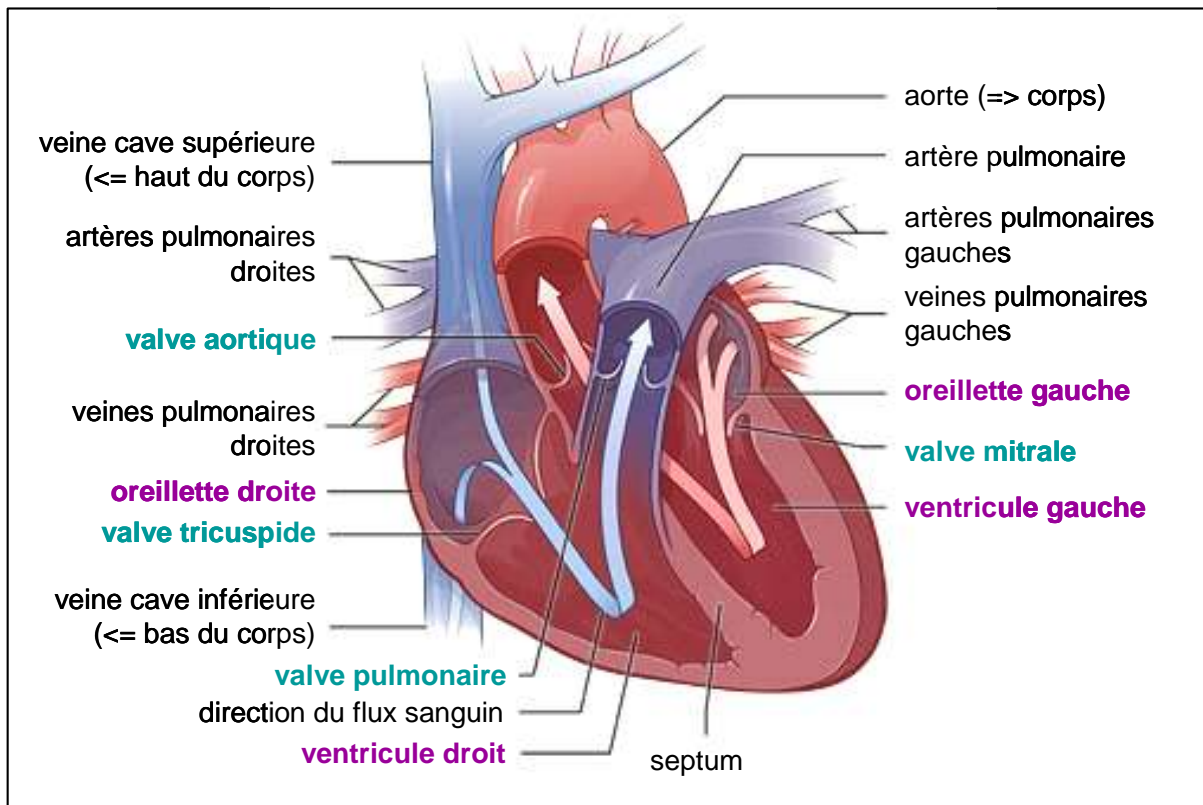


Figure 34 – Structure du cœur

Le trajet du sang non oxygéné est représenté en bleu et celui du sang oxygéné est représenté en rouge. La paroi musculaire épaisse du ventricule gauche permet la propulsion du sang oxygéné dans l'aorte puis l'organisme lors de la systole. Modifié d'après <http://www.nhlbi.nih.gov/health>.

Les quatre valves, **tricuspide** (oreillette droite – ventricule droit), **pulmonaire** (ventricule droit – artère pulmonaire), **mitrale** (oreillette gauche – ventricule gauche) et **aortique** (ventricule gauche – aorte), assurent le passage unidirectionnel du sang d'une cavité à l'autre en empêchant le reflux. Les valves sont constituées de trois feuillets à l'exception de la valve mitrale qui est constituée de deux feuillets (Figure 35). Les valves auriculo-ventriculaires (mitrale et tricuspide) sont ancrées au ventricule par des cordages tendineux.

Le fonctionnement normal de ces valves est appréhendé par l'auscultation à l'aide d'un stéthoscope. Le premier bruit du cœur est grave, assourdi, et correspond à la fermeture des valves auriculo-ventriculaires, marquant le début de la systole. Le second bruit du cœur est plus fort, et coïncide à la fermeture des valves aortiques et pulmonaires, marquant le début de la diastole.

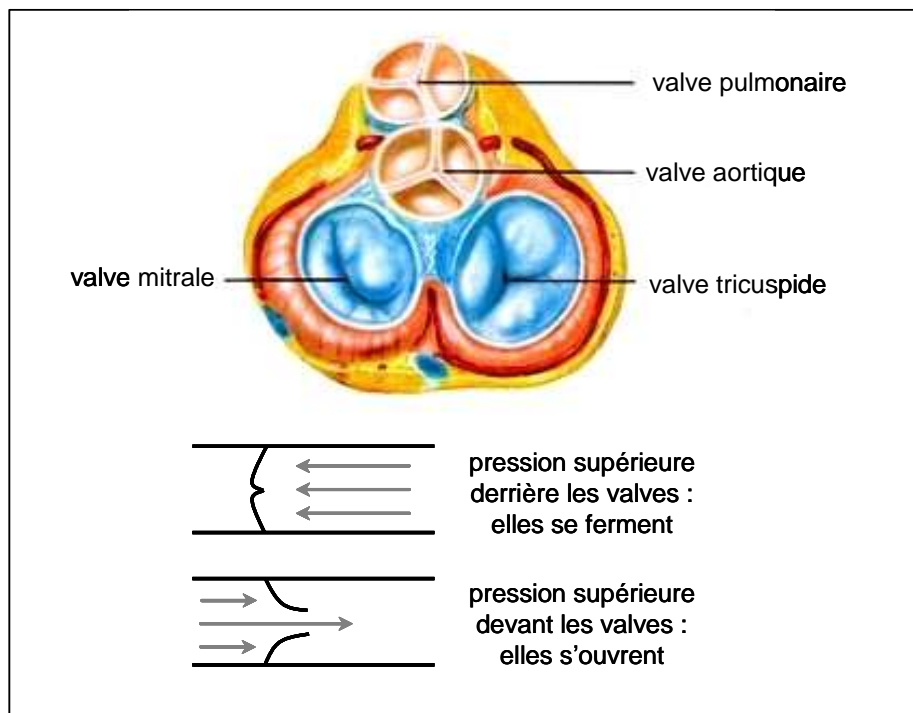


Figure 35 – Les valves cardiaques

I.2- Cycle cardiaque et cardiomyocytes

Le cycle cardiaque ou « révolution cardiaque » comprend une phase d'éjection du sang (systole ou contraction du muscle cardiaque) et une phase de remplissage (diastole ou relaxation) et dure environ 0,8 seconde. Chaque battement (65 à 80 par minute) se produit spontanément mais la fréquence de ces battements est modulée par le système nerveux autonome et hormonal.

L'influx naît du **nœud sinusal** ou nœud de Keith et Flack, foyer de l'automatisme cardiaque situé au niveau supérieur de l'oreillette droite. Il est transmis dans les oreillettes, puis dans les ventricules par l'intermédiaire du **nœud auriculo-ventriculaire** qui ralentit la conduction pour permettre aux ventricules de se remplir. Puis l'influx nerveux se propage rapidement dans les ventricules par le **faisceau de His** et ses branches droites et gauches, et les **fibres de Purkinje** permettent la conduction de l'apex vers la base des ventricules (Figure 36) [revue par Pennisi *et al.*, 2002]. Au sein du myocarde, l'onde de conduction est transmise de l'endocarde (couche interne) vers le mid-myocarde (couche épaisse intermédiaire), puis l'épicarde (couche externe).

Les cellules cardiaques spécialisées dans l'excitabilité (cellules nodales) et la conductibilité (cellules du faisceau de His, fibres de Purkinje) donnent le signal de contraction aux cardiomyocytes (= cellules cardiaques musculaires) contractiles excitables, majoritaires et riches en myofibrilles, c'est le **couplage excitation-contraction** (Figure 37). Les cardiomyocytes forment des fibres ramifiées jointes par les desmosomes et les jonctions *adherens* (lien mécanique) et les jonctions communicantes (lien électrique, Figure 38). Aux extrémités des cardiomyocytes, la zone de contact entre deux cellules voisines est appelée disque intercalaire. Il faut remarquer que les cellules du faisceau de His et du réseau de Purkinje sont également douées d'automatisme, leur rôle étant secondaire par rapport aux cellules nodales.

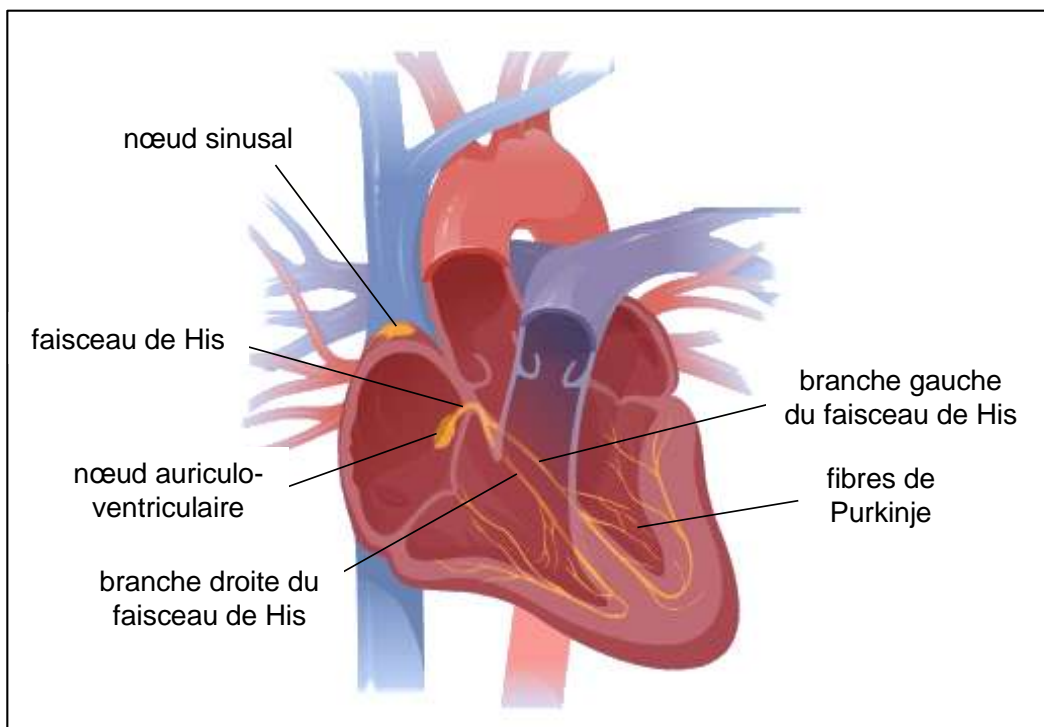


Figure 36 – Le cœur et le tissu de conduction

Modifié d'après <http://www.nhlbi.nih.gov/health>.

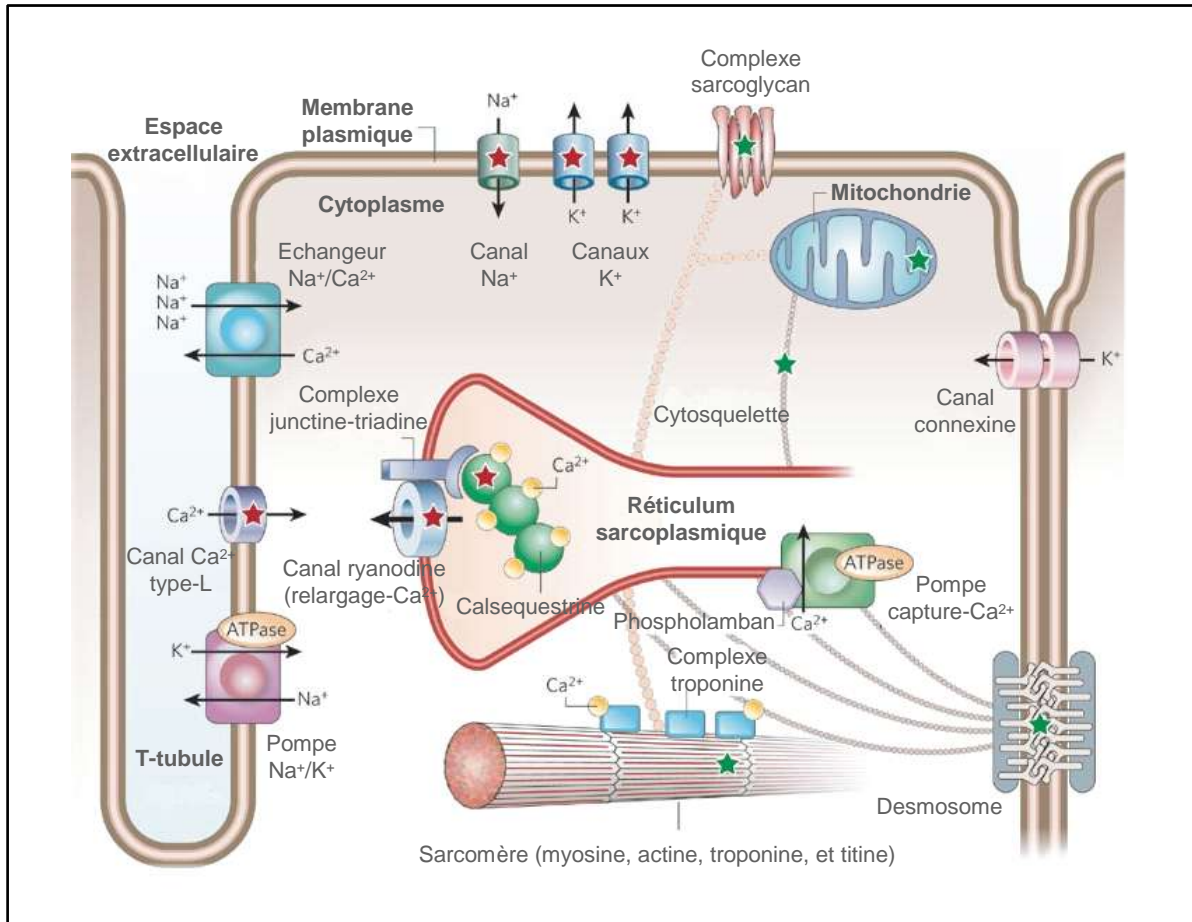


Figure 37 – Couplage excitation-contraction dans les cardiomyocytes

En réponse à la transmission du potentiel d'action et à la dépolarisation de la membrane, le Ca^{2+} entre dans le cytoplasme par les canaux de la membrane plasmique sensibles au voltage, puis lie les récepteurs à la ryanodine (RyR) donnant le signal pour le relargage de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique. Le Ca^{2+} active la contraction par liaison à la troponine. Etoiles rouges, protéines mutées dans les troubles du rythme primaires. Etoiles vertes, complexes protéiques impliqués dans des cardiomyopathies. Modifié d'après [Knollmann & Roden, 2008].

I.3- Les canaux jonctionnels : les connexines

La contraction simultanée de l'ensemble des cellules contractiles individuelles nécessite qu'elles se comportent de façon coordonnée. La capacité du muscle cardiaque à fonctionner comme un syncytium électrique est rendue possible grâce à l'existence de jonctions communicantes, les « gap-junctions ». Elles sont responsables de la communication électrique et moléculaire entre les cytoplasmes de deux cellules adjacentes, qui permet un couplage et la transmission rapide de la propagation de l'onde de dépolarisation.

Les protéines de la membrane plasmique constituant ces jonctions communicantes sont appelées « connexines ». L'association en hexamère des connexines forme un « connexon », héli-canal, l'association de chaque connexon entre deux cellules adjacentes formant un canal hydrophile fonctionnel permettant le passage des ions et métabolites (Figure 38). Les connexons peuvent être formés de l'association de connexines distinctes.

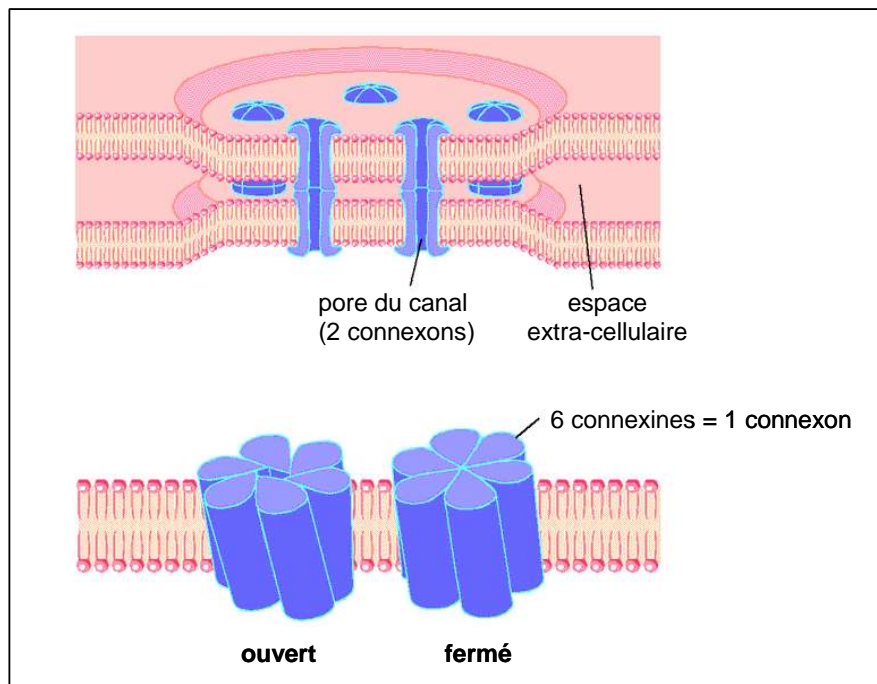


Figure 38 – Structure des jonctions communicantes

Les jonctions communicantes sont constituées d'un cluster de canaux qui lient les compartiments intracellulaires de cellules adjacentes et facilitent la communication intercellulaire. Chaque héli-canal (connexon) est composé de six connexines. Les connexines comprennent quatre domaines transmembranaires (non montré). Modifié d'après [Steel, 1998].

Dans le cœur adulte humain, il existe trois connexines majoritaires. Elles ont été nommées d'après leur poids moléculaire et sont impliquées à la fois dans la conduction de l'activité électrique et dans la morphogénèse cardiaque [Lo, 2000]. La **connexine-40** (Cx40, GJA5, 1q21.1) est prédominante dans le tissu atrial et est aussi exprimée par les cellules endothéliales vasculaires. La **connexine-43** (Cx43, GJA1, 6q21-q23.2) est présente à la fois dans les tissus ventriculaires et auriculaires et le système de conduction mais pas dans les cellules nodales. La **connexine-45** (Cx45, GJC1, 17q21.31) est exprimée dans les myocytes, plus faiblement. D'autres connexines ont été décrites dans le cœur : les connexines 30, 37, 46, 50, 57 [revues par Saffitz *et al.*, 2000 ; van Veen *et al.*, 2001] [Kreuzberg *et al.*, 2005].

I.4- L'activité électrique cardiaque

I.4.1- Au niveau cellulaire : potentiel d'action, canaux, et courants ioniques

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

L'onde de dépolarisation transitoire est déclenchée essentiellement par le courant I_f dans les cellules nodales (dépolarisation lente et spontanée) et par la dépolarisation des cellules voisines dans les cellules contractiles. L'ensemble des mouvements des ions Na^+ , K^+ , Ca^{2+} et Cl^- à travers les canaux ioniques spécifiques dépendants du potentiel et des échangeurs sont responsables du PA. La morphologie des PA est différente d'un type cellulaire à l'autre, selon que les cellules soient spécialisées dans l'automatisme, l'excitabilité, ou la conduction. Il existe également une hétérogénéité régionale (ventriculaire/auriculaire, épicarde/mid-myocarde/endocarde). Cette hétérogénéité est due à une expression différentielle des canaux [Gaborit *et al.*, 2007]. Le potentiel d'action des cardiomyocytes contractiles comprend cinq phases (Figure 39) :

- **Phase 0 : dépolarisation** (potentiel de membrane $-80-85 \text{ mV} \rightarrow +30 \text{ mV}$) due à l'activation des canaux sodiques voltage-dépendants et au courant I_{Na} . Elle entraîne l'activation d'autres canaux ioniques dépendants du potentiel.
- **Phase 1 : repolarisation initiale** due à l'inactivation du courant sodique et à l'activation du courant transitoire sortant potassique dépendant du potentiel (I_{to}).
- **Phase 2 : plateau** ($\sim 0 \text{ mV}$) dû au courant entrant calcique $I_{\text{Ca,L}}$: entrée de Ca^{2+} dans la cellule (DHPR voltage-dépendant) et relargage du Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique (RyR2) dans le cytoplasme, responsable de la contraction des cellules (Figure 37). Du fait de l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, l'échangeur Na/Ca fonctionne alors dans le sens entrée d'ions Na^+ /sortie d'ions Ca^{2+} , il en résulte un courant net entrant dépolarisant qui a tendance à ralentir la repolarisation. Dans les cellules ventriculaires et les cellules de Purkinje, il subsisterait un petit courant I_{Na} persistant.

- **Phase 3 : repolarisation** due à la réduction des courants entrants (I_{Na} , I_{Ca}) et à l'activation des courants potassiques sortants (composante lente I_{Ks} , composante rapide I_{Kr}), ramenant le potentiel de membrane à sa valeur de repos.
- **Phase 4 : stabilisation** du potentiel de repos due au courant I_{K1} . La différence de potentiel est due au déséquilibre des ions K^+ et Na^+ de part et d'autre de la membrane (l'intérieur de la cellule plus riche en K^+ étant chargé négativement, et l'extérieur plus riche en Na^+ positivement). Il est maintenu grâce à la pompe Na^+/K^+ ATP-dépendante.

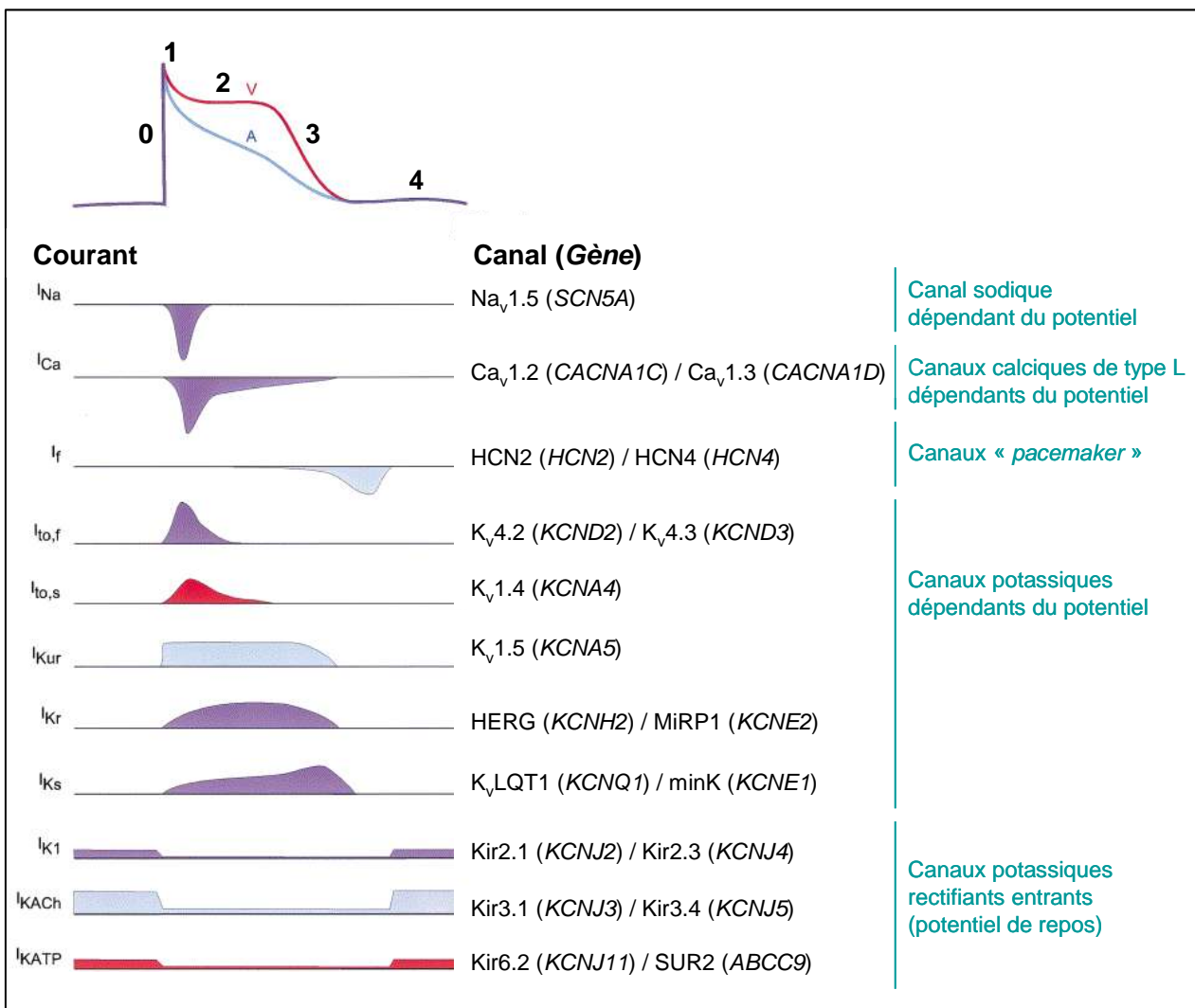


Figure 39 – Représentation des principaux courants ioniques responsables des potentiels d'action auriculaires et ventriculaires humains et des canaux ioniques associés

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

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

Il existe également une grande hétérogénéité régionale de densité de courant I_{to} dans les cellules ventriculaires, en particulier entre l'épicaarde et l'endocarde. Dans l'épicaarde, les cellules M [Sicouri & Antzelevitch, 1991], et les fibres de Purkinje, ce courant I_{to} prédominant serait responsable de l'aspect « *spike and dome* » du PA, comme illustré dans l'épicaarde de ventricule humain en Figure 40. Cette variabilité entre PA épicaardique et PA endocardique pourrait être responsable d'un « **gradient transmural** » lors de la repolarisation précoce ou du SBr (Figure 9, page 41).

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

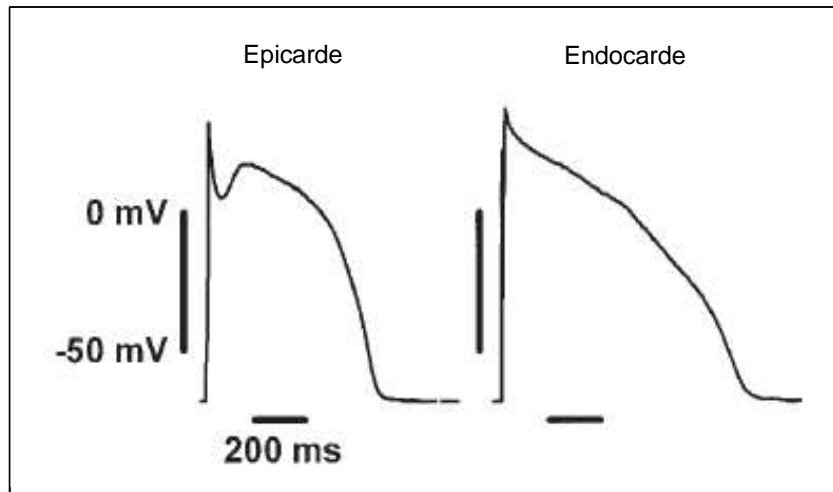


Figure 40 – Potentiels d'action épicaardique et endocardique chez l'homme

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

I.4.2- L'électrocardiogramme de surface

Le tracé électrocardiographique, ou ECG, est l'enregistrement de l'activité électrique du cœur. Il reflète l'ensemble des potentiels d'action cellulaires dans les différents compartiments cardiaques. En effet, les électrodes amplifient le signal et l'ECG donne une représentation de la dépolarisation et repolarisation des oreillettes puis des ventricules (Figure 41). Son caractère non invasif en fait un outil diagnostique très couramment utilisé pour détecter des anomalies cardiaques.

L'ECG standard est enregistré sur douze dérivations (« *12-lead electrocardiogram* ») pour avoir une représentation tridimensionnelle de l'activité électrique du cœur : six dérivations précordiales (V1, V2, V3, V4, V5, V6), et six dérivations des membres (DI, DII, DIII, aVR, aVL, aVF).

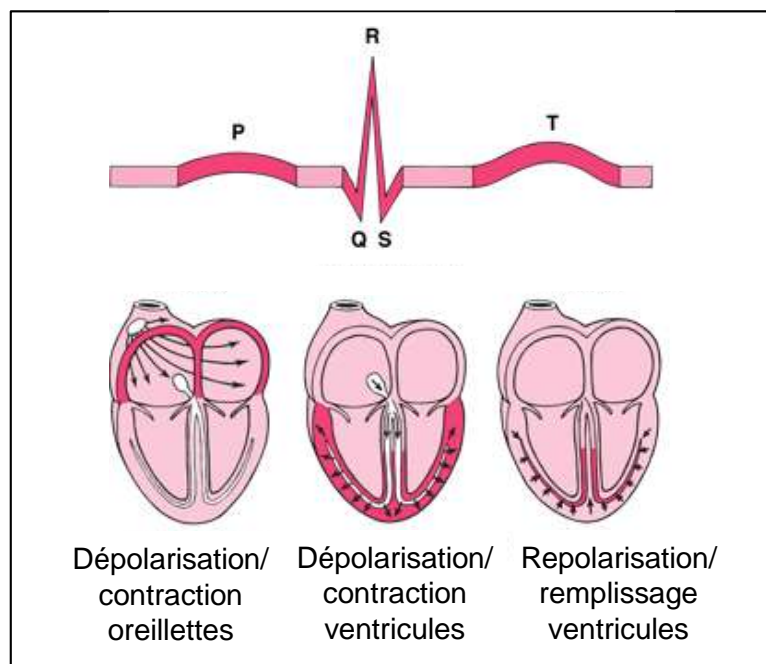


Figure 41 – L'ECG, manifestation du fonctionnement électrique du cœur

Le cycle cardiaque se traduit par l'apparition successive des ondes P, Q, R, S, T, et U, positives ou négatives selon les dérivations observées, et des mesures sont réalisées par les cardiologues pour rechercher des anomalies (Figure 42).

Les ondes :

- **Onde P** : dépolarisation des oreillettes depuis le nœud sinusal jusqu'au nœud auriculo-ventriculaire.
- **Complexe QRS** : dépolarisation des ventricules.
- **Onde T** : repolarisation des ventricules.
- **Onde U** : parfois observée après l'onde T et de faible amplitude. Sa signification est discutée mais l'hypothèse la plus probable lorsqu'elle est physiologique est une repolarisation tardive du réseau de Purkinje.

Les mesures courantes :

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

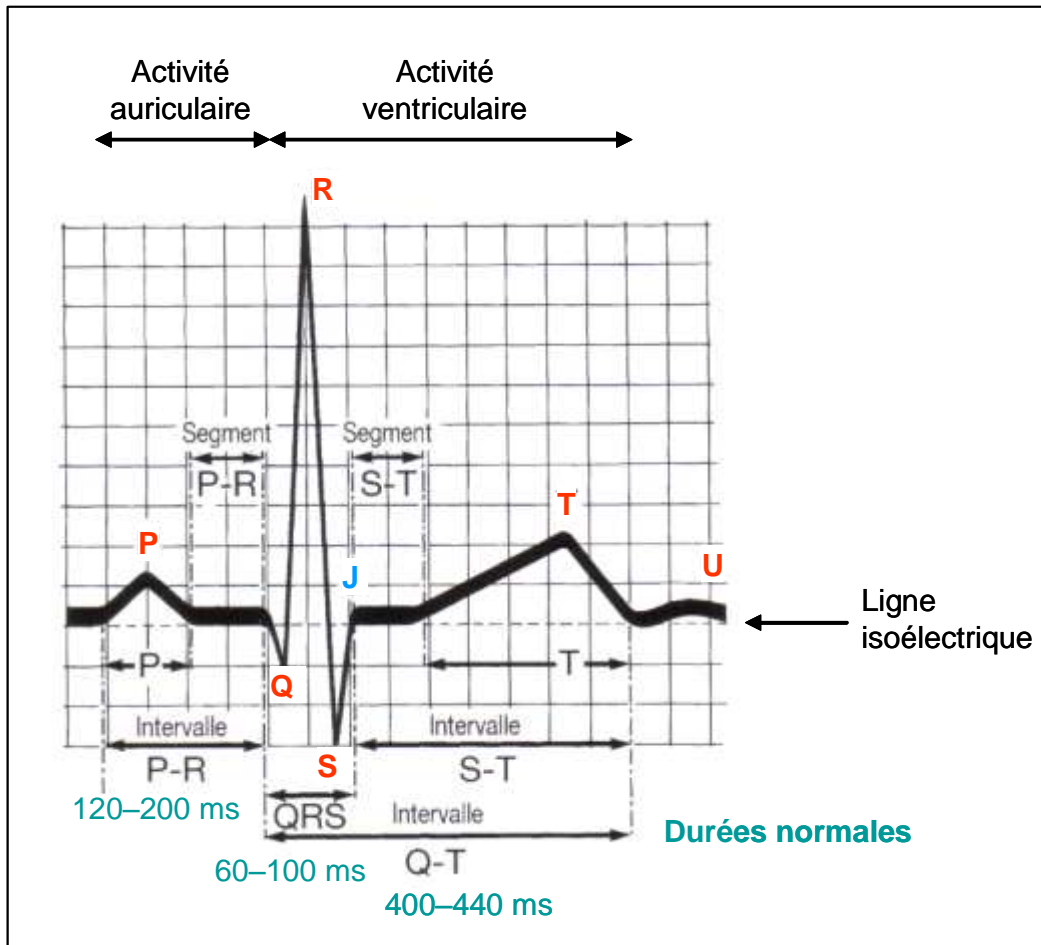


Figure 42 – Principaux paramètres de l'ECG

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

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

II- Annexe 2 : Matériel et méthodes

II.1- Approche familiale pour l'identification de nouveaux gènes

II.1.1- Etape clinique : identification et recrutement des familles

Depuis la création de l'équipe de génétique, les travaux de recherche se font en collaboration étroite avec l'équipe clinique du service de cardiologie dirigé par Hervé Le Marec au CHU de Nantes. Grâce au travail des cliniciens et des infirmières de recherche clinique qui identifient, recrutent, et phénotypent des familles, nous disposons en recherche de familles génétiquement informatives qui rendent possibles des analyses de liaison pangénomiques pour l'identification de nouveaux gènes.

La participation des patients est en accord avec les recommandations françaises pour la recherche génétique et chaque projet est approuvé par le comité d'éthique de Nantes et dispose des autorisations du CCPPRB (Comité consultatif de protection des personnes dans la recherche biomédicale). Chaque individu participant à l'étude, que ce soit un patient ou un apparenté phénotypiquement sain, signe un consentement écrit éclairé lors du prélèvement sanguin.

Le plus souvent, l'identification des familles résulte d'enquêtes systématiques réalisées en cas d'éléments en faveur d'une histoire familiale chez des patients, les **propositus ou cas index**, vus en consultation. Alors, l'ensemble des membres de la famille sont informés et éventuellement contactés s'ils désirent participer au programme de recherche.

Grâce à la population locale sédentaire, il a été entrepris des approches d'épidémiologie génétique pour les pathologies d'apparition tardive pour lesquelles il est plus difficile d'identifier de grandes familles génétiquement informatives. L'hypothèse à la base de cette approche est que, s'il existe des formes familiales de la maladie, il doit être possible d'identifier des zones géographiques où la fréquence de la maladie sera anormalement élevée, ces zones correspondant à des « *clusters* » familiaux.

Une fois les zones de haute fréquence de la maladie identifiées, le professeur André Chaventré, du laboratoire de génétique des populations de l'université de Bordeaux 2, réalise des enquêtes généalogiques ascendantes pour identifier un ancêtre commun aux patients originaires d'une même commune.

II.1.2- Etape génétique : analyse de liaison et « clonage positionnel »

II.1.2.1- La recombinaison méiotique

La division méiotique requiert des événements de recombinaison homologue appelés « *crossing-over* » par un appariement des chromosomes homologues au moment de la première division réductionnelle (séparation des chromosomes de chaque paire), et qui contribuent au brassage du génome (Figure 43). La **fraction de recombinaison (θ)** correspond à la probabilité de recombinaison entre deux loci. Plus les deux loci sont éloignés, plus la probabilité d'une recombinaison lors de la méiose est importante. Une fraction de recombinaison de 0 signifie qu'il n'y a aucune recombinaison entre les deux loci donc qu'ils sont extrêmement proches sur le chromosome. Une fraction de recombinaison de 0,5 correspond à 50% de gamètes recombinés sur l'ensemble des gamètes transmis et signifie donc une non-liaison entre les deux loci (très éloignés sur le même chromosome, ou sur des chromosomes différents). La mesure de la distance génétique entre deux loci est le **centiMorgan (cM)**, 1 cM correspondant à une fréquence de recombinaison de 1% pendant la méiose.

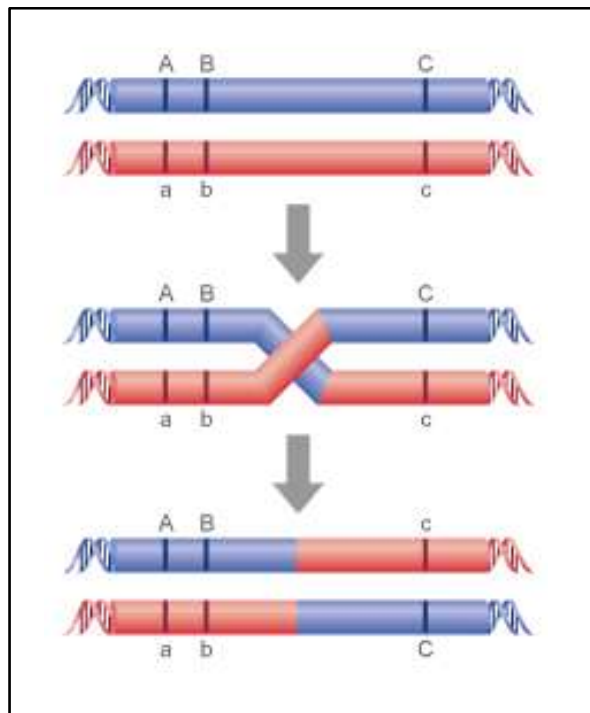


Figure 43 – Principe de la liaison génétique

En bleu : Chromosome d'origine paternelle. *En rouge* : Chromosome d'origine maternelle.

La recombinaison implique un phénomène physique appelé « *crossing-over* » entre les deux chromosomes homologues d'une paire. Les allèles paternels et maternels sont mélangés. Si A est le gène morbide et B et C les marqueurs génétiques, il y a plus de probabilité de recombinaison entre A et C qu'entre A et B. D'après <http://genome.wellcome.ac.uk/>.

II.1.2.2- Principe de l'analyse de liaison

L'analyse de liaison, basée sur la recombinaison méiotique, consiste à rechercher une co-ségrégation entre un marqueur génétique (microsatellite ou SNP) et la pathologie, afin de localiser le gène muté. Pour chaque marqueur génétique étudié, la transmission de ses différents allèles est observée chez les individus sains et atteints d'une famille sur plusieurs générations (Figure 44). Les allèles co-transmis avec la maladie selon une fréquence plus élevée que celle liée au hasard indiqueront les marqueurs situés à proximité du gène morbide. La position des marqueurs génétiques étant connue sur les chromosomes grâce aux cartes génétiques, la région contenant le gène morbide, constituée d'un ensemble de marqueurs liés, le locus, sera délimitée.

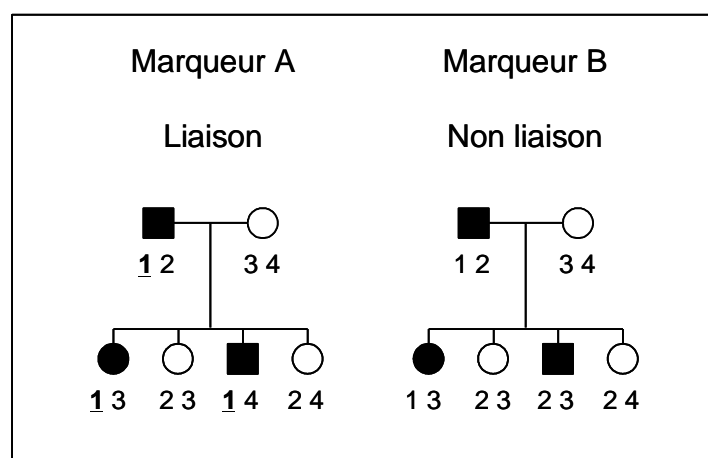


Figure 44 – Exemple simplifié d'analyse de liaison ou non-liaison entre un marqueur génétique et une pathologie

Dans le pedigree de gauche, l'allèle 1 est présent chez les individus atteints et eux seuls, il est co-transmis avec la pathologie. Le marqueur A est donc potentiellement proche du gène morbide. Dans le pedigree de droite, aucun allèle n'est co-transmis avec la pathologie. Le marqueur B est donc éloigné du gène morbide. Les symboles en fond noir représentent les patients, en fond blanc les individus sains, carré : homme, rond : femme.

Un marqueur génétique est un segment d'ADN présentant au moins deux allèles courants. Les marqueurs classiquement utilisés ces dix dernières années étaient les marqueurs **microsatellites**, séquences formées d'un motif répété de 1 à 4 nucléotides, polymorphes et sans effet fonctionnel. Les cartes génétiques denses, basées sur le pourcentage de recombinaison, comme celle du Génethon [Dib *et al.*, 1996] regroupent des marqueurs microsatellites uniformément distribués et informatifs génétiquement (hétérozygotie moyenne 70%). D'autres cartes ont été ensuite publiées : Marshfield [Broman *et al.*, 1998] et deCODE [Kong *et al.*, 2002]. Une analyse de liaison pan-génomique avec des marqueurs répartis selon une trame d'environ 10 cM (400 marqueurs) suffit en général pour les pathologies monogéniques « mendéliennes ».

Plus récemment et grâce notamment au projet HapMap [The International HapMap Consortium, 2003 ; The International HapMap Consortium, 2005 ; The International HapMap Consortium, 2007] sont apparues des cartes denses de **SNP** qui ont permis la confection de puces de génotypage haute densité de 100 à 500 000 SNP. Les SNP sont moins informatifs génétiquement, puisqu'ils sont dimorphes (Figure 45), et il est donc nécessaire d'en génotyper un nombre beaucoup plus important pour avoir une informativité génétique comparable aux microsatellites.

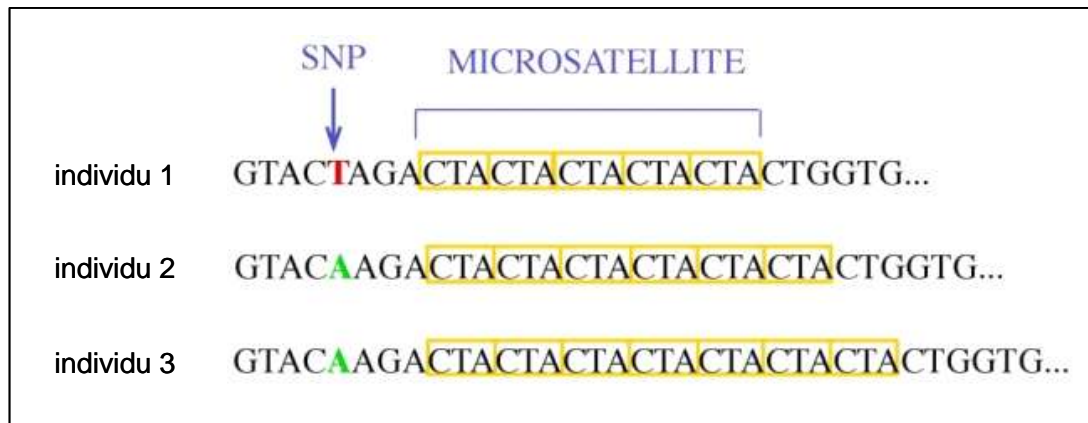


Figure 45 – Marqueurs génétiques : microsatellites et SNP

Dans cet exemple, le microsatellite est un motif de 3 nucléotides (CTA) répété 5, 6 ou 7 fois chez les trois individus, alors que le SNP est dimorphe, T ou A.

La taille du locus morbide dépend du temps écoulé depuis l'apparition de la mutation qu'on appelle **effet fondateur**. Plus l'effet fondateur est ancien, plus il y aura eu de méioses au cours des générations successives et plus l'intervalle commun aux patients sera réduit. Une fois le locus morbide identifié, les gènes candidats positionnels sont séquencés. Si un variant est détecté et qu'il n'est pas répertorié dans les bases de données de SNP, on observe sa ségrégation avec la pathologie dans la famille. S'il ségrège chez les patients, sa fréquence dans la population générale est évaluée. Le variant est validé comme **mutation** si sa fréquence est très faible dans la population générale et si les études fonctionnelles montrent que ses effets sont compatibles avec le phénotype observé.

II.1.2.3- Protocole de génotypage des marqueurs microsatellites

Les fragments de PCR contenant les microsatellites (de taille variable selon le nombre de répétitions du motif) sont marqués avec des fluorophores par deux techniques distinctes. Soit les amorces de PCR sont couplées à un fluorophore (cas de l'analyse de liaison pan-génomique), soit les produits d'amplification sont marqués dans un deuxième temps avec des dCTP fluorescents (cas de l'analyse fine des loci candidats).

Les fragments marqués sont ensuite séparés selon leur taille sur séquenceur automatique ABI PRISM™ 377 ou 48-capillaires 3730 DNA Analyzer. La taille des fragments est déterminée en analysant conjointement un standard de taille (Genescan™ 400HD ROX™ ou Genescan™ 600 LIZ™) avec les logiciels Genotyper® v2.1 ou GeneMapper® v4.0 (Applied Biosystems). Enfin, un numéro est assigné à chaque taille et les génotypes sont rapportés sur les arbres généalogiques pour reconstitution manuelle des haplotypes, et/ou les *LOD scores* calculés.

1- Analyse de liaison pan-génomique

Les PCR sont réalisées en multiplexe avec des amorces fluorescentes pour génotyper 382 marqueurs microsatellites polymorphes et répartis sur l'ensemble des autosomes du génome avec une trame d'environ 10 cM (ABI PRISM™ Linkage Mapping Set Version 2.5, Applied Biosystems), selon les instructions du fournisseur.

2- Analyse des loci candidats

Pour chaque individu et chaque marqueur, les PCR sont réalisées dans un volume final de 20 µl comprenant 50-100 ng d'ADN génomique, 1 unité de Taq DNA polymerase, du tampon de PCR 1X associé (GE Healthcare), des dNTP (200 µM, Invitrogen), et les amorces sens et antisens (1 µM, Sigma-Genosys ou Operon Biotechnologies, séquences d'après UniSTS sur NCBI), dans l'appareil GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems).

La réaction comprend une dénaturation de 3 min à 94°C, puis 35 cycles d'amplification (30 s de dénaturation à 94°C, 30 s d'appariement à 55°C, et 1 min d'élongation à 72°C), et enfin une extension finale de 10 min à 72°C. Les produits d'amplification sont contrôlés par électrophorèse en mini-gel d'acrylamide 6% dans du tampon TBE 1X (Invitrogen) à 140V, puis une révélation au bromure d'éthidium sous UV.

L'étape suivante est le marquage avec des fluorophores d'un des deux brins d'ADN des produits de PCR [Jouquand *et al.*, 1999]. Ainsi, 2 µl de produit de PCR sont ajoutés dans un volume final de 15 µl contenant 0,75 unité de Taq DNA polymerase, le tampon 1X associé (GE Healthcare), des dNTP (200 µM, Invitrogen), l'amorce sens ou antisens (0,1 µM, Sigma-Genosys ou Operon Biotechnologies), et des dCTP couplés à un fluorophore (R6G ou R110,

0,5 µM, Perkin Elmer). La réaction comprend une dénaturation de 2 min à 94°C, puis une amplification de 25 cycles (30 s de dénaturation à 94°C, 30 s d'appariement à 49°C, et 20 s d'élongation à 72°C). L'utilisation d'une seule amorce permet de ne marquer qu'un seul brin, ce qui améliore la résolution lors de l'analyse des génotypes. Les fragments fluorescents sont ensuite purifiés sur résine Sephadex™ G-50 (GE Healthcare).

II.1.2.4- Protocole de génotypage des SNP

Un polymorphisme est défini comme une variation de l'ADN, non pathogène, qui contribue à la diversité entre les individus. Ces variations sont très fréquentes avec environ un SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), polymorphisme d'une base unique, toutes les 1 200 bases dans le génome humain. Comme les microsatellites, la position physique des SNP sur le génome est connue et ils peuvent être utilisés comme marqueurs génétiques. Le projet HapMap [The International HapMap Consortium, 2003 ; The International HapMap Consortium, 2005 ; The International HapMap Consortium, 2007] a permis de cartographier un nombre considérable de SNP et d'avoir des informations sur les fréquences alléliques selon les ethnies et les SNP en déséquilibre de liaison (blocs haplotypiques).

Le génotypage pan-génomique des SNP peut servir aux études d'association à partir de grandes cohortes de patients ou aux analyses de liaison à partir de familles, pour localiser des polymorphismes de susceptibilité pour les maladies communes ou le gène morbide pour les pathologies monogéniques. Les technologies et la résolution des puces SNP ont considérablement évoluées ces dernières années.

Nous avons choisi le « *GeneChip® Human Mapping 500K Array Set* » commercialisé fin 2005 par Affymetrix et qui est constitué de deux puces de 250K utilisant une digestion avec deux enzymes de restriction différentes : une puce Nsp I d'environ 262 000 SNP et une puce Sty I d'environ 238 000 SNP. Les SNP ont été sélectionnés et validés selon leur fiabilité, leur localisation, et leur informativité. Sur l'ensemble de ces deux puces, la distance physique moyenne entre deux SNP est de 5,8 kb et 85% du génome est à moins de 10 kb d'un SNP. Les zones non couvertes concernent principalement les centromères.

Chaque SNP est interrogé par 6 ou 10 « quartets » de sondes (*match* et *mismatch* pour chacun de deux allèles du SNP) ce qui représente 24 ou 40 sondes différentes. Chaque sonde (oligonucléotide de 25 pb) est représentée environ 1 million de fois sur la puce dans une cellule de 5 µm (« *feature* »), et chaque puce possède au moins 6,5 millions de cellules.

Seule la puce Nsp I a été utilisée car le nombre de SNP génotypés est suffisant pour notre application d'analyse de liaison sur la famille B (Référence puce : #900768 ; kit :

#900766). Les expériences ont été réalisées par Martine Le Cunff, ingénieur de recherche dans notre équipe. Le protocole est disponible sur le site Internet d’Affymetrix, (« *GeneChip® Mapping 500K Manual* », [<http://www.affymetrix.com>]) et récapitulé en Figure 46. Le protocole expérimental est décrit brièvement ci-dessous.

La concentration et la qualité de l’ADN génomique sont évaluées par mesure de l’absorbance à 260 nm et 280 nm pour évaluer la contamination en protéines (NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies). L’ADN génomique de chaque patient (250 ng) est digéré avec l’enzyme de restriction Nsp I. Les fragments digérés de toute taille sont ligués avec des adaptateurs reconnaissant les sites de coupure Nsp I à chaque extrémité. Une « réduction de complexité » est ensuite réalisée en amplifiant par PCR les fragments, la réaction ayant été optimisée pour amplifier les fragments de 200 à 1 100 pb. Les produits d’amplification sont purifiés puis l’ADN est fragmenté, marqué et hybridé sur la puce pendant 16 heures à 49°C dans un four « GeneChip® Hybridization Oven 640 ». Les puces sont ensuite lavées et révélées grâce à la « Fluidics Station 450 ».

La lecture de la fluorescence se fait grâce au « Scanner 3000 7G » couplé au logiciel GCOS. Différents algorithmes existent pour déterminer de façon automatisée les génotypes et le score de confiance de chaque génotype individuel. Pour notre étude sur la famille B, les données ont été analysées avec l’algorithme BRLMM (*Bayesian Robust Linear Model with Mahalanobis distance classifier*) dans le logiciel GTYPE. Avec cet algorithme, la valeur qualité (« *call rate* ») doit être proche de 99%.

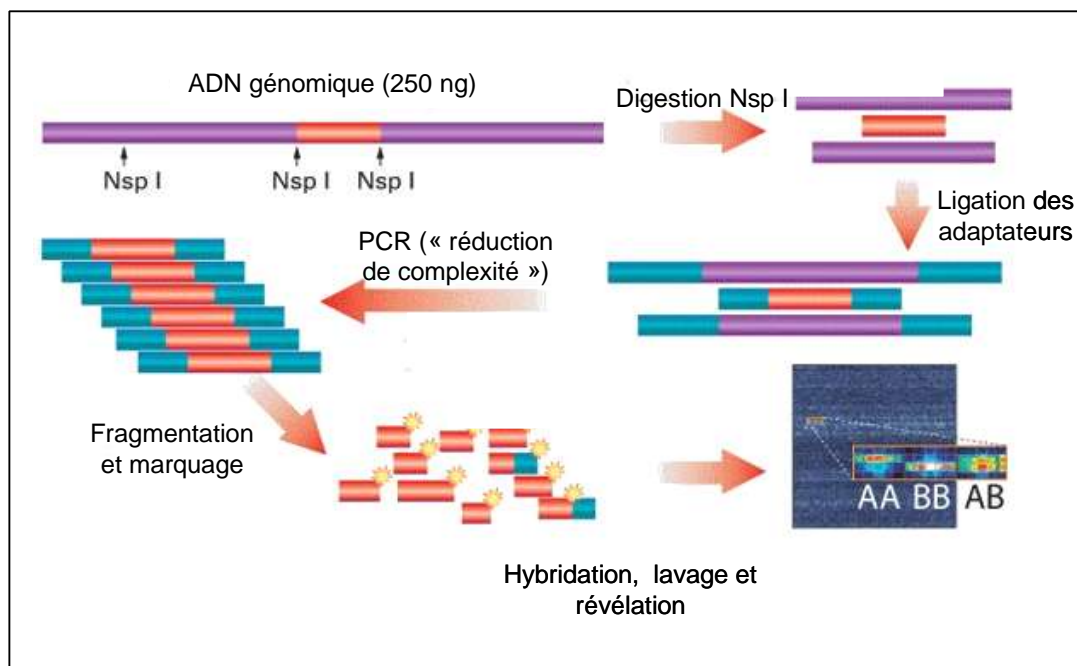


Figure 46 – Protocole de génotypage avec la puce GeneChip® 250K Nsp I

Enfin, l'ensemble des génotypes pour chaque patient est extrait en fichier texte. Les résultats sont compilés sous la forme d'un fichier par chromosome pour l'ensemble des individus. L'analyse statistique a été réalisée à Munich par Tim Strom. Les SNP présentant des génotypes incohérents (erreurs mendéliennes) ont été éliminés grâce au programme ALOHOMORA [Ruschendorf & Nurnberg, 2005] utilisant Pedcheck. Ce même programme a permis de sélectionner environ 30 000 marqueurs. Les critères de sélection étaient i) un marqueur tous les 50 000 pb, pour éviter d'analyser des marqueurs en déséquilibre de liaison et ii) une fréquence allélique minoritaire supérieure ou égale à 0,15. Une analyse multi-point avec l'algorithme Merlin [Abecasis *et al.*, 2002] a été réalisée et les résultats significatifs ont été confirmés avec Allegro [Gudbjartsson *et al.*, 2000]. La pénétrance a été fixée à 90%, la fréquence de l'allèle morbide à 0,00001 (très rare) et le taux de phénotypie à 0,01 (élevé).

II.1.2.5- Mesure statistique de la liaison génétique

Le **LOD score** (*logarithm of odds*, Z), introduit par Morton [Morton, 1955], est le logarithme décimal du rapport de la vraisemblance de la liaison sur celle de la non-liaison entre deux loci. Ainsi le *LOD score* deux-point évalue la probabilité qu'un marqueur génétique et le gène responsable de la maladie soient liés, pour une fraction de recombinaison θ .

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

Alors que l'objectif du *LOD score* deux-point est de déterminer la fraction de recombinaison entre des marqueurs génétiques individuels et le locus morbide, le but du *LOD score* multi-point est d'évaluer simultanément la position du locus morbide par rapport à un ensemble de marqueurs.

L'**approche paramétrique** prend en compte différents éléments : le modèle génétique de la maladie (mode de transmission dominant ou récessif, fréquence de l'allèle morbide, pénétrance, taux de phénotopies), les informations spécifiques à chaque famille (structure du pedigree, statut phénotypique des individus, génotypes), et les fréquences alléliques des marqueurs génotypés. Traditionnellement, on considère le marqueur significativement lié au locus morbide si Z est supérieur à 3 (1 000 chances sur 1 de liaison), et non lié si Z est inférieur à -2. Entre ces deux valeurs, le *LOD score* n'est pas significatif. Pour obtenir une exclusion ou une liaison de la région, il faudra augmenter le nombre de méioses observées, c'est-à-dire agrandir la famille, ou génotyper d'autres marqueurs proches si le marqueur est peu polymorphe. Cette méthode est assez flexible et peut tenir compte d'une pénétrance incomplète, de cas sporadiques ou non génétiques, et de l'hétérogénéité génétique.

Cependant elle est limitée lorsqu'on dispose de peu d'informations sur l'histoire naturelle de la maladie.

Pour les maladies multifactorielles, c'est-à-dire quand plusieurs gènes et facteurs environnementaux sont en cause, il est impossible de spécifier un mode de transmission. Une alternative à la puissante approche paramétrique a donc été développée : l'**approche non paramétrique**, qui s'affranchit de modèle. Brièvement, un haplotype sur-exprimé chez les atteints apparentés est attendu dans la région contenant le gène morbide, quelque soit le mode de transmission (*Identical By Descent mapping*, IBD). La stratégie classiquement utilisée est la méthode « *affected sib-pair* », les « paires de germains atteints » [Hauser & Boehnke, 1998]. L'approche non paramétrique est également utilisée pour les pathologies difficiles à étudier par les méthodes d'analyse génétique traditionnelles (pathologies d'apparition tardive, critères de diagnostic variables).

Pour les marqueurs microsatellites, les *LOD scores* paramétriques ont été calculés avec le logiciel EasyLinkage Plus v4.01 [Lindner & Hoffmann, 2005]. Les distances entre les marqueurs microsatellites sont celles de la carte génétique de Marshfield [Broman *et al.*, 1998].

II.2- Recherche de variants dans les gènes ou régions candidates

Selon l'ampleur et la problématique du projet, différentes méthodes de détection de variants sont envisageables. Le séquençage direct est utilisé en routine dans les laboratoires de recherche, et la DHPLC (chromatographie liquide à haute pression en condition dénaturante), est moins coûteuse, plus rapide, mais nécessite une mise au point et est utilisée lorsque de nombreux patients doivent être criblés. La digestion par enzyme de restriction est utilisée pour les variants déjà connus, par exemple un polymorphisme dont on veut tester la fréquence.

Pour rechercher de grands réarrangements génomiques de type délétion ou duplication, de l'ordre des kilo aux mégabases, la technique de CGH-array (*Comparative Genome Hybridization*) a été utilisée.

II.2.1- Polymorphisme ou mutation ?

Les différences communes entre le génome des individus, les **polymorphismes**, contribuent à la diversité interindividuelle. 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, *frameshift*). 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 [revue par Tabor *et al.*, 2002]. 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.

II.2.2- Protocoles de détection de mutations ponctuelles ou micro-réarrangements

II.2.2.1- Séquençage direct

La méthode utilisée est le séquençage par terminaison de chaîne (Sanger) avec le « Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit » selon les instructions du fournisseur, puis migration électrophorétique sur séquenceur automatique ABI PRISM™ 377 ou 48-capillaires 3730 DNA Analyzer. Les séquences ont été analysées avec les logiciels Sequencing Analysis v3.4 et Sequence Navigator, ou SeqScape v2.5 (Applied Biosystems) par une inspection visuelle.

II.2.2.2- DHPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*)

Dans un premier temps, les fragments sont amplifiés par une PCR classique. Si un polymorphisme hétérozygote est présent, deux types de fragments seront présents dans le produit de PCR, correspondant à l'allèle sauvage et l'allèle polymorphe (Figure 47).

Cette première étape est suivie d'une étape de dénaturation, puis renaturation lente, afin de créer des homoduplexes (allèles sauvage/sauvage et allèles muté/muté) et des hétéroduplexes contenant un « *mismatch* » au niveau du polymorphisme (allèles sauvage/muté).

La dernière étape de chromatographie, sur l'appareil Wave® System (Transgenomics), sépare les homoduplexes des hétéroduplexes à une ou plusieurs températures adaptées à

la composition de l'amplicon. L'adsorption de l'ADN chargé négativement sur la colonne greffée d'une phase stationnaire non poreuse composée de poly(styrène-divinylbenzène) alkylé, électriquement neutre et hydrophobe, est rendue possible par l'utilisation d'acétate de triéthyl ammonium (TEAA). Lorsque les hétéroduplexes et les homoduplexes sont dénaturés par la hausse de la température, la force d'interaction avec la colonne diminue et les fragments sont élués par la phase mobile composée d'acétonitrile.

Le désappariement des deux brins d'ADN entraîne un temps de rétention réduit des hétéroduplexes par rapport aux homoduplexes plus stables thermiquement, ils passent donc les premiers devant le détecteur d'UV.

Les profils sont analysés à la recherche d'hétéroduplexes, et les produits de PCR correspondant séquencés pour identifier le polymorphisme (Figure 47).

La sensibilité et la spécificité de la DHPLC est estimée supérieure à 96% [revue par Xiao & Oefner, 2001].

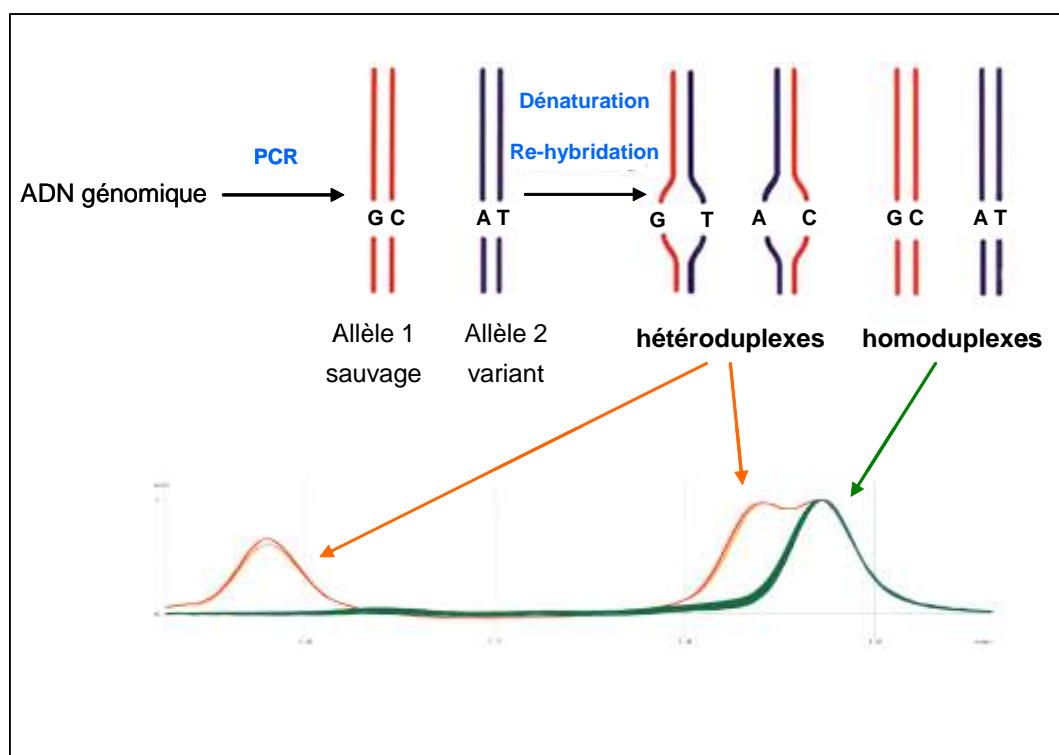


Figure 47 – Principe de la détection de variants par DHPLC

Dans cet exemple du criblage de l'exon 22 du gène ANK2 (température d'injection 59,6°C), deux patients présentaient un profil anormal (en orange et rouge) par rapport aux autres patients (en vert). Le séquençage des deux variants a mis en évidence un polymorphisme intronique hétérozygote C/T (base de référence C) en position -8 par rapport à l'exon 22.

II.2.2.3- Restriction par digestion enzymatique

Les produits de PCR (5 µl) sont digérés à une température et pendant une durée dépendantes de l'enzyme de restriction, en présence de tampon 1X, de 4 unités d'enzyme, et éventuellement de BSA 1X (New England Biolabs) dans un volume final de 15 µl.

II.2.3- Protocole de détection de réarrangements génomiques

Les expériences de CGH-array qui suivent ont été organisées, réalisées et analysées par Martine Le Cunff, ingénieur de recherche dans notre équipe.

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

Le principe est de co-hybridiser sur la puce l'ADN génomique d'un patient atteint et un ADN contrôle, tous deux marqués par des fluorochromes différents, et de rechercher des régions pour lesquelles le nombre de copies est variable entre les deux individus (Figure 48).

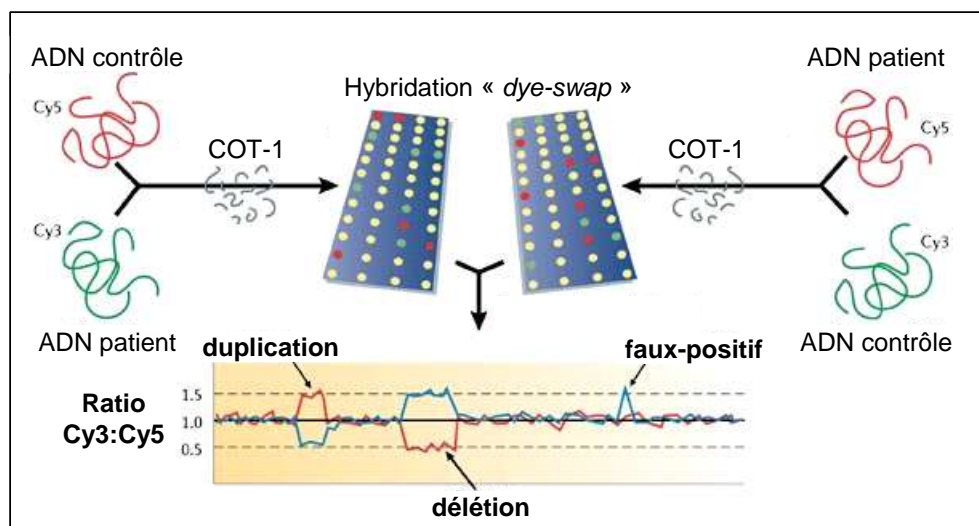


Figure 48 – Principe de la détection de réarrangements génomiques par CGH-array

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

L'utilisation de ces puces a des avantages majeurs : (i) la résolution, puisque les sondes de la puce sont des oligonucléotides 60-mer et elle permet donc de détecter de petits réarrangements par rapport aux puces utilisant des clones génomiques, (ii) l'utilisation des puces permet un criblage haut-débit des zones d'intérêt, avec la configuration pan-

génomique, ou la configuration à façon pour laquelle on choisit les sondes dans la base de données eArray (une sonde disponible toutes les 300 bases environ, <http://earray.chem.agilent.com/earray/>), (iii) la quantité d'ADN génomique requise est faible, de l'ordre de 500 ng.

Pour la recherche de réarrangements au niveau du locus du chromosome 17 de la famille Mo (syndrome de Brugada) et du gène *ANK2* de la famille Ma (syndrome ankyrine-B), une puce à façon a été confectionnée (« *Custom HD-CGH Microarrays 2 x 105K* »). Elle contenait 13 458 sondes pour le locus du chromosome 17 (5 Mb), et 4 147 sondes pour le gène *ANK2*, couvrant le gène *ANK2* et 640 kb en amont de l'exon 1 décrit dans les bases de données.

Pour compléter la recherche de variants de nombre de copie en dehors du gène *ANK2* dans le locus du chromosome 4 de la famille Ma, une puce commerciale pan-génomique a été utilisée dans un second temps. Cette puce pan-génomique contient 244 000 sondes oligonucléotidiques réparties dans les séquences codantes et non-codantes (« *Human Genome CGH Microarray 244A* ») avec une distance médiane de 8,9 kb.

Le protocole suivant décrit brièvement la procédure expérimentale. Le protocole détaillé est disponible sur le site Internet d'Agilent (« *Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis* », [<http://www.agilent.com/>]).

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

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

pour les deux patients (2 copies *versus* 2 copies, car 2 allèles). Un rapport de $\sim 1,5$ (3 copies *versus* 2 copies) ou $\sim 0,5$ (1 copie *versus* 2 copies) met en évidence un gain de copie ou perte de copie pour l'un ou l'autre des deux échantillons co-hybridés et permet donc de mettre en évidence des duplications ou des délétions.

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

II.3- Analyse transcriptionnelle : la technique de RT-PCR

II.3.1- Extraction d'ARN

Les ARN totaux sont isolés à l'aide du réactif TRIZOL (Invitrogen) puis traités à la DNase avec les kits « *RNeasy Fibrous Tissue Mini/Micro kit* » (Qiagen). La qualité des ARN totaux est évaluée par migration électrophorétique sur bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent) et la concentration est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm (NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies). Un rapport $DO_{260nm}/DO_{280nm} > 1,8$ atteste d'une faible contamination par des protéines. L'absence de contamination par l'ADN génomique est vérifiée par amplification PCR sur les ARN totaux à l'aide d'amorces introniques.

II.3.2- Transcription inverse (RT)

La synthèse de l'ADNc à partir des ARN totaux est réalisée avec le kit « *High-Capacity cDNA Archive Kit* » (Applied Biosystems) à partir de 200 ou 2 000 ng d'ARN totaux. Les ADNc sont dilués pour obtenir une concentration de 2 ng/ μ l (en équivalent ARN).

II.3.3- PCR en temps réel : quantification relative des transcrits

L'objectif est de quantifier le taux de transcrits d'un gène d'intérêt dans différents échantillons (tissus, patients...) par rapport à un gène de référence. La normalisation des données d'expression relative est réalisée par le gène de référence *HPRT1* (*hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1*), validé comme ayant le niveau d'expression le plus stable dans les tissus humains étudiés.

L'utilisation des « *TaqMan® Gene Expression Assay* » commercialisés par Applied Biosystems permet une amplification spécifique puisque chaque « *assay* » est constitué des amorces sens et antisens pour l'amplification et d'une sonde fluorescente [Heid *et al.*, 1996].

Les PCR sont réalisées en double pour chaque échantillon à partir de 10 µl d'ADNc (équivalent ARN 20 ng) dans un volume final de 25 µl comprenant du *TaqMan® Universal PCR Master Mix 1X* et 1,25 µl de sonde TaqMan®. Après 2 minutes à 50°C et 10 min à 95°C, les 40 cycles d'amplification (15 s à 95°C, 1 min à 60°C) sont réalisés dans l'appareil ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System. La fluorescence est enregistrée pour chaque cycle au cours de la PCR et les données sont collectées avec le logiciel SDS 2.1 (Applied Biosystems). Une valeur seuil est fixée dans la phase exponentielle de PCR (« *threshold* ») pour l'ensemble des échantillons, et on obtient le cycle « Ct » correspondant à chaque échantillon (Figure 49). Plus le Ct sera élevé, plus le nombre de copies d'ADNc au départ, donc la quantité de transcrit, était faible. Les ΔCt ($Ct_{\text{gène intérêt}} - Ct_{HPRT}$) puis les $2^{-\Delta Ct} \times 100$ (expression relative du gène par rapport à l'*HPRT*) sont calculés [Livak & Schmittgen, 2001].

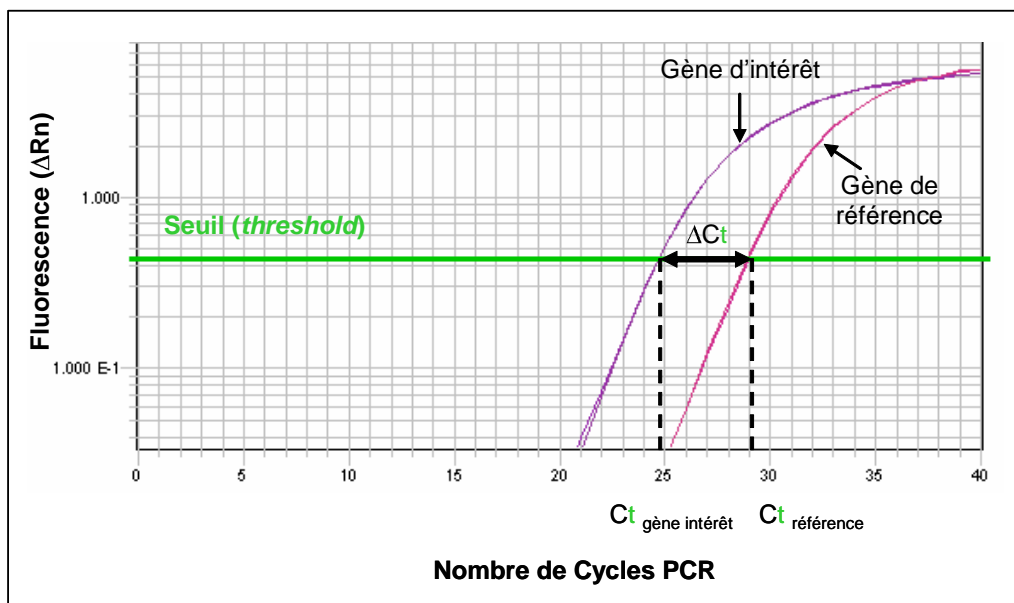


Figure 49 – Représentation schématique de la méthode du $2^{-\Delta Ct}$

II.3.4- Recherche de nouveaux exons dans le gène *ANK2*

Les amorces de PCR ont été dessinées de manière à amplifier les jonctions entre les exons décrits du gène *ANK2* dans les bases de données sur l'ADNc, avec le logiciel Primer3 [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi/]. La taille des exons décrits variant de 12 à 292 pb, les amplicons couvrent une à quatre jonctions, afin que tout le gène soit testé, et que la taille des amplicons soit compatible avec l'analyse du gel d'électrophorèse et le séquençage. Si la taille observée de la bande sur gel est différente de la taille attendue, l'ADN est isolé et séquençé puis comparé aux séquences des clones génomiques.

L'ADNc (équivalent 20 ng d'ARN) est ajouté dans un volume final de 25 µl comprenant 0,5 unité de Taq Polymerase, le tampon 1X (GE Healthcare), les amorces sens et antisens (0,2 µM, Invitrogen), et les dNTP (200 µM, Invitrogen).

La réaction d'amplification comprend une dénaturation de 2 min à 94°C, puis une amplification de 35 cycles (30 s de dénaturation à 94°C, 30 s d'appariement à la température d'hybridation des amorces, et 1 min d'élongation à 72°C), et enfin une extension finale de 10 min à 72°C, dans l'appareil GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystems).

Les produits d'amplification sont contrôlés par une électrophorèse en mini-gel d'acrylamide 6% dans du tampon TBE 1X (Invitrogen) à 140V, puis une révélation par BET (bromure d'éthidium) sous UV. Pour être isolées et séquencées, les bandes sont piquées avec un cône sur le gel et le produit est réamplifié par 30 cycles de PCR.

III-Annexe 3 : Résultats

III.1- Gènes présents dans l'intervalle de liaison de la famille Ma

Tableau 17 – Gènes situés entre les marqueurs microsatellites D4S1572 et D4S427

Gène	Protéine	Sens	Marqueur
<i>UBE2D3</i>	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC4/5 homolog, yeast)	-	■ D4S1572 (i)
<i>ZCD2</i>	zinc finger, CDGSH-type domain 2	+	
<i>LOC150159</i>	CG10806-like	-	
<i>LOC133308</i>	hypothetical protein BC009732	-	
<i>BDH2</i>	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 2	-	
<i>CENPE</i>	centromere protein E, 312kDa	-	
<i>LOC650560</i>	similar to DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3	+	
<i>TACR3</i>	tachykinin receptor 3	-	
<i>CXXC4</i>	CXXC finger 4	-	
<i>LOC728847</i>	hypothetical protein LOC728847	-	
<i>LOC391679</i>	similar to 60S ribosomal protein L6	-	
<i>LOC643675</i>	hypothetical protein LOC643675	+	
<i>KIAA1546</i>	KIAA1546	+	
<i>PPA2</i>	pyrophosphatase (inorganic) 2	-	
<i>LOC441032</i>	similar to eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	+	
<i>LOC402182</i>	hypothetical LOC402182	-	
<i>ATP5EP1</i>	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, epsilon	+	
<i>FLJ20184</i>	hypothetical protein FLJ20184	+	
<i>LOC644892</i>	similar to nucleolar protein GU2	-	
<i>INTS12</i>	integrator complex subunit 12	-	
<i>GSTCD</i>	glutathione S-transferase, C-terminal domain containing	+	
<i>NPNT</i>	Nephronectin	+	
<i>MGC16169</i>	hypothetical protein MGC16169	-	
<i>SCYE1</i>	small inducible cytokine subfamily E, member 1	+	
<i>DKK2</i>	dickkopf homolog 2 (<i>Xenopus laevis</i>)	-	
<i>RAC1P5</i>	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 pseudogene 5	+	
<i>PAPSS1</i>	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 1	-	
<i>MGC26963</i>	hypothetical protein MGC26963	+	— D4S2917
<i>CYP2U1</i>	cytochrome P450, family 2, subfamily U, polypeptide 1	+	
<i>HADHSC</i>	L-3-hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain	+	
<i>LEF1</i>	lymphoid enhancer-binding factor 1	-	
<i>LOC641518</i>	hypothetical protein LOC641518	+	
<i>LOC644993</i>	hypothetical protein LOC644993	+	
<i>LOC645003</i>	similar to ligand-gated ion channel subunit	+	
<i>LOC391681</i>	similar to exocyst complex component 7 isoform a	-	
<i>FLJ37673</i>	hypothetical protein FLJ37673	-	
<i>RPL34</i>	ribosomal protein L34	+	
<i>DC2</i>	DC2 protein	+	
<i>AGXT2L1</i>	alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1	-	
<i>COL25A1</i>	collagen, type XXV, alpha 1	-	
<i>ZCCHC23</i>	zinc finger, CCHC domain containing 23	+	
<i>SEC24B</i>	SEC24 related gene family, member B (<i>S. cerevisiae</i>)	+	
<i>MIRN576</i>	microRNA 576	+	
<i>LOC389217</i>	similar to SET protein (Phosphatase 2A inhibitor I2PP2A) 2PP2A)	-	
<i>CCDC109B</i>	coiled-coil domain containing 109B	+	
<i>CASP6</i>	caspase 6, apoptosis-related cysteine peptidase	-	
<i>PLA2G12A</i>	phospholipase A2, group XIA	-	
<i>CFI</i>	complement factor I	-	
<i>NOLA1</i>	nucleolar protein family A, member 1 (H/ACA small nucleolar RNPs)	+	
<i>RRH</i>	retinal pigment epithelium-derived rhodopsin homolog	+	
<i>FLJ44691</i>	FLJ44691 protein	+	
<i>LOC442114</i>	similar to keratin 19	-	
<i>EGF</i>	epidermal growth factor (beta-urogastrone)	+	
<i>ELOVL6</i>	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids	-	
<i>LOC132707</i>	similar to Zinc finger BED domain containing protein 1 (dREF homolog)	+	
<i>LOC645145</i>	similar to Zinc finger BED domain containing protein 1 (dREF homolog)	+	
<i>ENPEP</i>	glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A)	+	
<i>PITX2</i>	paired-like homeodomain transcription factor 2	-	
<i>LOC729065</i>	hypothetical protein LOC729065	+	

LOC391686	similar to Acyl-protein thioesterase 1 (Lysophospholipase I)	-	D4S1616
LOC729075	similar to large subunit ribosomal protein L36a	+	
LOC132719	similar to tubulin, beta 8	+	
LOC402184	similar to ribosomal protein S12	-	
FLJ39370	hypothetical protein FLJ39370	+	
C4orf16	chromosome 4 open reading frame 16	+	
TIFA	TRAF-interacting protein with a forkhead-associated domain	-	
LOC645237	similar to regulator of telomere elongation helicase 1 isoform 2	+	
ALPK1	alpha-kinase 1	+	
LOC285412	similar to Epidermal Langerhans cell protein LCP1	+	
NEUROG2	neurogenin 2	-	
LOC91431	prematurely terminated mRNA decay factor-like	-	
LOC728914	similar to H3 histone, family 3B	+	
C4orf21	chromosome 4 open reading frame 21	-	
LARP7	La ribonucleoprotein domain family, member 7	+	
MIRN367	microRNA 367	-	
MIRN302D	microRNA 302d	-	
MIRN302A	microRNA 302a	-	
MIRN302C	microRNA 302c	-	
MIRN302B	microRNA 302b	-	
LOC645264	similar to DC2 protein	+	
LOC256085	similar to Tryptophan-rich protein (Congenital heart disease 5 protein)	-	
LOC441034	similar to 60S ribosomal protein L7a	-	
LOC391689	similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (HDP)	-	
ANK2	ankyrin 2, neuronal	+	D4S2937 (i)
LOC728937	similar to 40S ribosomal protein S26	-	
CAMK2D	calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II delta	-	
ARSJ	arylsulfatase family, member J	-	
UGT8	UDP glycosyltransferase 8 (UDP-galactose ceramide	+	
MIRN577	microRNA 577	+	
NDST4	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 4	-	
MRPS33P3	mitochondrial ribosomal protein S33 pseudogene 3	+	
LOC132391	similar to Keratin, type I cytoskeletal 18 (Cytokeratin-18) (CK-18)	+	D4S1580
LOC645368	similar to eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 12	-	
LOC344978	similar to actinin, alpha 4	+	
TRAM1L1	translocation associated membrane protein 1-like 1	-	
NT5C3P1	5'-nucleotidase, cytosolic III pseudogene 1	-	
NDST3	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 3	+	
SNORA24	small nucleolar RNA, H/ACA box 24	+	
PRSS12	protease, serine, 12 (neurotrypsin, motopsin)	-	
CEP170L	centrosomal protein 170kDa-like	+	
LOC729218	hypothetical protein LOC729218	+	
LOC729010	hypothetical protein LOC729010	+	
LOC729021	hypothetical protein LOC729021	+	
LOC729227	hypothetical protein LOC729227	+	
KIAA1627	KIAA1627 protein	+	
SEC24D	SEC24 related gene family, member D (S. cerevisiae)	-	
SYNPO2	synaptopodin 2	+	
MYOZ2	myozenin 2	+	
MRPL42P1	mitochondrial ribosomal protein L42 pseudogene 1	-	
USP53	ubiquitin specific peptidase 53	+	
LOC401152	HCV F-transactivated protein 1	-	
FABP2	fatty acid binding protein 2, intestinal	-	
LOC729249	similar to kelch-like 2, Mayven; mayven; kelch (Drosophila)-like 2	+	
LOC201989	glycerol kinase pseudogene	-	
FLJ14186	hypothetical gene supported by AK024248; AL137733	-	
LOC645513	similar to septin 7	+	
PDE5A	phosphodiesterase 5A, cGMP-specific	-	
MAD2L1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	-	
SAR1P3	SAR1 gene homolog (S. cerevisiae) pseudogene 3	+	D4S427

Liste des 119 « gènes » selon Map Viewer Build 36 (NCBI), Mars 2008. (i) : marqueur intragénique.
 En grisé : Gènes séquencés chez le propositus de la famille Ma.

III.2- Séquences des nouveaux exons du gène *ANK2*

Tableau 18, page 211.

III.3- Séquences des régions introniques conservées du gène *ANK2*

Tableau 19, page 212.

III.4- Variants identifiés par le criblage du gène *ANK2*

Tableau 20, page 214.

Tableau 18 – Séquences nucléotidiques et protéiques prédites des nouveaux exons cardiaques du gène ANK2 humain

Exon	Transcrit NCBI (tissu)	Taille (pb)	Présence tissu	Séquence nucléotidique	Séquence protéique prédite
-1	AK095596 (cerveau foetal), BX537758 (rétine)	ND	<u>Oui</u> : cœur	<i>(N)ACAGTCTGAGGCTGTAATGGGAAAGTCGGTTCCTGGGCTGCTGTCTCATAGACATCAGCTTGACAGGGAAGCTGGGGGCTCTCCGAATTGCCCTGCTCCGGGGCCCCTCCTGCTGCGTGACTCACAGGCACATTGCAGAGAGAAGCTGCCGCTCCCA</i>	non codant
1bis	AK095596 (cerveau foetal), BX537758 (rétine)	60	<u>Oui</u> : cœur	<i>GTAAGTAATGAAAAGAGACATGAAGAATTGGTATTTCAAATGACCACCATGTTGCAAAAAG</i>	MTTMLQK
23bis	-	54	<u>Oui</u> : cœur	CTCTTAAACAGTTTGGTGACCACTTTATTGATGGGGAGGCACTTAGTGATTCAG	ALKQFGDHFIDGEALS
26bis	BX537758 (rétine)	36	<u>Oui</u> : cœur, M sq ; <u>Non</u> : poumon, pancreas, rein	CCGCGCCTCTCCATGTCTTGAACGTGACAACAGCAG	RASPCLERDNSS
43bis	BC125235, BC125236 (ND), BX538132 (uterus)	93	<u>Oui</u> : cœur, poumon <u>Non</u> : foie	<i>GAGCTAACAGAGGAATTAGGGGAGCTGGAGGCCAGCTCAGATGAGGAGGCGATGGTAACTACCAGGGTTGTCCCGCGGAGTGATTATTCAG</i>	ELTEELGELEASSDEEAM VTTRVRRRRIIQ
45bis	DQ925693 (m sq), BX538132 (uterus)	183	<u>Oui</u> : cœur, placenta, lymphocytes, foie, poumon, pancreas, rein, M sq	<i>GTCACCTTTGTGTGAGCCCAGCATTGTTGTCAGTACCTCACAATTTTCAGGCTGAGCCAGTGGAAAGCCGTAGAGTCAGCAAAGTTGTTAAAACAAGTGTGGTACTTGGAGAGGATGGAGAAACATCTGGGGGATTCTAGTTTAGCCACTGATCTTCCTTCAGCCAAAGATGACTTTGAAGAG</i>	VTLCEPSILSSTSQFQAEP VEGRRVSKVVKTTVVLGE RMEKHLGDSSLATDLPSA KDDFEE
45ter	DQ925692, DQ925693 (m sq)	92	<u>Oui</u> : cœur, M sq ; <u>Non</u> : lymphocytes, placenta, pancreas, rein	<i>GCTTTGAGTTACACAGGTAGCCACATGAAAGTCCACTTACCCAGTTTAGTAGAGAAATGAAATCCTGAAAGAGGATGGATCAATAATTAAG</i>	ALSYTGSHMKVHLPSLVE NEILKEDGSIIR
46bis (si 45ter)	<i>frameshift</i>	181	-	GACAACAATGAGTAAAGCCATCACACAGAAGAGGGCTGTGGTGAAGGACCAGCATGGAAAACGCATTGACTTGGAGCACCTGGAGGATGTACCAGAAGCACTAGAC CAGGACGACCTCCAGCGCATCTCCAGCAGCTCCTTCGGCATTCTGCAAGGAGGACTTGAAGCAAGAGGCCAAG	TTMSKAITQKRAVVKDQH GKRIDLEHLEDVPEALDQD DLQRDLQQLLRHFCKEDL KQEA

En italique : Séquence a priori non traduite. *En gras* : Base d'un codon ou acide aminé chevauchant avec un autre exon. La séquence en 5' de l'exon -1 n'a pas été déterminée. Les séquences des nouveaux exons ont été « blastées » (NCBI) et les numéros d'accension des ARN humains contenant ces exons sont indiqués. La présence de ces exons dans différents tissus humains a été testée par RT-PCR. ND : Non déterminée, M sq : Muscle squelettique.

Tableau 19 – Séquences nucléotidiques humaines des régions introniques conservées du gène *ANK2*

Nom	Séquence nucléotidique humaine	Clone génomique	Identité > 75% avec
ECR-A	CAACATGGAGACTTTGTACCGTGTCCCATTCTTAGTGCTTAAATGTCCCAACCTGAAGCTGAAGAAGCCGCCCTGGC TGCACATACCATCGGCCATGACTGTGTATGCTCTGGTGACGGTATCTTACTTCCTCATCACTGGAGGAATAATTTATG TTGTTATTGTTGAACCTCCAAGTGTGGCTCTATGACTGATGAACATGGGTATCAGAGGCCAGTACCTTTCTTGGTCTA CAGGGTAAATGGACAATATATTATGGAACGACTTGCATCCAGCTTCTGTTTACCATGGGAGGTTAAGTTTCATAAT CCTGGACCCATTGAGTGCACCAAAGATCCCCAACTCAATAGATTTCTTCTTAGTCATTGGATTTGTCTGTCTCT ATTAATTTTTTTCATGGCTGGAGTATTCATGAGAATGAACTGCCG	AC106864	<i>frog</i>
ECR-B	ATTTAACCCAGTTTAGTGGCAAGTCTTTAGCCTTTGCTTTTTGAGCTTGGCAATGCGAGCCACAGACTTAGGACCC AGGATGTTGCCACCCAGTGACGGCAGATCTCATCGTATCTGTCAATTGTCCTGATAGCTTCCACCAGCTTA GCCAAAGCGCCTTTGTCTTCCGAGTTCACCTGTGTGAAGGCGACAGTGGTGCAGGCTTCCCTGTGGACGAGACGTC CCAGTCTTGCTTCCCTCTTGATAATGACTAAGGGACCACATTTTACGACATAGGGCAGGCAAGAAGACAGCCAGC TCGATGGGATCCACGTCGGGTGCAATCACCACCAGCTGAGCTTTCTTGTCTCCACCAAGGTGGTGACGGTGTAAAC TCCTGCTCAAAGGACAGGTGGTCTCTTGGTGGGGACGTCCCCTTTGCCAGCAGCTTTCTTCTCGGCCTGGGCCAAC AGCCTTCTTCTCTTGTCTTGTCTCTGGTCTGTACTTGTGGGCCAGCTTAAAGCAGCTGAGTAGCTGTTTGGCGGTCCA GGGCCTGGGTGAACCTGGTTAATCGCAGGAGGCATTTTCAGCCGCTTATAGAGGATGGCTCTCTGCTGCTGCAACCT GATATAGCGGGGCCATTTACAAAGCGGGTGAAGTCTCTTTTGGGCTGGATGTCTGTCCAATGCCAAAATTTCTTAG GCCTTTCTCAAACAGGGGATTACCACTTTCTTAGCCTCCTGCTTCTTACGACAGCAGGGGCCGGAGCCACCTTC TTCCCTTGGCCTTCTTCTTTCAGCATCTTGGGCTGCC	AC017007	<i>frog</i> <i>zebrafish</i> <i>fugu</i> <i>chicken</i>
ECR-C	AGACTGCACCATTTTCTTCTCACCCCTGCATAGAGGTGTGGTTGGAAGCAGCAATAAACTACCCACCCCTAGCAGTT TCACAGAGGTGGCCTCTTCTTGGCTCCAGTCAGAAGACACAGTCTGTCTGGAGGAGTCCCCAAAGACTGTTCCAATT GGTGATGTGTGCTAAGGATGGCTTTTTCACTAGTNNNNAAAATGGCTCACGCTGCTGCTTCTATTAATAAAGTTTCG AGAGGCTGATCTGGATGAAAAGGAAAAAATCTTGAGAGAGACAGAAAAAACAACGGAAAATCCCCAGAGAA	AC093879	<i>frog</i> <i>chicken</i>
ECR-D	AGAGACAGAGAAGAGGGAAATAGAAAGATTCAAAGGCATTCATTGAGTAATGCAAAAATTCTCATATGTAGAGACATT TTACCCAGCAGGAACCTTAAGTCCATGTGTGAGGCANNNNACTCCATTGACATGCATAGCTGGCCTGGTAGGTGTA AATAGACTGGCAGCGCCTGCACTGGAAATGGTCACTGAATGCAGCCTGCAGTTGCCGGGGGTTTTGAGTTCTCTCT GACACCAGCAAGCCAGCTAGCAGATGGG	AC093617	<i>frog</i> <i>chicken</i>
ECR-E	AGGTCTAAATCGGGGTGGGGGTGTTCCGGTCTTGGGGCTTTCAGGATCGATTCCCTGACTACTTTGCTGTGAATTG CACAACCTCACACAGTAATGTAGCTTTCACATACAGCTTGGGAAGCACATAGGCATCGAAGACGCTCGCTTCAGAAATG TCCCTGACTGCTGCGGCCTCCACTATGTTTGAATGACGAATTTCTTAATGGCCTTGTCTTGGGCACGCATCGGGC ACAGTTAGTGCAGCGAATAGGCTGCACGTGGCCGCGGCCCTTTTTGGCAGCACCATGTTCTTCTTTTCTTTGTC	AC004057	<i>zebrafish</i>
ECR-F	CCTCAGCATCACGGCTGCCCTCAGACCCGTTGTGAAGCCCAAGATCATTAAAAAGAGAACCAAGAAGTTCATCCGGC ACCAGTCAGACCCATATGTCAAAATGAAGCGTAACTGGTGGAAACCCAGAGGTATTGACAACAGGGTTCATAGAAGG TTCAAGGCCAGATCTTGATGCCAACATTGGTTATGGGAGCAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACA CAAAAAACAAGCACATGCTGCTAGTGGCTTCCGCAAGTTCCTGGTCCAGAATCAAGGAGCTGGAAGTGTGCTG ATGTGCAACAATCTTACTGTGCTGAGGTGCTCACAAAAACCAAGAACCAGCAAGCCATCATGGAAAGTCTGTCC AGCTGGCCATCAGAGTCACCAACCCCAATGCCAGGCTGTGCAGCAAAGAAAATGAATAGATAGCT	AC017007	<i>chicken</i>
ECR-G	CACTCTTTGAGGTCTTGGGTGCCTTTAACCGATTCCATTTAGGCAGAAAGCACAAGCAAATATCTCTTGTGTAACA AAGCAACAATTTAAGTTAATGCTAATGTGTTACAGCCAGAGCCAAAAGTTTTTCAGGGTTATTATAACACACTGGG CTCTCAGCCCATCCATCTAAATGTCCAAAGTACACTAAAGTTATGGATTGGCCCATTTGTATATACC	AC017007	<i>chicken</i>

ECR-H	ATGCCAGTGAACACCATAATACCTACCAGTCAGTTTCTTCCATCTTCTGTTCTAAAGCAAATTA AAATTCTGTTGCTTCAAGCATCTTCTACTCAAAAAATAAAGTAAAAGAGAATGGAACAATATGCTTCAGGGATGAAGA TGACATCAATGATGTGACTTCTATGGCAGGGGTCAACCTTAATGAAGAAAATGCCTGTGTCTTAGCAACAAACTCTGA ATTGGTTGGCACACTCATTAGTCATGTAAGATGAACCAATTTCTTTTTATTGGAGTTCTACAAAAGAGAAATTTAGAC ATTGGTAAAAAGCATGACATTACAGAACTTAAGTGGTGTGAACTTGATCACCCATGCAACACAGGAAAAATTATG AAGCCTTCTAGAAAACTGACTGCAATTGCTCAGCATTGAATGACTACTTACAAGGCAAGTGAATAATTACATCCTGTG TAGTGATACCAGGTCACACCTCAAATTTCTTAAAAGCTGGATCAATTGGAGAAGCAGAGAAAGGATTTAGAAGAAAG AGAAATGTTACTTAAGGCAGCCAAGAGTCATTGTAATAAAGAAGATCCAGAACAGCTGAGATTAAGCAGAAAGCCAA TGAGTTACAGCAACTGGAACCTTGAACAGATACAGCATAGAGATGCTAATCTCACAGCTCTTGCAGCTATTGGACCAA GGAAGAAGAGACCACTAGA	AC017007	chicken
ECR-I	TAATCCACTGCCTACAACATGACAAATGTTTTGGTCCAAGTTGAATGGCGAAGTCTTTTCAAACAGGGAAAGCAGTT GTCAGCTGTCCTTGTGTGGTACCAACATGTATCATG	AC017007	chicken
ECR-J	TGGAAAGAGGCCAGGAGACCCATCTGCTGGGAGTTTGTCTTTCTAAATTGGGTGCAGTGGGTAGTGCTGAGGGGAA ATGACACACCTCTTATGAATATTTTCATGAAC	AC093879	chicken
ECR-K	TTCATCTAAGCATTCACTTTCTTTTGACATTCTTGTTAACCTGGTATTGCTGTTATGCTTGTGTTAGAAACCCACCCTAC CGTTTTGTCCATTTGTT	AC093900	chicken
ECR-L	TTCCCTCCTTGGTCTGTCCATTCTGTGTCTAAACAAGGAGTTGCTCCAAGGAAAGGACCATGCCTCGTAGCACCA GACTGTTTGTTCATTGTTAGGTGTGAATTTCCCTTAGATGAAATGCCGGTTTGCAGCTGATTCAGATGTATTTTATAT AGTCTTTGTATATTGGTAGAACTAAACATACTGAATTTTCAGACTTTTATATGATTAATAAATGTATATACATCATTAGATG TTATTCTGAGCTTGCTACTACTGGCTTTCTCCTAGAGGAAATCAACTTTCTGCAATTTCTAATGCTTTTTTTCTTATTTT TTCTCAT	AC093900	chicken

Tableau 20 - Variants introniques et exoniques identifiés par le criblage du gène ANK2 sur 47 patients « Brugada » (exons 13 à 23) et 282 patients « arythmies » (exons 35 à 46)

Exon	Base de référence→Variation ; Protéine	dbSNP (NCBI)	Type (position par rapport à l'exon)	Fréquence
13	G→A	-	intronique (-36)	1/47 (H)
14	A1401G ; A467A	-	exonique, synonyme	1/47 (h)
21	C→T	-	intronique (-21)	2/47 (H)
	C2337T ; V779V	-	exonique, synonyme	1/47 (H)
	C→T	-	intronique (+35)	2/47 (H)
22	C→T	-	intronique (-8)	2/47 (H)
36	T→C	-	intronique (-12)	1/282 (H)
40	C→T	rs35728190	intronique (+20)	52/282 (H) ; 7/282 (h)
41	T→A	-	intronique (-16)	6/282 (H)
44	A5274G ; E1758E	-	exonique, synonyme	1/282 (H)
	T5319C ; H1773H	rs2293324	exonique, synonyme	85/282 (H) ; 1/282 (h)
45	C5436T ; I1812I	-	exonique, synonyme	1/282 (H)
45bis*	C→T	-	intronique (-10)	3/282 (H)
	A→G	-	intronique (-5)	1/282 (H)
45ter*	TTGT→Δ	rs34564840	intronique (-55-58)	51/282 (H)
	G→A, 16 ^e base ; G→S	-	exonique, faux-sens	1/282 (H)
	A→C	rs17483231	intronique (+10)	51/282 (H)
46bis*	T→G	-	Intronique (-18)	1/282 (H)
	C→T, 22 ^e base ; I→I	-	exonique, silencieux	8/282 (H)
	G→A, 125 ^e base ; D→N	-	exonique, faux-sens	1/282 (H)

H : Hétérozygote, *h* : Homozygote. Variants numérotés par rapport à une séquence ne comportant pas les exons 28 et 38. Les variants faux-sens des nouveaux exons 45ter et 46bis n'ont pas été trouvés chez 78 contrôles. Les deux polymorphismes introniques de l'exon 45ter (rs34564840 et rs17483231) semblent être en déséquilibre de liaison.

Les exons marqués d'un * correspondent aux nouveaux exons décrits en partie C-II.1.1.3.1, page 65, Tableau 18, page 211. L'exon 45ter produit un décalage du cadre de lecture qui conduit à un exon 46 plus long (46bis).

G- Références bibliographiques

- Aarnoudse AJ, Newton-Cheh C, de Bakker PI, Straus SM, Kors JA, Hofman A, Uitterlinden AG, Witteman JC, Stricker BH. Common NOS1AP Variants Are Associated With a Prolonged QTc Interval in the Rotterdam Study. *Circulation*. **2007**. 116(1):10-6.
- Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SA. MiRP1 Forms IKr Potassium Channels With HERG and Is Associated With Cardiac Arrhythmia. *Cell*. **1999**. 97(2):175-87.
- Abdi KM, Mohler PJ, Davis JQ, Bennett V. Isoform Specificity of Ankyrin-B: a Site in the Divergent C-Terminal Domain Is Required for Intramolecular Association. *J Biol Chem*. **2006**. 281(9):5741-9.
- Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, Cardon LR. Merlin--Rapid Analysis of Dense Genetic Maps Using Sparse Gene Flow Trees. *Nat Genet*. **2002**. 30(1):97-101.
- Abelson JF, Kwan KY, O'Roak BJ, Baek DY, Stillman AA, Morgan TM, Mathews CA, Pauls DL, Rasin MR, Gunel M, Davis NR, Ercan-Sencicek AG, Guez DH, Spertus JA, Leckman JF, Dure LS, Kurlan R, Singer HS, Gilbert DL, Farhi A, Louvi A, Lifton RP, Sestan N, State MW. Sequence Variants in SLITRK1 Are Associated With Tourette's Syndrome. *Science*. **2005**. 310(5746):317-20.
- Abriel H. Roles and Regulation of the Cardiac Sodium Channel Na(v)1.5: Recent Insights From Experimental Studies. *Cardiovasc Res*. **2007**.
- Abriel H & Kass RS. Regulation of the Voltage-Gated Cardiac Sodium Channel Nav1.5 by Interacting Proteins. *Trends Cardiovasc Med*. **2005**. 15(1):35-40.
- Ackerman MJ, Splawski I, Makielski JC, Tester DJ, Will ML, Timothy KW, Keating MT, Jones G, Chadha M, Burrow CR, Stephens JC, Xu C, Judson R, Curran ME. Spectrum and Prevalence of Cardiac Sodium Channel Variants Among Black, White, Asian, and Hispanic Individuals: Implications for Arrhythmogenic Susceptibility and Brugada/Long QT Syndrome Genetic Testing. *Heart Rhythm*. **2004**. 1(5):600-7.
- Aiba T, Shimizu W, Hidaka I, Uemura K, Noda T, Zheng C, Kamiya A, Inagaki M, Sugimachi M, Sunagawa K. Cellular Basis for Trigger and Maintenance of Ventricular Fibrillation in the Brugada Syndrome Model: High-Resolution Optical Mapping Study. *J Am Coll Cardiol*. **2006**. 47(10):2074-85.
- Akai J, Makita N, Sakurada H, Shirai N, Ueda K, Kitabatake A, Nakazawa K, Kimura A, Hiraoka M. A Novel SCN5A Mutation Associated With Idiopathic Ventricular Fibrillation Without Typical ECG Findings of Brugada Syndrome. *FEBS Lett*. **2000**. 479(1-2):29-34.
- Albert CM, Nam EG, Rimm EB, Jin HW, Hajjar RJ, Hunter DJ, MacRae CA, Ellinor PT. Cardiac Sodium Channel Gene Variants and Sudden Cardiac Death in Women. *Circulation*. **2008**. 117(1):16-23.
- Allessie MA. Is Atrial Fibrillation Sometimes a Genetic Disease? *N Engl J Med*. **1997**. 336(13):950-2.
- Allouis M. Approches Génétiques Et Moléculaires Des Pathologies Du Rythme Cardiaque. *Thèse De Doctorat, Université De Nantes*. **2005**.
- Allouis M, Le Bouffant F, Wilders R, Peroz D, Schott JJ, Noireaud J, Le Marec H, Merot J, Escande D, Baro I. 14-3-3 Is a Regulator of the Cardiac Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.5. *Circ Res*. **2006**. 98(12):1538-46.
- Amiel J, Rio M, de Pontual L, Redon R, Malan V, Boddaert N, Plouin P, Carter NP, Lyonnet S, Munnich A, Colleaux L. Mutations in TCF4, Encoding a Class I Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor, Are Responsible for Pitt-Hopkins Syndrome, a Severe Epileptic Encephalopathy Associated With Autonomic Dysfunction. *Am J Hum Genet*. **2007**. 80(5):988-93.
- 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(3):663-8.
- Andersen ED, Krasilnikoff PA, Overvad H. Intermittent Muscular Weakness, Extrasystoles, and Multiple Developmental Anomalies. A New Syndrome? *Acta Paediatr Scand*. **1971**. 60(5):559-64.
- Antzelevitch C. The Brugada Syndrome: Ionic Basis and Arrhythmia Mechanisms. *J Cardiovasc Electrophysiol*. **2001**. 12(2):268-72.
- Antzelevitch C. Androgens and Male Predominance of the Brugada Syndrome Phenotype. *Pacing Clin Electrophysiol*. **2003**. 26(7 Pt 1):1429-31.

- Antzelevitch C. Brugada Syndrome. *Pacing Clin Electrophysiol.* **2006.** 29(10):1130-59.
- Antzelevitch C, Brugada P, Borggrefe M, Brugada J, Brugada R, Corrado D, Gussak I, Le Marec 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(5):659-70.
- Antzelevitch C, Pollevick GD, Cordeiro JM, Casis O, Sanguinetti MC, Aizawa Y, Guerchicoff A, Pfeiffer R, Oliva A, Wollnik B, Gelber P, Bonaros EP, Jr., Burashnikov E, Wu Y, Sargent JD, Schickel S, Oberheiden R, Bhatia A, Hsu LF, Haissaguerre M, Schimpf R, Borggrefe M, Wolpert C. Loss-of-Function Mutations in the Cardiac Calcium Channel Underlie a New Clinical Entity Characterized by ST-Segment Elevation, Short QT Intervals, and Sudden Cardiac Death. *Circulation.* **2007.** 115(4):442-9.
- Ardlie KG, Kruglyak L, Seielstad M. Patterns of Linkage Disequilibrium in the Human Genome. *Nat Rev Genet.* **2002.** 3(4):299-309.
- Arking DE, Chugh SS, Chakravarti A, Spooner PM. Genomics in Sudden Cardiac Death. *Circ Res.* **2004.** 94(6):712-23.
- Arking DE, Pfeufer A, Post W, Kao WH, Newton-Cheh C, Ikeda M, West K, Kashuk C, Akyol M, Perz S, Jalilzadeh S, Illig T, Gieger C, Guo CY, Larson MG, Wichmann HE, Marban E, O'Donnell CJ, Hirschhorn JN, Kaab S, Spooner PM, Meitinger T, Chakravarti A. A Common Genetic Variant in the NOS1 Regulator NOS1AP Modulates Cardiac Repolarization. *Nat Genet.* **2006.** 38(6):644-51.
- Arnar DO, Thorvaldsson S, Manolio TA, Thorgeirsson G, Kristjansson K, Hakonarson H, Stefansson K. Familial Aggregation of Atrial Fibrillation in Iceland. *Eur Heart J.* **2006.** 27(6):708-12.
- Aronow WS. Valvular Aortic Stenosis in the Elderly. *Cardiol Rev.* **2007.** 15(5):217-25.
- Aronow WS, Ahn C, Kronzon I, Goldman ME. Association of Coronary Risk Factors and Use of Statins With Progression of Mild Valvular Aortic Stenosis in Older Persons. *Am J Cardiol.* **2001.** 88(6):693-5.
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. *Science.* **1999.** 284(5415):770-6.
- Aulchenko YS, Vaessen N, Heutink P, Pullen J, Snijders PJ, Hofman A, Sandkuijl LA, Houwing-Duistermaat JJ, Edwards M, Bennett S, Oostra BA, van Duijn CM. A Genome-Wide Search for Genes Involved in Type 2 Diabetes in a Recently Genetically Isolated Population From the Netherlands. *Diabetes.* **2003.** 52(12):3001-4.
- Balsler JR. Structure and Function of the Cardiac Sodium Channels. *Cardiovasc Res.* **1999.** 42(2):327-38.
- Barlund M, Tirkkonen M, Forozan F, Tanner MM, Kallioniemi O, Kallioniemi A. Increased Copy Number at 17q22-Q24 by CGH in Breast Cancer Is Due to High-Level Amplification of Two Separate Regions. *Genes Chromosomes Cancer.* **1997.** 20(4):372-6.
- Beck GR, Zerler B, Moran E. Phosphate Is a Specific Signal for Induction of Osteopontin Gene Expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2000.** 97(15):8352-7.
- Belhassen B, Glick A, Viskin S. Efficacy of Quinidine in High-Risk Patients With Brugada Syndrome. *Circulation.* **2004.** 110(13):1731-7.
- Bella JN, Tang W, Kraja A, Rao DC, Hunt SC, Miller MB, Palmieri V, Roman MJ, Kitzman DW, Oberman A, Devereux RB, Arnett DK. Genome-Wide Linkage Mapping for Valve Calcification Susceptibility Loci in Hypertensive Sibships: the Hypertension Genetic Epidemiology Network Study. *Hypertension.* **2007.** 49(3):453-60.
- Bellamy MF, Pellikka PA, Klarich KW, Tajik AJ, Enriquez-Sarano M. Association of Cholesterol Levels, Hydroxymethylglutaryl Coenzyme-A Reductase Inhibitor Treatment, and Progression of Aortic Stenosis in the Community. *J Am Coll Cardiol.* **2002.** 40(10):1723-30.
- Belloq C, van Ginneken AC, Bezzina CR, Alders M, Escande D, Mannens MM, Baro I, Wilde AA. Mutation in the KCNQ1 Gene Leading to the Short QT-Interval Syndrome. *Circulation.* **2004.** 109(20):2394-7.
- Bennett V & Baines AJ. Spectrin and Ankyrin-Based Pathways: Metazoan Inventions for Integrating Cells into Tissues. *Physiol Rev.* **2001.** 81(3):1353-92.

- Bennett V & Chen L. Ankyrins and Cellular Targeting of Diverse Membrane Proteins to Physiological Sites. *Curr Opin Cell Biol.* **2001**. 13(1):61-7.
- Bennett V & Stenbuck PJ. Identification and Partial Purification of Ankyrin, the High Affinity Membrane Attachment Site for Human Erythrocyte Spectrin. *J Biol Chem.* **1979**. 254(7):2533-41.
- Benson DW. Genetics of Atrioventricular Conduction Disease in Humans. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* **2004**. 280(2):934-9.
- Benson DW, Wang DW, Dymont 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(7):1019-28.
- Beppu S, Suzuki S, Matsuda H, Ohmori F, Nagata S, Miyatake K. Rapidity of Progression of Aortic Stenosis in Patients With Congenital Bicuspid Aortic Valves. *Am J Cardiol.* **1993**. 71(4):322-7.
- Bergler-Klein J, Klaar U, Heger M, Rosenhek R, Mundigler G, Gabriel H, Binder T, Pacher R, Maurer G, Baumgartner H. Natriuretic Peptides Predict Symptom-Free Survival and Postoperative Outcome in Severe Aortic Stenosis. *Circulation.* **2004**. 109(19):2302-8.
- Bergler-Klein J, Mundigler G, Pibarot P, Burwash IG, Dumesnil JG, Blais C, Fuchs C, Mohty D, Beanlands RS, Hachicha Z, Walter-Publig N, Rader F, Baumgartner H. B-Type Natriuretic Peptide in Low-Flow, Low-Gradient Aortic Stenosis: Relationship to Hemodynamics and Clinical Outcome: Results From the Multicenter Truly or Pseudo-Severe Aortic Stenosis (TOPAS) Study. *Circulation.* **2007**. 115(22):2848-55.
- Bernal O & Moro C. [Cardiac Arrhythmias in Women]. *Rev Esp Cardiol.* **2006**. 59(6):609-18.
- Bezzina C, Veldkamp MW, van den Berg MP, Postma AV, Rook MB, Viersma JW, Van Langen IM, Tan-Sindhunata G, Bink-Boelkens MT, Der Hout AH, Mannens MM, Wilde AA. A Single Na(+) Channel Mutation Causing Both Long-QT and Brugada Syndromes. *Circ Res.* **1999**. 85(12):1206-13.
- Bezzina CR, Rook MB, Groenewegen WA, Herfst LJ, van der Wal AC, Lam J, Jongasma 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(2):159-68.
- Bezzina CR, Shimizu W, Yang P, Koopmann TT, Tanck MW, Miyamoto Y, Kamakura S, Roden DM, Wilde AA. Common Sodium Channel Promoter Haplotype in Asian Subjects Underlies Variability in Cardiac Conduction. *Circulation.* **2006**. 113(3):338-44.
- Bhasin N, Cunha SR, Mudannayake M, Gigena MS, Rogers TB, Mohler PJ. Molecular Basis for PP2A Regulatory Subunit B56alpha Targeting in Cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2007**. 293(1):H109-H119.
- Bhuiyan ZA, Hamdan MA, Shamsi ET, Postma AV, Mannens MM, Wilde AA, Al Gazali L. A Novel Early Onset Lethal Form of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia Maps to Chromosome 7p14-P22. *J Cardiovasc Electrophysiol.* **2007a**. 18(10):1060-6.
- Bhuiyan ZA, van den Berg MP, van Tintelen JP, Bink-Boelkens MT, Wiesfeld AC, Alders M, Postma AV, van L, I, Mannens MM, Wilde AA. Expanding Spectrum of Human RYR2-Related Disease. New Electrocardiographic, Structural, and Genetic Features. *Circulation.* **2007b**.
- Birkenmeier CS, Sharp JJ, Gifford EJ, Deveau SA, Barker JE. An Alternative First Exon in the Distal End of the Erythroid Ankyrin Gene Leads to Production of a Small Isoform Containing an NH₂-Terminal Membrane Anchor. *Genomics.* **1998**. 50(1):79-88.
- Birkenmeier CS, White RA, Peters LL, Hall EJ, Lux SE, Barker JE. Complex Patterns of Sequence Variation and Multiple 5' and 3' Ends Are Found Among Transcripts of the Erythroid Ankyrin Gene. *J Biol Chem.* **1993**. 268(13):9533-40.
- Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigo R, Gingeras TR, Margulies EH, Weng Z, Snyder M, Dermitzakis ET, Thurman RE, Kuehn MS, Taylor CM, Neph S, Koch CM, Asthana S, Malhotra A, Adzhubei I, Greenbaum JA, Andrews RM, Flicek P, Boyle PJ, Cao H, Carter NP, Clelland GK, Davis S, Day N, Dhami P, Dillon SC, Dorschner MO, Fiegler H, Giresi PG, Goldy J, Hawrylycz M, Haydock A, Humbert R, James KD, Johnson BE, Johnson EM, Frum TT, Rosenzweig ER, Karnani N, Lee K, Lefebvre GC, Navas PA, Neri F, Parker SC, Sabo PJ, Sandstrom R, Shafer A, Vetric D et al. Identification and Analysis of Functional Elements in 1% of the Human Genome by the ENCODE Pilot Project. *Nature.* **2007**. 447(7146):799-816.

- Bonow RO, Carabello BA, Chatterjee K, de LA, Jr., Faxon DP, Freed MD, Gaasch WH, Lytle BW, Nishimura RA, O'Gara PT, O'Rourke RA, Otto CM, Shah PM, Shanewise JS, Smith SC, Jr., Jacobs AK, Adams CD, Anderson JL, Antman EM, Fuster V, Halperin JL, Hiratzka LF, Hunt SA, Lytle BW, Nishimura R, Page RL, Riegel B. ACC/AHA 2006 Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: a Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 1998 Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease) Developed in Collaboration With the Society of Cardiovascular Anesthesiologists Endorsed by the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions and the Society of Thoracic Surgeons. *J Am Coll Cardiol.* **2006.** 48(3):e1-148.
- Bordachar P, Reuter S, Garrigue S, Cai X, Hocini M, Jais P, Haissaguerre M, Clementy J. Incidence, Clinical Implications and Prognosis of Atrial Arrhythmias in Brugada Syndrome. *Eur Heart J.* **2004.** 25(10):879-84.
- Borggreve M, Wolpert C, Antzelevitch C, Veltmann C, Giustetto C, Gaita F, Schimpf R. Short QT Syndrome. Genotype-Phenotype Correlations. *J Electrocardiol.* **2005.** 38(4 Suppl):75-80.
- Bosse Y, Mathieu P, Pibarot P. Genomics: the Next Step to Elucidate the Etiology of Calcific Aortic Valve Stenosis. *J Am Coll Cardiol.* **2008.** 51(14):1327-36.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Am J Hum Genet.* **1980.** 32(3):314-31.
- Bourgain C & Genin E. Complex Trait Mapping in Isolated Populations: Are Specific Statistical Methods Required? *Eur J Hum Genet.* **2005.** 13(6):698-706.
- Boyett MR, Harrison SM, Janvier NC, McMorn SO, Owen JM, Shui Z. A List of Vertebrate Cardiac Ionic Currents Nomenclature, Properties, Function and Cloned Equivalents. *Cardiovasc Res.* **1996.** 32(3):455-81.
- Bradbury J. Human Epigenome Project--Up and Running. *PLoS Biol.* **2003.** 1(3):E82.
- Braunwald E. On the Natural History of Severe Aortic Stenosis. *J Am Coll Cardiol.* **1990.** 15(5):1018-20.
- Brener SJ, Duffy CI, Thomas JD, Stewart WJ. Progression of Aortic Stenosis in 394 Patients: Relation to Changes in Myocardial and Mitral Valve Dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* **1995.** 25(2):305-10.
- Brennan C, Zhang Y, Leo C, Feng B, Cauwels C, Aguirre AJ, Kim M, Protopopov A, Chin L. High-Resolution Global Profiling of Genomic Alterations With Long Oligonucleotide Microarray. *Cancer Res.* **2004.** 64(14):4744-8.
- Brink AJ & Torrington M. Progressive Familial Heart Block--Two Types. *S Afr Med J.* **1977.** 52(2):53-9.
- 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(6):1633-40.
- Broman KW, Murray JC, Sheffield VC, White RL, Weber JL. Comprehensive Human Genetic Maps: Individual and Sex-Specific Variation in Recombination. *Am J Hum Genet.* **1998.** 63(3):861-9.
- 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(6):1391-6.
- Brugada P, Brugada R, Antzelevitch C, Brugada J. The Brugada Syndrome. *Arch Mal Coeur Vaiss.* **2005.** 98(2):115-22.
- Brugada R, Brugada J, Antzelevitch C, Kirsch GE, Potenza D, Towbin JA, Brugada P. Sodium Channel Blockers Identify Risk for Sudden Death in Patients With ST-Segment Elevation and Right Bundle Branch Block but Structurally Normal Hearts. *Circulation.* **2000.** 101(5):510-5.
- Brugada R, Hong K, Dumaine R, Cordeiro J, Gaita F, Borggreve M, Menendez TM, Brugada J, Pollevick GD, Wolpert C, Burashnikov E, Matsuo K, Wu YS, Guerchicoff A, Bianchi F, Giustetto C, Schimpf R, Brugada P, Antzelevitch C. Sudden Death Associated With Short-QT Syndrome Linked to Mutations in HERG. *Circulation.* **2004.** 109(1):30-5.
- Brugada R, Tapscott T, Czernuszewicz GZ, Marian AJ, Iglesias A, Mont L, Brugada J, Girona J, Domingo A, Bachinski LL, Roberts R. Identification of a Genetic Locus for Familial Atrial Fibrillation. *N Engl J Med.* **1997.** 336(13):905-11.

- Buetow KH, Weber JL, Ludwigsen S, Scherpbier-Heddema T, Duyk GM, Sheffield VC, Wang Z, Murray JC. Integrated Human Genome-Wide Maps Constructed Using the CEPH Reference Panel. *Nat Genet.* **1994.** 6(4):391-3.
- Busjahn A, Knoblauch H, Faulhaber HD, Boeckel T, Rosenthal M, Uhlmann R, Hoehe M, Schuster H, Luft FC. QT Interval Is Linked to 2 Long-QT Syndrome Loci in Normal Subjects. *Circulation.* **1999.** 99(24):3161-4.
- Caira FC, Stock SR, Gleason TG, McGee EC, Huang J, Bonow RO, Spelsberg TC, McCarthy PM, Rahimtoola SH, Rajamannan NM. Human Degenerative Valve Disease Is Associated With Up-Regulation of Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5 Receptor-Mediated Bone Formation. *J Am Coll Cardiol.* **2006.** 47(8):1707-12.
- Calkins H. Arrhythmogenic Right-Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol.* **2006.** 21(1):55-63.
- Campbell M. Calcific Aortic Stenosis and Congenital Bicuspid Aortic Valves. *Br Heart J.* **1968.** 30(5):606-16.
- Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, Shaw N, Lane CR, Lim EP, Kalyanaraman N, Nemesh J, Ziaugra L, Friedland L, Rolfe A, Warrington J, Lipshutz R, Daley GQ, Lander ES. Characterization of Single-Nucleotide Polymorphisms in Coding Regions of Human Genes. *Nat Genet.* **1999.** 22(3):231-8.
- Carter N, Snieder H, Jeffery S, Saumarez R, Varma C, Antoniadis L, Spector TD. QT Interval in Twins. *J Hum Hypertens.* **2000.** 14(6):389-90.
- Carvalho B, Ouwerkerk E, Meijer GA, Ylstra B. High Resolution Microarray Comparative Genomic Hybridisation Analysis Using Spotted Oligonucleotides. *J Clin Pathol.* **2004.** 57(6):644-6.
- Cerrone M, Colombi B, Santoro M, di Barletta MR, Scelsi M, Villani L, Napolitano C, Priori SG. Bidirectional Ventricular Tachycardia and Fibrillation Elicited in a Knock-in Mouse Model Carrier of a Mutation in the Cardiac Ryanodine Receptor. *Circ Res.* **2005.** 96(10):e77-e82.
- Chalajour F, Treede H, Ebrahimnejad A, Lauke H, Reichenspurner H, Ergun S. Angiogenic Activation of Valvular Endothelial Cells in Aortic Valve Stenosis. *Exp Cell Res.* **2004.** 298(2):455-64.
- Chan KL. Is Aortic Stenosis a Preventable Disease? *J Am Coll Cardiol.* **2003.** 42(4):593-9.
- Chan KL, Teo K, Tam J, Dumesnil JG. Rationale, Design, and Baseline Characteristics of a Randomized Trial to Assess the Effect of Cholesterol Lowering on the Progression of Aortic Stenosis: the Aortic Stenosis Progression Observation: Measuring Effects of Rosuvastatin (ASTRONOMER) Trial. *Am Heart J.* **2007.** 153(6):925-31.
- Chang KC, Barth AS, Sasano T, Kizana E, Kashiwakura Y, Zhang Y, Foster DB, Marban E. CAPON Modulates Cardiac Repolarization Via Neuronal Nitric Oxide Synthase Signaling in the Heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2008.**
- Charbonnier F, Raux G, Wang Q, Drouot N, Cordier F, Limacher JM, Saurin JC, Puisieux A, Olschwang S, Frebourg T. Detection of Exon Deletions and Duplications of the Mismatch Repair Genes in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Families Using Multiplex Polymerase Chain Reaction of Short Fluorescent Fragments. *Cancer Res.* **2000.** 60(11):2760-3.
- Chauhan VS, Tuvia S, Buhusi M, Bennett V, Grant AO. Abnormal Cardiac Na(+) Channel Properties and QT Heart Rate Adaptation in Neonatal Ankyrin(B) Knockout Mice. *Circ Res.* **2000.** 86(4):441-7.
- Chen L, Marquardt ML, Tester DJ, Sampson KJ, Ackerman MJ, Kass RS. Mutation of an A-Kinase-Anchoring Protein Causes Long-QT Syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2007.** 104(52):20990-5.
- 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(6673):293-6.
- Chen YH, Xu SJ, Bendahhou S, Wang XL, Wang Y, Xu WY, Jin HW, Sun H, Su XY, Zhuang QN, Yang YQ, Li YB, Liu Y, Xu HJ, Li XF, Ma N, Mou CP, Chen Z, Barhanin J, Huang W. KCNQ1 Gain-of-Function Mutation in Familial Atrial Fibrillation. *Science.* **2003.** 299(5604):251-4.
- Cimini M, Boughner DR, Ronald JA, Aldington L, Rogers KA. Development of Aortic Valve Sclerosis in a Rabbit Model of Atherosclerosis: an Immunohistochemical and Histological Study. *J Heart Valve Dis.* **2005.** 14(3):365-75.

- Clancy CE & Rudy Y. Na(+) Channel Mutation That Causes Both Brugada and Long-QT Syndrome Phenotypes: a Simulation Study of Mechanism. *Circulation*. **2002**. 105(10):1208-13.
- Clark TA, Schweitzer AC, Chen TX, Staples MK, Lu G, Wang H, Williams A, Blume JE. Discovery of Tissue-Specific Exons Using Comprehensive Human Exon Microarrays. *Genome Biol*. **2007**. 8(4):R64.
- Clementi M, Notari L, Borghi A, Tenconi R. Familial Congenital Bicuspid Aortic Valve: a Disorder of Uncertain Inheritance. *Am J Med Genet*. **1996**. 62(4):336-8.
- Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirotton D, Tordoir X, Bibe B, Bouix J, Caiment F, Elsen JM, Eychenne F, Larzul C, Laville E, Meish F, Milenkovic D, Tobin J, Charlier C, Georges M. A Mutation Creating a Potential Illegitimate MicroRNA Target Site in the Myostatin Gene Affects Muscularity in Sheep. *Nat Genet*. **2006**. 38(7):813-8.
- Come PC, Riley MF, Ferguson JF, Morgan JP, McKay RG. Prediction of Severity of Aortic Stenosis: Accuracy of Multiple Noninvasive Parameters. *Am J Med*. **1988**. 85(1):29-37.
- Connolly HM, Oh JK, Orszulak TA, Osborn SL, Roger VL, Hodge DO, Bailey KR, Seward JB, Tajik AJ. Aortic Valve Replacement for Aortic Stenosis With Severe Left Ventricular Dysfunction. Prognostic Indicators. *Circulation*. **1997**. 95(10):2395-400.
- Cordeiro JM, Barajas-Martinez H, Hong K, Burashnikov E, Pfeiffer R, Orsino AM, Wu YS, Hu D, Brugada J, Brugada P, Antzelevitch C, Dumaine R, Brugada R. Compound Heterozygous Mutations P336L and I1660V in the Human Cardiac Sodium Channel Associated With the Brugada Syndrome. *Circulation*. **2006**. 114(19):2026-33.
- Corrado D, Nava A, Buja G, Martini B, Fasoli G, Oselladore L, Turrini P, Thiene G. Familial Cardiomyopathy Underlies Syndrome of Right Bundle Branch Block, ST Segment Elevation and Sudden Death. *J Am Coll Cardiol*. **1996**. 27(2):443-8.
- Cosmi JE, Kort S, Tunick PA, Rosenzweig BP, Freedberg RS, Katz ES, Applebaum RM, Kronzon I. The Risk of the Development of Aortic Stenosis in Patients With "Benign" Aortic Valve Thickening. *Arch Intern Med*. **2002**. 162(20):2345-7.
- Cowell SJ, Newby DE, Prescott RJ, Bloomfield P, Reid J, Northridge DB, Boon NA. A Randomized Trial of Intensive Lipid-Lowering Therapy in Calcific Aortic Stenosis. *N Engl J Med*. **2005**. 352(23):2389-97.
- Cribier A, Eltchaninoff H, Tron C, Bauer F, Agatiello C, Sebah L, Bash A, Nusimovici D, Litzler PY, Bessou JP, Leon MB. Early Experience With Percutaneous Transcatheter Implantation of Heart Valve Prosthesis for the Treatment of End-Stage Inoperable Patients With Calcific Aortic Stenosis. *J Am Coll Cardiol*. **2004**. 43(4):698-703.
- Cripe L, Andelfinger G, Martin LJ, Shoener K, Benson DW. Bicuspid Aortic Valve Is Heritable. *J Am Coll Cardiol*. **2004**. 44(1):138-43.
- Crotti L, Spazzolini C, Schwartz PJ, Shimizu W, Denjoy I, Schulze-Bahr E, Zaklyazminskaya EV, Swan H, Ackerman MJ, Moss AJ, Wilde AA, Horie M, Brink PA, Insolia R, De Ferrari GM, Crimi G. The Common Long-QT Syndrome Mutation KCNQ1/A341V Causes Unusually Severe Clinical Manifestations in Patients With Different Ethnic Backgrounds. Toward a Mutation-Specific Risk Stratification. *Circulation*. **2007**.
- Cunha SR, Bhasin N, Mohler PJ. Targeting and Stability of Na/Ca Exchanger 1 in Cardiomyocytes Requires Direct Interaction With the Membrane Adaptor Ankyrin-B. *J Biol Chem*. **2007**. 282(7):4875-83.
- Cunha SR & Mohler PJ. Cardiac Ankyrins: Essential Components for Development and Maintenance of Excitable Membrane Domains in Heart. *Cardiovasc Res*. **2006**. 71(1):22-9.
- Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT. A Molecular Basis for Cardiac Arrhythmia: HERG Mutations Cause Long QT Syndrome. *Cell*. **1995**. 80(5):795-803.
- Darbar D, Hardy A, Haines JL, Roden DM. Prolonged Signal-Averaged P-Wave Duration As an Intermediate Phenotype for Familial Atrial Fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. **2008**. 51(11):1083-9.
- 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(4):735-40.
- Del Rio M, Imam A, DeLeon M, Gomez G, Mishra J, Ma Q, Parikh S, Devarajan P. The Death Domain of Kidney Ankyrin Interacts With Fas and Promotes Fas-Mediated Cell Death in Renal Epithelia. *J Am Soc Nephrol*. **2004**. 15(1):41-51.

- Delot EC. Control of Endocardial Cushion and Cardiac Valve Maturation by BMP Signaling Pathways. *Mol Genet Metab*. **2003**. 80(1-2):27-35.
- Demer LL. Cholesterol in Vascular and Valvular Calcification. *Circulation*. **2001**. 104(16):1881-3.
- Dhami P, Coffey AJ, Abbs S, Vermeesch JR, Dumanski JP, Woodward KJ, Andrews RM, Langford C, Vetrie D. Exon Array CGH: Detection of Copy-Number Changes at the Resolution of Individual Exons in the Human Genome. *Am J Hum Genet*. **2005**. 76(5):750-62.
- Di Diego JM, Cordeiro JM, Goodrow RJ, Fish JM, Zygmunt AC, Perez GJ, Scornik FS, Antzelevitch C. Ionic and Cellular Basis for the Predominance of the Brugada Syndrome Phenotype in Males. *Circulation*. **2002**. 106(15):2004-11.
- Di Diego JM, Sun ZQ, Antzelevitch C. I(to) and Action Potential Notch Are Smaller in Left Vs. Right Canine Ventricular Epicardium. *Am J Physiol*. **1996**. 271(2 Pt 2):H548-H561.
- Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissbach J. A Comprehensive Genetic Map of the Human Genome Based on 5,264 Microsatellites. *Nature*. **1996**. 380(6570):152-4.
- Disse S, Abergel E, Berrebi A, Houot AM, Le Heuzey JY, Diebold B, Guize L, Carpentier A, Corvol P, Jeunemaitre X. Mapping of a First Locus for Autosomal Dominant Myxomatous Mitral-Valve Prolapse to Chromosome 16p11.2-P12.1. *Am J Hum Genet*. **1999**. 65(5):1242-51.
- Dobrzynski H, Boyett MR, Anderson RH. New Insights into Pacemaker Activity: Promoting Understanding of Sick Sinus Syndrome. *Circulation*. **2007**. 115(14):1921-32.
- Donaldson MR, Yoon G, Fu YH, Ptacek LJ. Andersen-Tawil Syndrome: a Model of Clinical Variability, Pleiotropy, and Genetic Heterogeneity. *Ann Med*. **2004**. 36 Suppl 1:92-7.
- Donis-Keller H, Green P, Helms C, Cartinour S, Weiffenbach B, Stephens K, Keith TP, Bowden DW, Smith DR, Lander ES, . A Genetic Linkage Map of the Human Genome. *Cell*. **1987**. 51(2):319-37.
- Drolet MC, Arsenault M, Couet J. Experimental Aortic Valve Stenosis in Rabbits. *J Am Coll Cardiol*. **2003**. 41(7):1211-7.
- Drolet MC, Roussel E, Deshaies Y, Couet J, Arsenault M. A High Fat/High Carbohydrate Diet Induces Aortic Valve Disease in C57BL/6J Mice. *J Am Coll Cardiol*. **2006**. 47(4):850-5.
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation. *Cell*. **1997**. 89(5):747-54.
- Eckardt L. Gender Differences in Brugada Syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol*. **2007**. 18(4):422-4.
- Eckardt L, Probst V, Smits JP, Bahr ES, Wolpert C, Schimpf R, Wichter T, Boisseau P, Heinecke A, Breithardt G, Borggrefe M, Le Marec H, Bocker D, Wilde AA. Long-Term Prognosis of Individuals With Right Precordial ST-Segment-Elevation Brugada Syndrome. *Circulation*. **2005**. 111(3):257-63.
- Edep ME, Shirani J, Wolf P, Brown DL. Matrix Metalloproteinase Expression in Nonrheumatic Aortic Stenosis. *Cardiovasc Pathol*. **2000**. 9(5):281-6.
- Ehtisham J & Watkins H. Is Wolff-Parkinson-White Syndrome a Genetic Disease? *J Cardiovasc Electrophysiol*. **2005**. 16(11):1258-62.
- Ellinor PT, Shin JT, Moore RK, Yoerger DM, MacRae CA. Locus for Atrial Fibrillation Maps to Chromosome 6q14-16. *Circulation*. **2003**. 107(23):2880-3.
- Ellinor PT, Nam EG, Shea MA, Milan DJ, Ruskin JN, MacRae CA. Cardiac Sodium Channel Mutation in Atrial Fibrillation. *Heart Rhythm*. **2008**. 5(1):99-105.
- Emanuel R, Withers R, O'Brien K, Ross P, Feizi O. Congenitally Bicuspid Aortic Valves. Clinicogenetic Study of 41 Families. *Br Heart J*. **1978**. 40(12):1402-7.
- Eriksson P, Hansson PO, Eriksson H, Dellborg M. Bundle-Branch Block in a General Male Population: the Study of Men Born 1913. *Circulation*. **1998**. 98(22):2494-500.

- Escamilla MA. Population Isolates: Their Special Value for Locating Genes for Bipolar Disorder. *Bipolar Disord.* **2001.** 3(6):299-317.
- Eubanks J, Srinivasan J, Dinulos MB, Disteche CM, Catterall WA. Structure and Chromosomal Localization of the Beta2 Subunit of the Human Brain Sodium Channel. *Neuroreport.* **1997.** 8(12):2775-9.
- Evans DM & Cardon LR. Guidelines for Genotyping in Genomewide Linkage Studies: Single-Nucleotide-Polymorphism Maps Versus Microsatellite Maps. *Am J Hum Genet.* **2004.** 75(4):687-92.
- 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(23):1715-24.
- Fatkin D, Otway R, Vandenberg JI. Genes and Atrial Fibrillation: a New Look at an Old Problem. *Circulation.* **2007.** 116(7):782-92.
- Fedak PW, Verma S, David TE, Leask RL, Weisel RD, Butany J. Clinical and Pathophysiological Implications of a Bicuspid Aortic Valve. *Circulation.* **2002.** 106(8):900-4.
- Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural Variation in the Human Genome. *Nat Rev Genet.* **2006.** 7(2):85-97.
- Fish JM & Antzelevitch C. Cellular and Ionic Basis for the Sex-Related Difference in the Manifestation of the Brugada Syndrome and Progressive Conduction Disease Phenotypes. *J Electrocardiol.* **2003.** 36 Suppl:173-9.
- Fish JM & Antzelevitch C. Role of Sodium and Calcium Channel Block in Unmasking the Brugada Syndrome. *Heart Rhythm.* **2004.** 1(2):210-7.
- Fodstad H, Bendahhou S, Rougier JS, Laitinen-Forsblom PJ, Barhanin J, Abriel H, Schild L, Kontula K, Swan H. Molecular Characterization of Two Founder Mutations Causing Long QT Syndrome and Identification of Compound Heterozygous Patients. *Ann Med.* **2006.** 38(4):294-304.
- Fondard O, Detaint D, Iung B, Choqueux C, Adle-Biassette H, Jarraya M, Hvass U, Couetil JP, Henin D, Michel JB, Vahanian A, Jacob MP. Extracellular Matrix Remodelling in Human Aortic Valve Disease: the Role of Matrix Metalloproteinases and Their Tissue Inhibitors. *Eur Heart J.* **2005.** 26(13):1333-41.
- Francis J, Sankar V, Nair VK, Priori SG. Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Heart Rhythm.* **2005.** 2(5):550-4.
- Franco D & Campione M. The Role of Pitx2 During Cardiac Development. Linking Left-Right Signaling and Congenital Heart Diseases. *Trends Cardiovasc Med.* **2003.** 13(4):157-63.
- Frank S, Johnson A, Ross J, Jr. Natural History of Valvular Aortic Stenosis. *Br Heart J.* **1973.** 35(1):41-6.
- Freed LA, Acierno JS, Jr., Dai D, Leyne M, Marshall JE, Nesta F, Levine RA, Slaughter SA. A Locus for Autosomal Dominant Mitral Valve Prolapse on Chromosome 11p15.4. *Am J Hum Genet.* **2003.** 72(6):1551-9.
- Freeman RV & Otto CM. Spectrum of Calcific Aortic Valve Disease: Pathogenesis, Disease Progression, and Treatment Strategies. *Circulation.* **2005.** 111(24):3316-26.
- Frigo G, Rampazzo A, Bauce B, Pilichou K, Boffagna G, Danieli GA, Nava A, Martini B. Homozygous SCN5A Mutation in Brugada Syndrome With Monomorphic Ventricular Tachycardia and Structural Heart Abnormalities. *Europace.* **2007.** 9(6):391-7.
- Frustaci A, Priori SG, Pieroni M, Chimenti C, Napolitano C, Rivolta I, Sanna T, Bellocci F, Russo MA. Cardiac Histological Substrate in Patients With Clinical Phenotype of Brugada Syndrome. *Circulation.* **2005.** 112(24):3680-7.
- Furukawa T & Kurokawa J. Regulation of Cardiac Ion Channels Via Non-Genomic Action of Sex Steroid Hormones: Implication for the Gender Difference in Cardiac Arrhythmias. *Pharmacol Ther.* **2007.** 115(1):106-15.
- 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(Pt 2):675-93.

- Gaita F, Giustetto C, Bianchi F, Schimpf R, Haissaguerre M, Calo L, Brugada R, Antzelevitch C, Borggrefe M, Wolpert C. Short QT Syndrome: Pharmacological Treatment. *J Am Coll Cardiol.* **2004.** 43(8):1494-9.
- Gaita F, Giustetto C, Bianchi F, Wolpert C, Schimpf R, Riccardi R, Grossi S, Richiardi E, Borggrefe M. Short QT Syndrome: a Familial Cause of Sudden Death. *Circulation.* **2003.** 108(8):965-70.
- Galante A, Pietroiusti A, Vellini M, Piccolo P, Possati G, De Bonis M, Grillo RL, Fontana C, Favalli C. C-Reactive Protein Is Increased in Patients With Degenerative Aortic Valvular Stenosis. *J Am Coll Cardiol.* **2001.** 38(4):1078-82.
- Gale AN, McKusick VA, Hutchins GM, Gott VL. Familial Congenital Bicuspid Aortic Valve: Secondary Calcific Aortic Stenosis and Aortic Aneurysm. *Chest.* **1977.** 72(5):668-70.
- Gallagher PG & Forget BG. An Alternate Promoter Directs Expression of a Truncated, Muscle-Specific Isoform of the Human Ankyrin 1 Gene. *J Biol Chem.* **1998.** 273(3):1339-48.
- Gallagher PG, Tse WT, Scarpa AL, Lux SE, Forget BG. Structure and Organization of the Human Ankyrin-1 Gene. Basis for Complexity of Pre-mRNA Processing. *J Biol Chem.* **1997.** 272(31):19220-8.
- Garg V. Molecular Genetics of Aortic Valve Disease. *Curr Opin Cardiol.* **2006.** 21(3):180-4.
- Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, Grossfeld PD, Srivastava D. Mutations in NOTCH1 Cause Aortic Valve Disease. *Nature.* **2005.** 437(7056):270-4.
- Gavillet B, Rougier JS, Domenighetti AA, Behar R, Boixel C, Ruchat P, Lehr HA, Pedrazzini T, Abriel H. Cardiac Sodium Channel Nav1.5 Is Regulated by a Multiprotein Complex Composed of Syntrophins and Dystrophin. *Circ Res.* **2006.** 99(4):407-14.
- Gee SH, Madhavan R, Levinson SR, Caldwell JH, Sealock R, Froehner SC. Interaction of Muscle and Brain Sodium Channels With Multiple Members of the Syntrophin Family of Dystrophin-Associated Proteins. *J Neurosci.* **1998.** 18(1):128-37.
- Gellens ME, George AL, Jr., Chen LQ, Chahine M, Horn R, Barchi RL, Kallen RG. Primary Structure and Functional Expression of the Human Cardiac Tetrodotoxin-Insensitive Voltage-Dependent Sodium Channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1992.** 89(2):554-8.
- Gerber IL, Stewart RA, Legget ME, West TM, French RL, Sutton TM, Yandle TG, French JK, Richards AM, White HD. Increased Plasma Natriuretic Peptide Levels Reflect Symptom Onset in Aortic Stenosis. *Circulation.* **2003.** 107(14):1884-90.
- Ghaisas NK, Foley JB, O'Briain DS, Crean P, Kelleher D, Walsh M. Adhesion Molecules in Nonrheumatic Aortic Valve Disease: Endothelial Expression, Serum Levels and Effects of Valve Replacement. *J Am Coll Cardiol.* **2000.** 36(7):2257-62.
- Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM. Characterization of the Human Factor VIII Gene. *Nature.* **1984.** 312(5992):326-30.
- Glick BN & Roberts WC. Congenitally Bicuspid Aortic Valve in Multiple Family Members. *Am J Cardiol.* **1994.** 73(5):400-4.
- Goldbarg SH, Elmariah S, Miller MA, Fuster V. Insights into Degenerative Aortic Valve Disease. *J Am Coll Cardiol.* **2007.** 50(13):1205-13.
- Goldbaum TS, Lindsay J, Jr., Garcia JM, Pichard AD. Ascending Aortic Calcification and Calcific Aortic Stenosis in a Young Woman. *Am Heart J.* **1986.** 111(5):992-3.
- Gollob MH, Jones DL, Krahn AD, Danis L, Gong XQ, Shao Q, Liu X, Veinot JP, Tang AS, Stewart AF, 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(25):2677-88.
- Gong G, Stern HS, Cheng SC, Fong N, Mordeson J, Deng HW, Recker RR. The Association of Bone Mineral Density With Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms. *Osteoporos Int.* **1999.** 9(1):55-64.

- Gouas L. Aspects Génétiques Du Risque Arythmogène : Polymorphismes Des Canaux Ioniques Cardiaques Et Identification D'Un Nouveau Locus Responsable Du Syndrome De Brugada. *Thèse De Doctorat, Université Paris 6*. **2005**.
- Gouas L, Nicaud V, Berthet M, Forhan A, Tiret L, Balkau B, Guicheney P. Association of KCNQ1, KCNE1, KCNH2 and SCN5A Polymorphisms With QTc Interval Length in a Healthy Population. *Eur J Hum Genet*. **2005**. 13(11):1213-22.
- Gouas L, Nicaud V, Chaouch S, Berthet M, Forhan A, Tichet J, Tiret L, Balkau B, Guicheney P. Confirmation of Associations Between Ion Channel Gene SNPs and QTc Interval Duration in Healthy Subjects. *Eur J Hum Genet*. **2007**. 15(9):974-9.
- Grant AO, Carboni MP, Neplioueva V, Starmer CF, Memmi M, Napolitano C, Priori S. Long QT Syndrome, Brugada Syndrome, and Conduction System Disease Are Linked to a Single Sodium Channel Mutation. *J Clin Invest*. **2002**. 110(8):1201-9.
- Groenewegen WA, Firouzi M, Bezzina CR, Vliex S, Van Langen IM, Sandkuijl L, Smits JP, Hulsbeek M, Rook MB, Jongasma HJ, Wilde AA. A Cardiac Sodium Channel Mutation Cosegregates With a Rare Connexin40 Genotype in Familial Atrial Standstill. *Circ Res*. **2003**. 92(1):14-22.
- Gudbjartsson DF, Arnar DO, Helgadóttir A, Gretarsdóttir S, Holm H, Sigurdsson A, Jonasdóttir A, Baker A, Thorleifsson G, Kristjansson K, Pálsson A, Blondal T, Sulem P, Backman VM, Hardarson GA, Palsdóttir E, Helgason A, Sigurjonsdóttir R, Sverrisson JT, Kostulas K, Ng MC, Baum L, So WY, Wong KS, Chan JC, Furie KL, Greenberg SM, Sale M, Kelly P, MacRae CA, Smith EE, Rosand J, Hillert J, Ma RC, Ellinor PT, Thorgeirsson G, Gulcher JR, Kong A, Thorsteinsdóttir U, Stefansson K. Variants Conferring Risk of Atrial Fibrillation on Chromosome 4q25. *Nature*. **2007**. 448(7151):353-7.
- Gudbjartsson DF, Jonasson K, Frigge ML, Kong A. Allegro, a New Computer Program for Multipoint Linkage Analysis. *Nat Genet*. **2000**. 25(1):12-3.
- Guerraty M & Mohler ER. Models of Aortic Valve Calcification. *J Investig Med*. **2007**. 55(6):278-83.
- Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, Watkins PC, Ottina K, Wallace MR, Sakaguchi AY, . A Polymorphic DNA Marker Genetically Linked to Huntington's Disease. *Nature*. **1983**. 306(5940):234-8.
- Gussak I, Brugada P, Brugada J, Wright RS, Kopecky SL, Chaitman BR, Bjerregaard P. Idiopathic Short QT Interval: a New Clinical Syndrome? *Cardiology*. **2000**. 94(2):99-102.
- Gyapay G, Morissette J, Vignal A, Dib C, Fizames C, Millasseau P, Marc S, Bernardi G, Lathrop M, Weissenbach J. The 1993-94 Genethon Human Genetic Linkage Map. *Nat Genet*. **1994**. 7(2 Spec No):246-339.
- Hanlon MR & Wallace BA. Structure and Function of Voltage-Dependent Ion Channel Regulatory Beta Subunits. *Biochemistry*. **2002**. 41(9):2886-94.
- Hauser ER & Boehnke M. Genetic Linkage Analysis of Complex Genetic Traits by Using Affected Sibling Pairs. *Biometrics*. **1998**. 54(4):1238-46.
- Hayashi T & Su TP. Regulating Ankyrin Dynamics: Roles of Sigma-1 Receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2001**. 98(2):491-6.
- He JQ, Ma Y, Lee Y, Thomson JA, Kamp TJ. Human Embryonic Stem Cells Develop into Multiple Types of Cardiac Myocytes: Action Potential Characterization. *Circ Res*. **2003**. 93(1):32-9.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real Time Quantitative PCR. *Genome Res*. **1996**. 6(10):986-94.
- Helske S, Kupari M, Lindstedt KA, Kovanen PT. Aortic Valve Stenosis: an Active Atheroinflammatory Process. *Curr Opin Lipidol*. **2007a**. 18(5):483-91.
- Helske S, Laine M, Kupari M, Lommi J, Turto H, Nurmi L, Tikkanen I, Werkkala K, Lindstedt KA, Kovanen PT. Increased Expression of Profibrotic Neutral Endopeptidase and Bradykinin Type 1 Receptors in Stenotic Aortic Valves. *Eur Heart J*. **2007b**. 28(15):1894-903.
- Helske S, Lindstedt KA, Laine M, Mayranpaa M, Werkkala K, Lommi J, Turto H, Kupari M, Kovanen PT. Induction of Local Angiotensin II-Producing Systems in Stenotic Aortic Valves. *J Am Coll Cardiol*. **2004**. 44(9):1859-66.

- Helske S, Oksjoki R, Lindstedt KA, Lommi J, Turto H, Werkkala K, Kupari M, Kovanen PT. Complement System Is Activated in Stenotic Aortic Valves. *Atherosclerosis*. **2007c**.
- Helske S, Syvaranta S, Kupari M, Lappalainen J, Laine M, Lommi J, Turto H, Mayranpaa M, Werkkala K, Kovanen PT, Lindstedt KA. Possible Role for Mast Cell-Derived Cathepsin G in the Adverse Remodelling of Stenotic Aortic Valves. *Eur Heart J*. **2006a**. 27(12):1495-504.
- Helske S, Syvaranta S, Lindstedt KA, Lappalainen J, Oorni K, Mayranpaa MI, Lommi J, Turto H, Werkkala K, Kupari M, Kovanen PT. Increased Expression of Elastolytic Cathepsins S, K, and V and Their Inhibitor Cystatin C in Stenotic Aortic Valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2006b**. 26(8):1791-8.
- Herfst LJ, Potet F, Bezzina CR, Groenewegen WA, Le Marec H, Hoorntje TM, Demolombe S, Baro I, Escande D, Jongsma HJ, Wilde AA, Rook MB. Na⁺ Channel Mutation Leading to Loss of Function and Non-Progressive Cardiac Conduction Defects. *J Mol Cell Cardiol*. **2003**. 35(5):549-57.
- Herfst LJ, Rook MB, Jongsma HJ. Trafficking and Functional Expression of Cardiac Na⁺ Channels. *J Mol Cell Cardiol*. **2004**. 36(2):185-93.
- Heutink P & Oostra BA. Gene Finding in Genetically Isolated Populations. *Hum Mol Genet*. **2002**. 11(20):2507-15.
- Hirschhorn JN & Daly MJ. Genome-Wide Association Studies for Common Diseases and Complex Traits. *Nat Rev Genet*. **2005**. 6(2):95-108.
- Hoffman JI & Kaplan S. The Incidence of Congenital Heart Disease. *J Am Coll Cardiol*. **2002**. 39(12):1890-900.
- Hong K, Berruezo-Sanchez A, Pongvarin N, Oliva A, Vatta M, Brugada J, Brugada P, Towbin JA, Dumaine R, Pinero-Galvez C, Antzelevitch C, Brugada R. Phenotypic Characterization of a Large European Family With Brugada Syndrome Displaying a Sudden Unexpected Death Syndrome Mutation in SCN5A. *J Cardiovasc Electrophysiol*. **2004a**. 15(1):64-9.
- Hong K, Bjerregaard P, Gussak I, Brugada R. Short QT Syndrome and Atrial Fibrillation Caused by Mutation in KCNH2. *J Cardiovasc Electrophysiol*. **2005a**. 16(4):394-6.
- Hong K, Brugada J, Oliva A, Berruezo-Sanchez A, Potenza D, Pollevick GD, Guerchicoff A, Matsuo K, Burashnikov E, Dumaine R, Towbin JA, Nesterenko V, Brugada P, Antzelevitch C, Brugada R. Value of Electrocardiographic Parameters and Ajmaline Test in the Diagnosis of Brugada Syndrome Caused by SCN5A Mutations. *Circulation*. **2004b**. 110(19):3023-7.
- Hong K, Piper DR, Diaz-Valdecantos A, Brugada J, Oliva A, Burashnikov E, Santos-de-Soto J, Grueso-Montero J, Diaz-Enfante E, Brugada P, Sachse F, Sanguinetti MC, Brugada R. De Novo KCNQ1 Mutation Responsible for Atrial Fibrillation and Short QT Syndrome in Utero. *Cardiovasc Res*. **2005b**. 68(3):433-40.
- Horne BD, Camp NJ, Muhlestein JB, Cannon-Albright LA. Evidence for a Heritable Component in Death Resulting From Aortic and Mitral Valve Diseases. *Circulation*. **2004**. 110(19):3143-8.
- Horowitz MC, Xi Y, Wilson K, Kacena MA. Control of Osteoclastogenesis and Bone Resorption by Members of the TNF Family of Receptors and Ligands. *Cytokine Growth Factor Rev*. **2001**. 12(1):9-18.
- Hu D, Viskin S, Oliva A, Carrier T, Cordeiro JM, Barajas-Martinez H, Wu Y, Burashnikov E, Sicouri S, Brugada R, Rosso R, Guerchicoff A, Pollevick GD, Antzelevitch C. Novel Mutation in the SCN5A Gene Associated With Arrhythmic Storm Development During Acute Myocardial Infarction. *Heart Rhythm*. **2007**. 4(8):1072-80.
- Hughes AE, Ralston SH, Marken J, Bell C, MacPherson H, Wallace RG, van Hul W, Whyte MP, Nakatsuka K, Hovy L, Anderson DM. Mutations in TNFRSF11A, Affecting the Signal Peptide of RANK, Cause Familial Expansile Osteolysis. *Nat Genet*. **2000**. 24(1):45-8.
- Huikuri HV, Castellanos A, Myerburg RJ. Sudden Death Due to Cardiac Arrhythmias. *N Engl J Med*. **2001**. 345(20):1473-82.
- Hultgren HN. Osteitis Deformans (Paget's Disease) and Calcific Disease of the Heart Valves. *Am J Cardiol*. **1998**. 81(12):1461-4.
- Huntington K, Hunter AG, Chan KL. A Prospective Study to Assess the Frequency of Familial Clustering of Congenital Bicuspid Aortic Valve. *J Am Coll Cardiol*. **1997**. 30(7):1809-12.

- Hurlstone AF, Haramis AP, Wienholds E, Begthel H, Korving J, Van Eeden F, Cuppen E, Zivkovic D, Plasterk RH, Clevers H. The Wnt/Beta-Catenin Pathway Regulates Cardiac Valve Formation. *Nature*. **2003**. 425(6958):633-7.
- Hutchison CAI. DNA Sequencing: Bench to Bedside and Beyond. *Nucleic Acids Res*. **2007**. 35(18):6227-37.
- Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C. Detection of Large-Scale Variation in the Human Genome. *Nat Genet*. **2004**. 36(9):949-51.
- Isom LL. Sodium Channel Beta Subunits: Anything but Auxiliary. *Neuroscientist*. **2001**. 7(1):42-54.
- Isom LL, De Jongh KS, Patton DE, Reber BF, Offord J, Charbonneau H, Walsh K, Goldin AL, Catterall WA. Primary Structure and Functional Expression of the Beta 1 Subunit of the Rat Brain Sodium Channel. *Science*. **1992**. 256(5058):839-42.
- Isom LL, Ragsdale DS, De Jongh KS, Westenbroek RE, Reber BF, Scheuer T, Catterall WA. Structure and Function of the Beta 2 Subunit of Brain Sodium Channels, a Transmembrane Glycoprotein With a CAM Motif. *Cell*. **1995**. 83(3):433-42.
- lung B, Baron G, Butchart EG, Delahaye F, Gohlke-Barwolf C, Levang OW, Tornos P, Vanoverschelde JL, Vermeer F, Boersma E, Ravnaud P, Vahanian A. A Prospective Survey of Patients With Valvular Heart Disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *Eur Heart J*. **2003**. 24(13):1231-43.
- lung B, Gohlke-Barwolf C, Tornos P, Tribouilloy C, Hall R, Butchart E, Vahanian A. Recommendations on the Management of the Asymptomatic Patient With Valvular Heart Disease. *Eur Heart J*. **2002**. 23(16):1252-66.
- 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(1):59-68.
- Jespersen T, Gavillet B, van Bemmelen MX, Cordonier S, Thomas MA, Staub O, Abriel H. Cardiac Sodium Channel Na(v)1.5 Interacts With and Is Regulated by the Protein Tyrosine Phosphatase PTPH1. *Biochem Biophys Res Commun*. **2006**. 348(4):1455-62.
- Jian B, Jones PL, Li Q, Mohler ER, III, Schoen FJ, Levy RJ. Matrix Metalloproteinase-2 Is Associated With Tenascin-C in Calcific Aortic Stenosis. *Am J Pathol*. **2001**. 159(1):321-7.
- Jian B, Narula N, Li QY, Mohler ER, III, Levy RJ. Progression of Aortic Valve Stenosis: TGF-Beta1 Is Present in Calcified Aortic Valve Cusps and Promotes Aortic Valve Interstitial Cell Calcification Via Apoptosis. *Ann Thorac Surg*. **2003**. 75(2):457-65.
- Jiang C, Atkinson D, Towbin JA, Splawski I, Lehmann MH, Li H, Timothy K, Taggart RT, Schwartz PJ, Vincent GM, . Two Long QT Syndrome Loci Map to Chromosomes 3 and 7 With Evidence for Further Heterogeneity. *Nat Genet*. **1994**. 8(2):141-7.
- Jouquand S, Cheron A, Galibert F. Microsatellite Analysis Using a Two-Step Procedure for Fluorescence Labeling of PCR Products. *Biotechniques*. **1999**. 26(5):902-5.
- Jouven X & Escande D. [Sudden Cardiac Death: Toward the Identification of Susceptibility Genes]. *Arch Mal Coeur Vaiss*. **2006**. 99(9):806-12.
- Juvonen J, Juvonen T, Laurila A, Kuusisto J, Alarakkola E, Sarkioja T, Bodian CA, Kairaluoma MI, Saikku P. Can Degenerative Aortic Valve Stenosis Be Related to Persistent Chlamydia Pneumoniae Infection? *Ann Intern Med*. **1998**. 128(9):741-4.
- Juvonen J, Laurila A, Juvonen T, Alakarppa H, Surcel HM, Lounatmaa K, Kuusisto J, Saikku P. Detection of Chlamydia Pneumoniae in Human Nonrheumatic Stenotic Aortic Valves. *J Am Coll Cardiol*. **1997**. 29(5):1054-9.
- Kaab S & Schulze-Bahr E. Susceptibility Genes and Modifiers for Cardiac Arrhythmias. *Cardiovasc Res*. **2005**. 67(3):397-413.
- Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R, Brueckmann M, Haase KK, Dempfle CE, Borggrefe M. Pathogenetic Role of Chlamydia Pneumoniae in Calcific Aortic Stenosis: Immunohistochemistry Study and Review of the Literature. *J Heart Valve Dis*. **2003a**. 12(4):447-53.

- Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R, Haase KK, Sarikoc A, Kilic R, Brueckmann M, Lang S, Zahn I, Vahl C, Hagl S, Dempfle CE, Borggrete M. Receptor Activator of Nuclear Factor KappaB Ligand and Osteoprotegerin Regulate Aortic Valve Calcification. *J Mol Cell Cardiol.* **2004a.** 36(1):57-66.
- Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R, Vahl CF, Hagl S, Brueckmann M, Haase KK, Dempfle CE, Borggrete M. Expression of Bone Sialoprotein and Bone Morphogenetic Protein-2 in Calcific Aortic Stenosis. *J Heart Valve Dis.* **2004b.** 13(4):560-6.
- Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, Fischer CS, Vocke DC, Kilic R, Sarikoc A, Pinol R, Hagl S, Lang S, Brueckmann M, Borggrete M. Inflammatory Regulation of Extracellular Matrix Remodeling in Calcific Aortic Valve Stenosis. *Cardiovasc Pathol.* **2005a.** 14(2):80-7.
- Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, Tran HT, Kilic R, Sarikoc A, Brueckmann M, Vahl C, Hagl S, Haase KK, Borggrete M. Interleukin-1 Beta Promotes Matrix Metalloproteinase Expression and Cell Proliferation in Calcific Aortic Valve Stenosis. *Atherosclerosis.* **2003b.** 170(2):205-11.
- Kaden JJ, Dempfle CE, Kilic R, Sarikoc A, Hagl S, Lang S, Brueckmann M, Borggrete M. Influence of Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B on Human Aortic Valve Myofibroblasts. *Exp Mol Pathol.* **2005b.** 78(1):36-40.
- Kaden JJ, Kilic R, Sarikoc A, Hagl S, Lang S, Hoffmann U, Brueckmann M, Borggrete M. Tumor Necrosis Factor Alpha Promotes an Osteoblast-Like Phenotype in Human Aortic Valve Myofibroblasts: a Potential Regulatory Mechanism of Valvular Calcification. *Int J Mol Med.* **2005c.** 16(5):869-72.
- Kaden JJ, Vocke DC, Fischer CS, Grobholz R, Brueckmann M, Vahl CF, Hagl S, Haase KK, Dempfle CE, Borggrete M. Expression and Activity of Matrix Metalloproteinase-2 in Calcific Aortic Stenosis. *Z Kardiol.* **2004c.** 93(2):124-30.
- Kannankeril PJ, Mitchell BM, Goonasekera SA, Chelu MG, Zhang W, Sood S, Kearney DL, Danila CI, De Biasi M, Wehrens XH, Pautler RG, Roden DM, Taffet GE, Dirksen RT, Anderson ME, Hamilton SL. Mice With the R176Q Cardiac Ryanodine Receptor Mutation Exhibit Catecholamine-Induced Ventricular Tachycardia and Cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2006.** 103(32):12179-84.
- Kannankeril PJ & Roden DM. Drug-Induced Long QT and Torsade De Pointes: Recent Advances. *Curr Opin Cardiol.* **2007.** 22(1):39-43.
- Kapfhamer D, Miller DE, Lambert S, Bennett V, Glover TW, Burmeister M. Chromosomal Localization of the AnkyrinG Gene (ANK3/Ank3) to Human 10q21 and Mouse 10. *Genomics.* **1995.** 27(1):189-91.
- Kazen-Gillespie KA, Ragsdale DS, D'Andrea MR, Mattei LN, Rogers KE, Isom LL. Cloning, Localization, and Functional Expression of Sodium Channel Beta1A Subunits. *J Biol Chem.* **2000.** 275(2):1079-88.
- Keating M, Atkinson D, Dunn C, Timothy K, Vincent GM, Leppert M. Linkage of a Cardiac Arrhythmia, the Long QT Syndrome, and the Harvey Ras-1 Gene. *Science.* **1991.** 252(5006):704-6.
- Keller DI, Rougier JS, Kucera JP, Benammar N, Fressart V, Guicheney P, Madle A, Fromer M, Schlapfer J, Abriel H. Brugada Syndrome and Fever: Genetic and Molecular Characterization of Patients Carrying SCN5A Mutations. *Cardiovasc Res.* **2005.** 67(3):510-9.
- Kies P, Wichter T, Schafers M, Paul M, Schafers KP, Eckardt L, Stegger L, Schulze-Bahr E, Rimoldi O, Breithardt G, Schober O, Camici PG. Abnormal Myocardial Presynaptic Norepinephrine Recycling in Patients With Brugada Syndrome. *Circulation.* **2004.** 110(19):3017-22.
- Kimura K, Kitano J, Nakajima Y, Nakanishi S. Hyperpolarization-Activated, Cyclic Nucleotide-Gated HCN2 Cation Channel Forms a Protein Assembly With Multiple Neuronal Scaffold Proteins in Distinct Modes of Protein-Protein Interaction. *Genes Cells.* **2004.** 9(7):631-40.
- Kline CF, Cunha SR, Lowe JS, Hund TJ, Mohler PJ. Revisiting Ankyrin-InsP(3) Receptor Interactions: Ankyrin-B Associates With the Cytoplasmic N-Terminus of the InsP(3) Receptor. *J Cell Biochem.* **2008.**
- Kloosterman WP & Plasterk RH. The Diverse Functions of MicroRNAs in Animal Development and Disease. *Dev Cell.* **2006.** 11(4):441-50.
- Knollmann BC & Roden DM. A Genetic Framework for Improving Arrhythmia Therapy. *Nature.* **2008.** 451(7181):929-36.

- Kolh P, Lahaye L, Gerard P, Limet R. Aortic Valve Replacement in the Octogenarians: Perioperative Outcome and Clinical Follow-Up. *Eur J Cardiothorac Surg*. **1999**. 16(1):68-73.
- Kong A, Gudbjartsson DF, Sainz J, Jonsdottir GM, Gudjonsson SA, Richardsson B, Sigurdardottir S, Barnard J, Hallbeck B, Masson G, Shlien A, Palsson ST, Frigge ML, Thorgeirsson TE, Gulcher JR, Stefansson K. A High-Resolution Recombination Map of the Human Genome. *Nat Genet*. **2002**. 31(3):241-7.
- Koopmann TT, Alders M, Jongbloed RJ, Guerrero S, Mannens MM, Wilde AA, Bezzina CR. Long QT Syndrome Caused by a Large Duplication in the KCNH2 (HERG) Gene Undetectable by Current Polymerase Chain Reaction-Based Exon-Scanning Methodologies. *Heart Rhythm*. **2006**. 3(1):52-5.
- Koopmann TT, Beekman L, Alders M, Meregalli PG, Mannens MM, Moorman AF, Wilde AA, Bezzina CR. Exclusion of Multiple Candidate Genes and Large Genomic Rearrangements in SCN5A in a Dutch Brugada Syndrome Cohort. *Heart Rhythm*. **2007**. 4(6):752-5.
- Kordeli E, Lambert S, Bennett V. AnkyrinG. A New Ankyrin Gene With Neural-Specific Isoforms Localized at the Axonal Initial Segment and Node of Ranvier. *J Biol Chem*. **1995**. 270(5):2352-9.
- Kreuzberg MM, Sohl G, Kim JS, Verselis VK, Willecke K, Bukauskas FF. Functional Properties of Mouse Connexin30.2 Expressed in the Conduction System of the Heart. *Circ Res*. **2005**. 96(11):1169-77.
- Kurz DJ, Kloeckener-Gruissem B, Akhmedov A, Eberli FR, Buhler I, Berger W, Bertel O, Luscher TF. Degenerative Aortic Valve Stenosis, but Not Coronary Disease, Is Associated With Shorter Telomere Length in the Elderly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2006**. 26(6):e114-e117.
- Kyndt F, Gueffet JP, Probst V, Jaafar P, Legendre A, Le Bouffant F, Toquet C, Roy E, McGregor L, Lynch SA, Newbury-Ecob R, Tran V, Young I, Trochu JN, Le Marec H, Schott JJ. Mutations in the Gene Encoding Filamin A As a Cause for Familial Cardiac Valvular Dystrophy. *Circulation*. **2007**. 115(1):40-9.
- 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(25):3081-6.
- Kyndt F, Schott JJ, Trochu JN, Baranger F, Herbert O, Scott V, Fressinaud E, David A, Moisan JP, Bouhour JB, Le Marec H, Benichou B. Mapping of X-Linked Myxomatous Valvular Dystrophy to Chromosome Xq28. *Am J Hum Genet*. **1998**. 62(3):627-32.
- Lahat H, Pras E, Olender T, Avidan N, Ben Asher E, Man O, Levy-Nissenbaum E, Khoury A, Lorber A, Goldman B, Lancet D, Eldar M. A Missense Mutation in a Highly Conserved Region of CASQ2 Is Associated With Autosomal Recessive Catecholamine-Induced Polymorphic Ventricular Tachycardia in Bedouin Families From Israel. *Am J Hum Genet*. **2001**. 69(6):1378-84.
- Lai LP, Su MJ, Yeh HM, Lin JL, Chiang FT, Hwang JJ, Hsu KL, Tseng CD, Lien WP, Tseng YZ, Huang SK. Association of the Human MinK Gene 38G Allele With Atrial Fibrillation: Evidence of Possible Genetic Control on the Pathogenesis of Atrial Fibrillation. *Am Heart J*. **2002**. 144(3):485-90.
- Laitinen PJ, Brown KM, Piippo K, Swan H, Devaney JM, Brahmabhatt 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(4):485-90.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D et al. Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome. *Nature*. **2001**. 409(6822):860-921.
- Laurin N, Brown JP, Morissette J, Raymond V. Recurrent Mutation of the Gene Encoding Sequestosome 1 (SQSTM1/P62) in Paget Disease of Bone. *Am J Hum Genet*. **2002**. 70(6):1582-8.
- Lee TC, Zhao YD, Courtman DW, Stewart DJ. Abnormal Aortic Valve Development in Mice Lacking Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation*. **2000**. 101(20):2345-8.
- Lee YS & Chou YY. Pathogenetic Mechanism of Senile Calcific Aortic Stenosis: the Role of Apoptosis. *Chin Med J (Engl)*. **1998**. 111(10):934-9.

- Leenhardt A, Lucet V, Denjoy I, Grau F, Ngoc DD, Coumel P. Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia in Children. A 7-Year Follow-Up of 21 Patients. *Circulation*. **1995**. 91(5):1512-9.
- Lehnart SE, Ackerman MJ, Benson DW, Jr., Brugada R, Clancy CE, Donahue JK, George AL, Jr., Grant AO, Groft SC, January CT, Lathrop DA, Lederer WJ, Makielski JC, Mohler PJ, Moss A, Nerbonne JM, Olson TM, Przywara DA, Towbin JA, Wang LH, Marks AR. Inherited Arrhythmias: a National Heart, Lung, and Blood Institute and Office of Rare Diseases Workshop Consensus Report About the Diagnosis, Phenotyping, Molecular Mechanisms, and Therapeutic Approaches for Primary Cardiomyopathies of Gene Mutations Affecting Ion Channel Function. *Circulation*. **2007**. 116(20):2325-45.
- Lei M, Goddard C, Liu J, Leoni AL, Royer A, Fung SS, Xiao G, Ma A, Zhang H, Charpentier F, Vandenberg JI, Colledge WH, Grace AA, Huang CL. Sinus Node Dysfunction Following Targeted Disruption of the Murine Cardiac Sodium Channel Gene *Scn5a*. *J Physiol*. **2005**. 567(Pt 2):387-400.
- Lenegre J. Etiology and Pathology of Bilateral Bundle Branch Block in Relation to Complete Heart Block. *Prog Cardiovasc Dis*. **1964**. 6:409-44.
- Leonoudakis D, Conti LR, Anderson S, Radeke CM, McGuire LM, Adams ME, Froehner SC, Yates JR, III, Vandenberg CA. Protein Trafficking and Anchoring Complexes Revealed by Proteomic Analysis of Inward Rectifier Potassium Channel (Kir2.x)-Associated Proteins. *J Biol Chem*. **2004a**. 279(21):22331-46.
- Leonoudakis D, Conti LR, Radeke CM, McGuire LM, Vandenberg CA. A Multiprotein Trafficking Complex Composed of SAP97, CASK, Veli, and Mint1 Is Associated With Inward Rectifier Kir2 Potassium Channels. *J Biol Chem*. **2004b**. 279(18):19051-63.
- Lev M. Anatomic Basis for Atrioventricular Block. *Am J Med*. **1964**. 37:742-8.
- Liebe V, Brueckmann M, Borggrete M, Kaden JJ. Statin Therapy of Calcific Aortic Stenosis: Hype or Hope? *Eur Heart J*. **2006**. 27(7):773-8.
- Light PE. Familial Wolff-Parkinson-White Syndrome: a Disease of Glycogen Storage or Ion Channel Dysfunction? *J Cardiovasc Electrophysiol*. **2006**. 17 Suppl 1:S158-S161.
- Lindblom D, Lindblom U, Qvist J, Lundstrom H. Long-Term Relative Survival Rates After Heart Valve Replacement. *J Am Coll Cardiol*. **1990**. 15(3):566-73.
- Lindner TH & Hoffmann K. EasyLINKAGE: a PERL Script for Easy and Automated Two-/Multi-Point Linkage Analyses. *Bioinformatics*. **2005**. 21(3):405-7.
- Lindroos M, Kupari M, Heikkila J, Tilvis R. Prevalence of Aortic Valve Abnormalities in the Elderly: an Echocardiographic Study of a Random Population Sample. *J Am Coll Cardiol*. **1993**. 21(5):1220-5.
- Liu F, Arias-Vasquez A, Slegers K, Aulchenko YS, Kayser M, Sanchez-Juan P, Feng BJ, Bertoli-Avella AM, van Swieten J, Axenovich TI, Heutink P, van Broeckhoven C, Oostra BA, van Duijn CM. A Genomewide Screen for Late-Onset Alzheimer Disease in a Genetically Isolated Dutch Population. *Am J Hum Genet*. **2007**. 81(1):17-31.
- Livak KJ & Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. **2001**. 25(4):402-8.
- Lo CW. Role of Gap Junctions in Cardiac Conduction and Development: Insights From the Connexin Knockout Mice. *Circ Res*. **2000**. 87(5):346-8.
- London B, Michalec M, Mehdi H, Zhu X, Kerchner L, Sanyal S, Viswanathan PC, Pfahnl AE, Shang LL, Madhusudanan M, Baty CJ, Lagana S, Aleong R, Gutmann R, Ackerman MJ, McNamara DM, Weiss R, Dudley SC, Jr. Mutation in Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1 Like Gene (GPD1-L) Decreases Cardiac Na⁺ Current and Causes Inherited Arrhythmias. *Circulation*. **2007**.
- Loots G & Ovcharenko I. ECRbase: Database of Evolutionary Conserved Regions, Promoters, and Transcription Factor Binding Sites in Vertebrate Genomes. *Bioinformatics*. **2007**. 23(1):122-4.
- Loots GG & Ovcharenko I. RVISTA 2.0: Evolutionary Analysis of Transcription Factor Binding Sites. *Nucleic Acids Res*. **2004**. 32(Web Server issue):W217-W221.

- Lopez-Santiago LF, Meadows LS, Ernst SJ, Chen C, Malhotra JD, McEwen DP, Speelman A, Noebels JL, Maier SK, Lopatin AN, Isom LL. Sodium Channel Scn1b Null Mice Exhibit Prolonged QT and RR Intervals. *J Mol Cell Cardiol.* **2007**.
- Lowe JS, Palygin O, Bhasin N, Hund TJ, Boyden PA, Shibata E, Anderson ME, Mohler PJ. Voltage-Gated Nav Channel Targeting in the Heart Requires an Ankyrin-G Dependent Cellular Pathway. *J Cell Biol.* **2008**.
- Lundby A, Ravn LS, Svendsen JH, Hauns S, Olesen SP, Schmitt N. KCNE3 Mutation V17M Identified in a Patient With Lone Atrial Fibrillation. *Cell Physiol Biochem.* **2008**. 21(1-3):47-54.
- Luo G, Ducey P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G. Spontaneous Calcification of Arteries and Cartilage in Mice Lacking Matrix GLA Protein. *Nature.* **1997**. 386(6620):78-81.
- Lux SE, Tse WT, Menninger JC, John KM, Harris P, Shalev O, Chilcote RR, Marchesi SL, Watkins PC, Bennett V, et al. Hereditary Spherocytosis Associated With Deletion of Human Erythrocyte Ankyrin Gene on Chromosome 8. *Nature.* **1990**. 345(6277):736-9.
- Maher ER, Young G, Smyth-Walsh B, Pugh S, Curtis JR. Aortic and Mitral Valve Calcification in Patients With End-Stage Renal Disease. *Lancet.* **1987**. 2(8564):875-7.
- Maier LS & Bers DM. Role of Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase (CaMK) in Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Cardiovasc Res.* **2007**. 73(4):631-40.
- 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(3):628-34.
- Makita N, Sumitomo N, Watanabe I, Tsutsui H. Novel SCN5A Mutation (Q55X) Associated With Age-Dependent Expression of Brugada Syndrome Presenting As Neurally Mediated Syncope. *Heart Rhythm.* **2007**. 4(4):516-9.
- Malhotra JD, Thyagarajan V, Chen C, Isom LL. Tyrosine-Phosphorylated and Nonphosphorylated Sodium Channel Beta1 Subunits Are Differentially Localized in Cardiac Myocytes. *J Biol Chem.* **2004**. 279(39):40748-54.
- Mangoni ME, Couette B, Bourinet E, Platzer J, Reimer D, Striessnig J, Nargeot J. Functional Role of L-Type Cav1.3 Ca²⁺ Channels in Cardiac Pacemaker Activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2003**. 100(9):5543-8.
- Mantripragada KK, Tapia-Paez I, Blennow E, Nilsson P, Wedell A, Dumanski JP. DNA Copy-Number Analysis of the 22q11 Deletion-Syndrome Region Using Array-CGH With Genomic and PCR-Based Targets. *Int J Mol Med.* **2004**. 13(2):273-9.
- Mardis ER. Anticipating the 1,000 Dollar Genome. *Genome Biol.* **2006**. 7(7):112.
- Martin LJ, Ramachandran V, Cripe LH, Hinton RB, Andelfinger G, Tabangin M, Shoener K, Keddache M, Benson DW. Evidence in Favor of Linkage to Human Chromosomal Regions 18q, 5q and 13q for Bicuspid Aortic Valve and Associated Cardiovascular Malformations. *Hum Genet.* **2007a**. 121(2):275-84.
- Martin MM, Buckenberger JA, Jiang J, Malana GE, Nuovo GJ, Chotani M, Feldman DS, Schmittgen TD, Elton TS. The Human Angiotensin II Type 1 Receptor +1166 A/C Polymorphism Attenuates MicroRNA-155 Binding. *J Biol Chem.* **2007b**. 282(33):24262-9.
- Mathieu P, Voisine P, Pepin A, Shetty R, Savard N, Dagenais F. Calcification of Human Valve Interstitial Cells Is Dependent on Alkaline Phosphatase Activity. *J Heart Valve Dis.* **2005**. 14(3):353-7.
- Maximov A, Sudhof TC, Bezprozvanny I. Association of Neuronal Calcium Channels With Modular Adaptor Proteins. *J Biol Chem.* **1999**. 274(35):24453-6.
- Mazzone A, Epistolato MC, De Caterina R, Storti S, Vittorini S, Sbrana S, Gianetti J, Bevilacqua S, Glauber M, Biagini A, Tanganelli P. Neovascularization, T-Lymphocyte Infiltration, and Heat Shock Protein-60 Are Biological Hallmarks of an Immunomediated Inflammatory Process in End-Stage Calcified Aortic Valve Stenosis. *J Am Coll Cardiol.* **2004**. 43(9):1670-6.
- McClatchey AI, Cannon SC, Slaugenhaupt SA, Gusella JF. The Cloning and Expression of a Sodium Channel Beta 1-Subunit cDNA From Human Brain. *Hum Mol Genet.* **1993**. 2(6):745-9.

- McDonald K & Maurer BJ. Familial Aortic Valve Disease: Evidence for a Genetic Influence? *Eur Heart J.* **1989.** 10(7):676-7.
- McLoughlin MJ, Pasternac A, Morch J, Wigle ED. Idiopathic Calcification of the Ascending Aorta and Aortic Valve in Two Young Women. *Br Heart J.* **1974.** 36(1):96-100.
- McNair WP, Ku L, Taylor MR, Fain PR, Dao D, Wolfel E, Mestroni L. SCN5A Mutation Associated With Dilated Cardiomyopathy, Conduction Disorder, and Arrhythmia. *Circulation.* **2004.** 110(15):2163-7.
- Meadows LS & Isom LL. Sodium Channels As Macromolecular Complexes: Implications for Inherited Arrhythmia Syndromes. *Cardiovasc Res.* **2005.** 67(3):448-58.
- Medeiros-Domingo A, Kaku T, Tester DJ, Iturralde-Torres P, Itty A, Ye B, Valdivia C, Ueda K, Canizales-Quinteros S, Tusie-Luna MT, Makielski JC, Ackerman MJ. SCN4B-Encoded Sodium Channel Beta4 Subunit in Congenital Long-QT Syndrome. *Circulation.* **2007.** 116(2):134-42.
- Mehta PK & Griendling KK. Angiotensin II Cell Signaling: Physiological and Pathological Effects in the Cardiovascular System. *Am J Physiol Cell Physiol.* **2007.** 292(1):C82-C97.
- Messika-Zeitoun D, Aubry MC, Detaint D, Bielak LF, Peyser PA, Sheedy PF, Turner ST, Breen JF, Scott C, Tajik AJ, Enriquez-Sarano M. Evaluation and Clinical Implications of Aortic Valve Calcification Measured by Electron-Beam Computed Tomography. *Circulation.* **2004.** 110(3):356-62.
- 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(2):151-7.
- Miwa K, Asano M, Horai R, Iwakura Y, Nagata S, Suda T. Caspase 1-Independent IL-1beta Release and Inflammation Induced by the Apoptosis Inducer Fas Ligand. *Nat Med.* **1998.** 4(11):1287-92.
- 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(5):1061-70.
- Moe SM & Chen NX. Pathophysiology of Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *Circ Res.* **2004.** 95(6):560-7.
- Moe SM, Reslerova M, Ketteler M, O'Neill K, Duan D, Koczman J, Westenfeld R, Jahnen-Dechent W, Chen NX. Role of Calcification Inhibitors in the Pathogenesis of Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease (CKD). *Kidney Int.* **2005.** 67(6):2295-304.
- Mohler ER. Mechanisms of Aortic Valve Calcification. *Am J Cardiol.* **2004.** 94(11):1396-402, A6.
- Mohler ER, Adam LP, McClelland P, Graham L, Hathaway DR. Detection of Osteopontin in Calcified Human Aortic Valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **1997.** 17(3):547-52.
- Mohler ER, Chawla MK, Chang AW, Vyavahare N, Levy RJ, Graham L, Gannon FH. Identification and Characterization of Calcifying Valve Cells From Human and Canine Aortic Valves. *J Heart Valve Dis.* **1999.** 8(3):254-60.
- Mohler ER, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keane MG, Kaplan FS. Bone Formation and Inflammation in Cardiac Valves. *Circulation.* **2001.** 103(11):1522-8.
- Mohler ER, Sheridan MJ, Nichols R, Harvey WP, Waller BF. Development and Progression of Aortic Valve Stenosis: Atherosclerosis Risk Factors--a Causal Relationship? A Clinical Morphologic Study. *Clin Cardiol.* **1991.** 14(12):995-9.
- Mohler PJ. Ankyrins and Human Disease: What the Electrophysiologist Should Know. *J Cardiovasc Electrophysiol.* **2006.** 17(10):1153-9.
- Mohler PJ & Bennett V. Ankyrin-Based Cardiac Arrhythmias: a New Class of Channelopathies Due to Loss of Cellular Targeting. *Curr Opin Cardiol.* **2005.** 20(3):189-93.
- Mohler PJ, Davis JQ, Bennett V. Ankyrin-B Coordinates the Na/K ATPase, Na/Ca Exchanger, and InsP3 Receptor in a Cardiac T-Tubule/SR Microdomain. *PLoS Biol.* **2005.** 3(12):e423.

- Mohler PJ, Davis JQ, Davis LH, Hoffman JA, Michaely P, Bennett V. Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Localization and Stability in Neonatal Cardiomyocytes Requires Interaction With Ankyrin-B. *J Biol Chem.* **2004a.** 279(13):12980-7.
- Mohler PJ, Gramolini AO, Bennett V. Ankyrins. *J Cell Sci.* **2002a.** 115(Pt 8):1565-6.
- Mohler PJ, Gramolini AO, Bennett V. The Ankyrin-B C-Terminal Domain Determines Activity of Ankyrin-B/G Chimeras in Rescue of Abnormal Inositol 1,4,5-Trisphosphate and Ryanodine Receptor Distribution in Ankyrin-B (-/-) Neonatal Cardiomyocytes. *J Biol Chem.* **2002b.** 277(12):10599-607.
- Mohler PJ, Healy JA, Xue H, Puca AA, Kline CF, Rand AR, Kranias EG, Rockman HA, Bennett V. Ankyrin-B Syndrome: Enhanced Cardiac Function Balanced by Risk of Cardiac Death and Premature Senescence. *PLoS ONE.* **2007.** 2(10):e1051.
- Mohler PJ, Hoffman JA, Davis JQ, Abdi KM, Kim CR, Jones SK, Davis LH, Roberts KF, Bennett V. Isoform Specificity Among Ankyrins. An Amphipathic Alpha-Helix in the Divergent Regulatory Domain of Ankyrin-b Interacts With the Molecular Co-Chaperone Hdj1/Hsp40. *J Biol Chem.* **2004b.** 279(24):25798-804.
- Mohler PJ, Rivolta I, Napolitano C, LeMaillet G, Lambert S, Priori SG, Bennett V. Nav1.5 E1053K Mutation Causing Brugada Syndrome Blocks Binding to Ankyrin-G and Expression of Nav1.5 on the Surface of Cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2004c.** 101(50):17533-8.
- Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, Dilly KW, Guatimosim S, duBell WH, Song LS, Haugroge K, Kyndt F, Ali ME, Rogers TB, Lederer WJ, Escande D, Le Marec H, Bennett V. Ankyrin-B Mutation Causes Type 4 Long-QT Cardiac Arrhythmia and Sudden Cardiac Death. *Nature.* **2003.** 421(6923):634-9.
- Mohler PJ, Splawski I, Napolitano C, Bottelli G, Sharpe L, Timothy K, Priori SG, Keating MT, Bennett V. A Cardiac Arrhythmia Syndrome Caused by Loss of Ankyrin-B Function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2004d.** 101(24):9137-42.
- Mohler PJ, Yoon W, Bennett V. Ankyrin-B Targets Beta2-Spectrin to an Intracellular Compartment in Neonatal Cardiomyocytes. *J Biol Chem.* **2004e.** 279(38):40185-93.
- Mönckeberg JG. [Über Die Reine Mediaverkalkung Der Extremitätenarterien Und Ihr Verhalten Zur Arteriosklerose]. *Virchows Arch.* **1903.** 171(1):141-67.
- Mönckeberg JG. [Der Normale Histologische Bau Und Die Sklerose Der Aortenklappen]. *Virchows Arch.* **1904.** 176(3):472-514.
- Morgan K, Stevens EB, Shah B, Cox PJ, Dixon AK, Lee K, Pinnock RD, Hughes J, Richardson PJ, Mizuguchi K, Jackson AP. Beta 3: an Additional Auxiliary Subunit of the Voltage-Sensitive Sodium Channel That Modulates Channel Gating With Distinct Kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2000.** 97(5):2308-13.
- Moric E, Herbert E, Trusz-Gluza M, Filipecki A, Mazurek U, Wilczok T. The Implications of Genetic Mutations in the Sodium Channel Gene (SCN5A). *Europace.* **2003.** 5(4):325-34.
- Morita H, Kusano-Fukushima K, Nagase S, Fujimoto Y, Hisamatsu K, Fujio H, Haraoka K, Kobayashi M, Morita ST, Nakamura K, Emori T, Matsubara H, Hina K, Kita T, Fukatani M, Ohe T. Atrial Fibrillation and Atrial Vulnerability in Patients With Brugada Syndrome. *J Am Coll Cardiol.* **2002.** 40(8):1437-44.
- Morton NE. Sequential Tests for the Detection of Linkage. *Am J Hum Genet.* **1955.** 7(3):277-318.
- Morton NE. Linkage Disequilibrium Maps and Association Mapping. *J Clin Invest.* **2005.** 115(6):1425-30.
- Mosavi LK, Cammett TJ, Desrosiers DC, Peng ZY. The Ankyrin Repeat As Molecular Architecture for Protein Recognition. *Protein Sci.* **2004.** 13(6):1435-48.
- Moss AJ, Schwartz PJ, Crampton RS, Tzivoni D, Locati EH, MacCluer J, Hall WJ, Weitkamp L, Vincent GM, Garson A, Jr., . The Long QT Syndrome. Prospective Longitudinal Study of 328 Families. *Circulation.* **1991.** 84(3):1136-44.
- 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(10):2929-34.

- Moura LM, Ramos SF, Zamorano JL, Barros IM, Azevedo LF, Rocha-Goncalves F, Rajamannan NM. Rosuvastatin Affecting Aortic Valve Endothelium to Slow the Progression of Aortic Stenosis. *J Am Coll Cardiol*. **2007**. 49(5):554-61.
- Munroe PB, Olgunturk RO, Fryns JP, Van Maldergem L, Zierysen F, Yuksel B, Gardiner RM, Chung E. Mutations in the Gene Encoding the Human Matrix Gla Protein Cause Keutel Syndrome. *Nat Genet*. **1999**. 21(1):142-4.
- Murray JC, Buetow KH, Weber JL, Ludwigsen S, Scherpbier-Heddema T, Manion F, Quillen J, Sheffield VC, Sunden S, Duyk GM, . A Comprehensive Human Linkage Map With Centimorgan Density. Cooperative Human Linkage Center (CHLC). *Science*. **1994**. 265(5181):2049-54.
- Nademanee K. Sudden Unexplained Death Syndrome in Southeast Asia. *Am J Cardiol*. **1997**. 79(6A):10-1.
- Nademanee K, Veerakul G, Nimmannit S, Chaowakul V, Bhuripanyo K, Likittanasombat K, Tunsanga K, Kuasirikul S, Malasit P, Tansupasawadikul S, Tatsanavivat P. Arrhythmogenic Marker for the Sudden Unexplained Death Syndrome in Thai Men. *Circulation*. **1997**. 96(8):2595-600.
- Nagase S, Kusano KF, Morita H, Fujimoto Y, Kakishita M, Nakamura K, Emori T, Matsubara H, Ohe T. Epicardial Electrogram of the Right Ventricular Outflow Tract in Patients With the Brugada Syndrome: Using the Epicardial Lead. *J Am Coll Cardiol*. **2002**. 39(12):1992-5.
- Napolitano C & Priori SG. Genetics of Ventricular Tachycardia. *Curr Opin Cardiol*. **2002**. 17(3):222-8.
- 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(23):2975-80.
- Napolitano C, Rivolta I, Priori SG. Cardiac Sodium Channel Diseases. *Clin Chem Lab Med*. **2003**. 41(4):439-44.
- Nesta F, Leyne M, Yosefy C, Simpson C, Dai D, Marshall JE, Hung J, Slaugenhaupt SA, Levine RA. New Locus for Autosomal Dominant Mitral Valve Prolapse on Chromosome 13: Clinical Insights From Genetic Studies. *Circulation*. **2005**. 112(13):2022-30.
- Newton-Cheh C & Hirschhorn JN. Genetic Association Studies of Complex Traits: Design and Analysis Issues. *Mutat Res*. **2005**. 573(1-2):54-69.
- Newton-Cheh C, Larson MG, Corey DC, Benjamin EJ, Herbert AG, Levy D, D'Agostino RB, O'Donnell CJ. QT Interval Is a Heritable Quantitative Trait With Evidence of Linkage to Chromosome 3 in a Genome-Wide Linkage Analysis: The Framingham Heart Study. *Heart Rhythm*. **2005**. 2(3):277-84.
- Newton-Cheh C & Shah R. Genetic Determinants of QT Interval Variation and Sudden Cardiac Death. *Curr Opin Genet Dev*. **2007**. 17(3):213-21.
- Neyroud N, Tesson F, Denjoy I, Leibovici M, Donger C, Barhanin J, Faure S, Gary F, Coumel P, Petit C, Schwartz K, Guicheney P. A Novel Mutation in the Potassium Channel Gene KVLQT1 Causes the Jervell and Lange-Nielsen Cardioauditory Syndrome. *Nat Genet*. **1997**. 15(2):186-9.
- NIH/CEPH Collaborative Mapping Group. A Comprehensive Genetic Linkage Map of the Human Genome. *Science*. **1992**. 258(5079):67-86.
- Niu DM, Hwang B, Hwang HW, Wang NH, Wu JY, Lee PC, Chien JC, Shieh RC, Chen YT. A Common SCN5A Polymorphism Attenuates a Severe Cardiac Phenotype Caused by a Nonsense SCN5A Mutation in a Chinese Family With an Inherited Cardiac Conduction Defect. *J Med Genet*. **2006**. 43(10):817-21.
- Novaro GM, Sachar R, Pearce GL, Sprecher DL, Griffin BP. Association Between Apolipoprotein E Alleles and Calcific Valvular Heart Disease. *Circulation*. **2003**. 108(15):1804-8.
- Novaro GM, Tiong IY, Pearce GL, Lauer MS, Sprecher DL, Griffin BP. Effect of Hydroxymethylglutaryl Coenzyme a Reductase Inhibitors on the Progression of Calcific Aortic Stenosis. *Circulation*. **2001**. 104(18):2205-9.
- Novik KL, Nimmrich I, Genc B, Maier S, Piepenbrock C, Olek A, Beck S. Epigenomics: Genome-Wide Study of Methylation Phenomena. *Curr Issues Mol Biol*. **2002**. 4(4):111-28.
- O'Brien KD. Pathogenesis of Calcific Aortic Valve Disease: a Disease Process Comes of Age (and a Good Deal More). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2006**. 26(8):1721-8.

- O'Brien KD, Kuusisto J, Reichenbach DD, Ferguson M, Giachelli C, Alpers CE, Otto CM. Osteopontin Is Expressed in Human Aortic Valvular Lesions. *Circulation*. **1995**. 92(8):2163-8.
- O'Brien KD, Probstfield JL, Caulfield MT, Nasir K, Takasu J, Shavelle DM, Wu AH, Zhao XQ, Budoff MJ. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors and Change in Aortic Valve Calcium. *Arch Intern Med*. **2005**. 165(8):858-62.
- O'Brien KD, Reichenbach DD, Marcovina SM, Kuusisto J, Alpers CE, Otto CM. Apolipoproteins B, (a), and E Accumulate in the Morphologically Early Lesion of 'Degenerative' Valvular Aortic Stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **1996**. 16(4):523-32.
- O'Brien KD, Shavelle DM, Caulfield MT, McDonald TO, Olin-Lewis K, Otto CM, Probstfield JL. Association of Angiotensin-Converting Enzyme With Low-Density Lipoprotein in Aortic Valvular Lesions and in Human Plasma. *Circulation*. **2002**. 106(17):2224-30.
- Oberti C, Wang L, Li L, Dong J, Rao S, Du W, Wang Q. Genome-Wide Linkage Scan Identifies a Novel Genetic Locus on Chromosome 5p13 for Neonatal Atrial Fibrillation Associated With Sudden Death and Variable Cardiomyopathy. *Circulation*. **2004**. 110(25):3753-9.
- Olson TM, Alekseev AE, Liu XK, Park S, Zingman LV, Bienengraeber M, Sattiraju S, Ballew JD, Jahangir A, Terzic A. Kv1.5 Channelopathy Due to KCNA5 Loss-of-Function Mutation Causes Human Atrial Fibrillation. *Hum Mol Genet*. **2006**. 15(14):2185-91.
- Olson TM, Alekseev AE, Moreau C, Liu XK, Zingman LV, Miki T, Seino S, Asirvatham SJ, Jahangir A, Terzic A. KATP Channel Mutation Confers Risk for Vein of Marshall Adrenergic Atrial Fibrillation. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. **2007**. 4(2):110-6.
- 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(4):447-54.
- Olsson M, Dalsgaard CJ, Haegerstrand A, Rosenqvist M, Ryden L, Nilsson J. Accumulation of T Lymphocytes and Expression of Interleukin-2 Receptors in Nonrheumatic Stenotic Aortic Valves. *J Am Coll Cardiol*. **1994**. 23(5):1162-70.
- Olsson M, Thyberg J, Nilsson J. Presence of Oxidized Low Density Lipoprotein in Nonrheumatic Stenotic Aortic Valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **1999**. 19(5):1218-22.
- Ortlepp JR, Breithardt O, Ohme F, Hanrath P, Hoffmann R. Lack of Association Among Five Genetic Polymorphisms of the Renin-Angiotensin System and Cardiac Hypertrophy in Patients With Aortic Stenosis. *Am Heart J*. **2001a**. 141(4):671-6.
- Ortlepp JR, Hoffmann R, Ohme F, Lauscher J, Bleckmann F, Hanrath P. The Vitamin D Receptor Genotype Predisposes to the Development of Calcific Aortic Valve Stenosis. *Heart*. **2001b**. 85(6):635-8.
- Ortlepp JR, Pillich M, Mevissen V, Krantz C, Kimmel M, Autschbach R, Langebartels G, Erdmann J, Hoffmann R, Zerres K. APOE Alleles Are Not Associated With Calcific Aortic Stenosis. *Heart*. **2006**. 92(10):1463-6.
- Ortlepp JR, Schmitz F, Mevissen V, Weiss S, Huster J, Dronskowski R, Langebartels G, Autschbach R, Zerres K, Weber C, Hanrath P, Hoffmann R. The Amount of Calcium-Deficient Hexagonal Hydroxyapatite in Aortic Valves Is Influenced by Gender and Associated With Genetic Polymorphisms in Patients With Severe Calcific Aortic Stenosis. *Eur Heart J*. **2004**. 25(6):514-22.
- Osio A, Tan L, Chen SN, Lombardi R, Nagueh SF, Shete S, Roberts R, Willerson JT, Marian AJ. Myozenin 2 Is a Novel Gene for Human Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ Res*. **2007**. 100(6):766-8.
- Osman L, Chester AH, Amrani M, Yacoub MH, Smolenski RT. A Novel Role of Extracellular Nucleotides in Valve Calcification: a Potential Target for Atorvastatin. *Circulation*. **2006a**. 114(1 Suppl):I566-I572.
- Osman L, Yacoub MH, Latif N, Amrani M, Chester AH. Role of Human Valve Interstitial Cells in Valve Calcification and Their Response to Atorvastatin. *Circulation*. **2006b**. 114(1 Suppl):I547-I552.
- Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, Gown AM, O'Brien KD. Characterization of the Early Lesion of 'Degenerative' Valvular Aortic Stenosis. Histological and Immunohistochemical Studies. *Circulation*. **1994**. 90(2):844-53.

- Otto CM, Lind BK, Kitzman DW, Gersh BJ, Siscovick DS. Association of Aortic-Valve Sclerosis With Cardiovascular Mortality and Morbidity in the Elderly. *N Engl J Med*. **1999**. 341(3):142-7.
- Otto CM & O'Brien KD. Why Is There Discordance Between Calcific Aortic Stenosis and Coronary Artery Disease? *Heart*. **2001**. 85(6):601-2.
- Otto E, Kunimoto M, McLaughlin T, Bennett V. Isolation and Characterization of cDNAs Encoding Human Brain Ankyrins Reveal a Family of Alternatively Spliced Genes. *J Cell Biol*. **1991**. 114(2):241-53.
- Ovcharenko I, Nobrega MA, Loots GG, Stubbs L. ECR Browser: a Tool for Visualizing and Accessing Data From Comparisons of Multiple Vertebrate Genomes. *Nucleic Acids Res*. **2004**. 32(Web Server issue):W280-W286.
- Pai RG, Kapoor N, Bansal RC, Varadarajan P. Malignant Natural History of Asymptomatic Severe Aortic Stenosis: Benefit of Aortic Valve Replacement. *Ann Thorac Surg*. **2006**. 82(6):2116-22.
- Palta S, Pai AM, Gill KS, Pai RG. New Insights into the Progression of Aortic Stenosis: Implications for Secondary Prevention. *Circulation*. **2000**. 101(21):2497-502.
- Papadatos GA, Wallerstein PM, Head CE, Ratcliff R, Brady PA, Benndorf K, Saumarez RC, Trezise AE, Huang CL, Vandenberg JI, Colledge WH, Grace AA. Slowed Conduction and Ventricular Tachycardia After Targeted Disruption of the Cardiac Sodium Channel Gene *Scn5a*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2002**. 99(9):6210-5.
- Passik CS, Ackermann DM, Pluth JR, Edwards WD. Temporal Changes in the Causes of Aortic Stenosis: a Surgical Pathologic Study of 646 Cases. *Mayo Clin Proc*. **1987**. 62(2):119-23.
- Passman R & Kadish A. Sudden Death Prevention With Implantable Devices. *Circulation*. **2007**. 116(5):561-71.
- Patel SP & Campbell DL. Transient Outward Potassium Current, 'Ito', Phenotypes in the Mammalian Left Ventricle: Underlying Molecular, Cellular and Biophysical Mechanisms. *J Physiol*. **2005**. 569(Pt 1):7-39.
- Peltier M, Trojette F, Sarano ME, Grigioni F, Slama MA, Tribouilloy CM. Relation Between Cardiovascular Risk Factors and Nonrheumatic Severe Calcific Aortic Stenosis Among Patients With a Three-Cuspid Aortic Valve. *Am J Cardiol*. **2003**. 91(1):97-9.
- Peltonen L. Positional Cloning of Disease Genes: Advantages of Genetic Isolates. *Hum Hered*. **2000**. 50(1):66-75.
- Peltonen L & McKusick VA. Genomics and Medicine. Dissecting Human Disease in the Postgenomic Era. *Science*. **2001**. 291(5507):1224-9.
- Peltonen L, Palotie A, Lange K. Use of Population Isolates for Mapping Complex Traits. *Nat Rev Genet*. **2000**. 1(3):182-90.
- Peltonen TO, Taskinen P, Soini Y, Rysa J, Ronkainen J, Ohtonen P, Satta J, Juvonen T, Ruskoaho H, Leskinen H. Distinct Downregulation of C-Type Natriuretic Peptide System in Human Aortic Valve Stenosis. *Circulation*. **2007**. 116(11):1283-9.
- Pennisi DJ, Rentschler S, Gourdie RG, Fishman GI, Mikawa T. Induction and Patterning of the Cardiac Conduction System. *Int J Dev Biol*. **2002**. 46(6):765-75.
- Pereon Y, Lande G, Demolombe S, Nguyen The Tich, Sternberg D, Le Marec H, David A. Paramyotonia Congenita With an SCN4A Mutation Affecting Cardiac Repolarization. *Neurology*. **2003**. 60(2):340-2.
- Peters LL, John KM, Lu FM, Eicher EM, Higgins A, Yialamas M, Turtzo LC, Otsuka AJ, Lux SE. Ank3 (Epithelial Ankyrin), a Widely Distributed New Member of the Ankyrin Gene Family and the Major Ankyrin in Kidney, Is Expressed in Alternatively Spliced Forms, Including Forms That Lack the Repeat Domain. *J Cell Biol*. **1995**. 130(2):313-30.
- Pfeufer A, Jalilzadeh S, Perz S, Mueller JC, Hinterseer M, Illig T, Akyol M, Huth C, Schopfer-Wendels A, Kuch B, Steinbeck G, Holle R, Nabauer M, Wichmann HE, Meitinger T, Kaab S. Common Variants in Myocardial Ion Channel Genes Modify the QT Interval in the General Population: Results From the KORA Study. *Circ Res*. **2005**. 96(6):693-701.
- Pierri H, Higuchi-Dos-Santos MH, Higuchi ML, Palomino S, Sambiasi NV, Demarchi LM, Rodrigues GH, Nussbacher A, Ramires JA, Wajngarten M. Density of Chlamydia Pneumoniae Is Increased in Fibrotic and Calcified Areas of Degenerative Aortic Stenosis. *Int J Cardiol*. **2006**. 108(1):43-7.

- Pinkel D & Albertson DG. Array Comparative Genomic Hybridization and Its Applications in Cancer. *Nat Genet.* **2005.** 37 Suppl:S11-S17.
- Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG. High Resolution Analysis of DNA Copy Number Variation Using Comparative Genomic Hybridization to Microarrays. *Nat Genet.* **1998.** 20(2):207-11.
- Plant LD, Bowers PN, Liu Q, Morgan T, Zhang T, State MW, Chen W, Kittles RA, Goldstein SA. A Common Cardiac Sodium Channel Variant Associated With Sudden Infant Death in African Americans, SCN5A S1103Y. *J Clin Invest.* **2006.** 116(2):430-5.
- 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(4):511-9.
- Platzer J, Engel J, Schrott-Fischer A, Stephan K, Bova S, Chen H, Zheng H, Striessnig J. Congenital Deafness and Sinoatrial Node Dysfunction in Mice Lacking Class D L-Type Ca²⁺ Channels. *Cell.* **2000.** 102(1):89-97.
- Poelzing S, Forleo C, Samodell M, Dudash L, Sorrentino S, Anaclerio M, Troccoli R, Iacoviello M, Romito R, Guida P, Chahine M, Pitzalis M, Deschenes I. SCN5A Polymorphism Restores Trafficking of a Brugada Syndrome Mutation on a Separate Gene. *Circulation.* **2006.** 114(5):368-76.
- Pohle K, Maffert R, Ropers D, Moshage W, Stilianakis N, Daniel WG, Achenbach S. Progression of Aortic Valve Calcification: Association With Coronary Atherosclerosis and Cardiovascular Risk Factors. *Circulation.* **2001.** 104(16):1927-32.
- Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, Jeffrey SS, Botstein D, Brown PO. Genome-Wide Analysis of DNA Copy-Number Changes Using CDNA Microarrays. *Nat Genet.* **1999.** 23(1):41-6.
- Pollex RL & Hegele RA. Copy Number Variation in the Human Genome and Its Implications for Cardiovascular Disease. *Circulation.* **2007.** 115(24):3130-8.
- Pomerance A. Pathogenesis of Aortic Stenosis and Its Relation to Age. *Br Heart J.* **1972.** 34(6):569-74.
- Pond AL & Nerbonne JM. ERG Proteins and Functional Cardiac I(Kr) Channels in Rat, Mouse, and Human Heart. *Trends Cardiovasc Med.* **2001.** 11(7):286-94.
- Post W, Shen H, Damcott C, Arking DE, Kao WH, Sack PA, Ryan KA, Chakravarti A, Mitchell BD, Shuldiner AR. Associations Between Genetic Variants in the NOS1AP (CAPON) Gene and Cardiac Repolarization in the Old Order Amish. *Hum Hered.* **2007.** 64(4):214-9.
- Pourrier M & Nattel S. [Anchoring Proteins and Cardiac Sudden Death: How and Why?]. *Med Sci (Paris).* **2004.** 20(4):437-41.
- Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin Causes Rapid Calcification of the Elastic Lamellae in Rat Arteries and Heart Valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **1998.** 18(9):1400-7.
- Price PA, June HH, Buckley JR, Williamson MK. Osteoprotegerin Inhibits Artery Calcification Induced by Warfarin and by Vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2001.** 21(10):1610-6.
- Priori SG. Inherited Arrhythmogenic Diseases: the Complexity Beyond Monogenic Disorders. *Circ Res.* **2004.** 94(2):140-5.
- Priori SG, Napolitano C, Giordano U, Collisani G, Memmi M. Brugada Syndrome and Sudden Cardiac Death in Children. *Lancet.* **2000a.** 355(9206):808-9.
- Priori SG, Napolitano C, Memmi M, Colombi B, Drago F, Gasparini M, DeSimone L, Coltorti F, Bloise R, Keegan R, Cruz Filho FE, Vignati G, Benatar A, DeLogu A. Clinical and Molecular Characterization of Patients With Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circulation.* **2002.** 106(1):69-74.
- 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.* **2000b.** 102(9):945-7.

- 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(11):1341-4.
- 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(2):196-200.
- Priori SG, Pandit SV, Rivolta I, Berenfeld O, Ronchetti E, Dhamoon A, Napolitano C, Anumonwo J, di Barletta MR, Gudapakkam S, Bosi G, Stramba-Badiale M, Jalife J. A Novel Form of Short QT Syndrome (SQT3) Is Caused by a Mutation in the KCNJ2 Gene. *Circ Res*. **2005**. 96(7):800-7.
- 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(19):1866-74.
- 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(15):2042-8.
- 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 Lenegre Disease. *J Am Coll Cardiol*. **2003**. 41(4):643-52.
- Proudfoot D, Skepper JN, Shanahan CM, Weissberg PL. Calcification of Human Vascular Cells in Vitro Is Correlated With High Levels of Matrix Gla Protein and Low Levels of Osteopontin Expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **1998**. 18(3):379-88.
- Qin N, D'Andrea MR, Lubin ML, Shafae N, Codd EE, Correa AM. Molecular Cloning and Functional Expression of the Human Sodium Channel Beta1B Subunit, a Novel Splicing Variant of the Beta1 Subunit. *Eur J Biochem*. **2003**. 270(23):4762-70.
- Rahimtoola SH. Choice of Prosthetic Heart Valve for Adult Patients. *J Am Coll Cardiol*. **2003**. 41(6):893-904.
- Rajamannan NM, Bonow RO, Rahimtoola SH. Calcific Aortic Stenosis: an Update. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. **2007**. 4(5):254-62.
- Rajamannan NM, Gersh B, Bonow RO. Calcific Aortic Stenosis: From Bench to the Bedside--Emerging Clinical and Cellular Concepts. *Heart*. **2003a**. 89(7):801-5.
- Rajamannan NM, Nealis TB, Subramaniam M, Pandya S, Stock SR, Ignatiev CI, Sebo TJ, Rosengart TK, Edwards WD, McCarthy PM, Bonow RO, Spelsberg TC. Calcified Rheumatic Valve Neoangiogenesis Is Associated With Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Osteoblast-Like Bone Formation. *Circulation*. **2005a**. 111(24):3296-301.
- Rajamannan NM, Sangiorgi G, Springett M, Arnold K, Mohacsi T, Spagnoli LG, Edwards WD, Tajik AJ, Schwartz RS. Experimental Hypercholesterolemia Induces Apoptosis in the Aortic Valve. *J Heart Valve Dis*. **2001**. 10(3):371-4.
- Rajamannan NM, Subramaniam M, Caira F, Stock SR, Spelsberg TC. Atorvastatin Inhibits Hypercholesterolemia-Induced Calcification in the Aortic Valves Via the Lrp5 Receptor Pathway. *Circulation*. **2005b**. 112(9 Suppl):I229-I234.
- Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, Stock SR, Donovan J, Springett M, Orszulak T, Fullerton DA, Tajik AJ, Bonow RO, Spelsberg T. Human Aortic Valve Calcification Is Associated With an Osteoblast Phenotype. *Circulation*. **2003b**. 107(17):2181-4.
- Rajamannan NM, Subramaniam M, Springett M, Sebo TC, Niekrasz M, McConnell JP, Singh RJ, Stone NJ, Bonow RO, Spelsberg TC. Atorvastatin Inhibits Hypercholesterolemia-Induced Cellular Proliferation and Bone Matrix Production in the Rabbit Aortic Valve. *Circulation*. **2002**. 105(22):2660-5.
- Rajamannan NM, Subramaniam M, Stock SR, Stone NJ, Springett M, Ignatiev KI, McConnell JP, Singh RJ, Bonow RO, Spelsberg TC. Atorvastatin Inhibits Calcification and Enhances Nitric Oxide Synthase Production in the Hypercholesterolaemic Aortic Valve. *Heart*. **2005c**. 91(6):806-10.

- Rakyan VK, Hildmann T, Novik KL, Lewin J, Tost J, Cox AV, Andrews TD, Howe KL, Otto T, Olek A, Fischer J, Gut IG, Berlin K, Beck S. DNA Methylation Profiling of the Human Major Histocompatibility Complex: a Pilot Study for the Human Epigenome Project. *PLoS Biol.* **2004**. 2(12):e405.
- Rallidis L, Naoumova RP, Thompson GR, Nihoyannopoulos P. Extent and Severity of Atherosclerotic Involvement of the Aortic Valve and Root in Familial Hypercholesterolaemia. *Heart.* **1998**. 80(6):583-90.
- Ravens U & Wettwer E. Electrophysiological Aspects of Changes in Heart Rate. *Basic Res Cardiol.* **1998**. 93 Suppl 1:60-5.
- Ravn LS, Aizawa Y, Pollevick GD, Hofman-Bang J, Cordeiro JM, Dixen U, Jensen G, Wu Y, Burashnikov E, Haunso S, Guericoff A, Hu D, Svendsen JH, Christiansen M, Antzelevitch C. Gain of Function in I(Ks) Secondary to a Mutation in KCNE5 Associated With Atrial Fibrillation. *Heart Rhythm.* **2008**. 5(3):427-35.
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, Gonzalez JR, Gratacos M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME. Global Variation in Copy Number in the Human Genome. *Nature.* **2006**. 444(7118):444-54.
- Reid DS, Tynan M, Braidwood L, Fitzgerald GR. Bidirectional Tachycardia in a Child. A Study Using His Bundle Electrography. *Br Heart J.* **1975**. 37(3):339-44.
- Remme CA, Verkerk AO, Nuyens D, van Ginneken AC, van Brunschot S, Belterman CN, Wilders R, van Roon MA, Tan HL, Wilde AA, Carmeliet P, de Bakker JM, Veldkamp MW, Bezzina CR. Overlap Syndrome of Cardiac Sodium Channel Disease in Mice Carrying the Equivalent Mutation of Human SCN5A-1795insD. *Circulation.* **2006**. 114(24):2584-94.
- Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, Jahnen-Dechent W, Weissberg PL, Shanahan CM. Human Vascular Smooth Muscle Cells Undergo Vesicle-Mediated Calcification in Response to Changes in Extracellular Calcium and Phosphate Concentrations: a Potential Mechanism for Accelerated Vascular Calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol.* **2004**. 15(11):2857-67.
- Roberts R & Brugada R. Genetics and Arrhythmias. *Annu Rev Med.* **2003**. 54:257-67.
- Roberts WC & Ko JM. Frequency by Decades of Unicuspid, Bicuspid, and Tricuspid Aortic Valves in Adults Having Isolated Aortic Valve Replacement for Aortic Stenosis, With or Without Associated Aortic Regurgitation. *Circulation.* **2005**. 111(7):920-5.
- Roden DM & Viswanathan PC. Genetics of Acquired Long QT Syndrome. *J Clin Invest.* **2005**. 115(8):2025-32.
- Romano C, Gemme G, Pongiglione R. [Rare Cardiac Arrhythmias of the Pediatric Age. II. Syncopal Attacks Due to Paroxysmal Ventricular Fibrillation]. *Clin Pediatr (Bologna).* **1963**. 45:656-83.
- Rose AG. Failure to Detect Chlamydia Pneumoniae in Senile Calcific Aortic Stenosis or Calcified Congenital Bicuspid Aortic Valve by Immunofluorescence, Polymerase Chain Reaction and Electron Microscopy. *Cardiovasc Pathol.* **2002**. 11(5):300-4.
- Rose AG & Forman R. Idiopathic Aortitis With Calcification of Ascending Aorta, and Aortic and Mitral Valves. *Br Heart J.* **1976**. 38(6):650-2.
- Rosenberg MJ, Agarwala R, Bouffard G, Davis J, Fiermonte G, Hilliard MS, Koch T, Kalikin LM, Makalowska I, Morton DH, Petty EM, Weber JL, Palmieri F, Kelley RI, Schaffer AA, Biesecker LG. Mutant Deoxynucleotide Carrier Is Associated With Congenital Microcephaly. *Nat Genet.* **2002**. 32(1):175-9.
- Rosenhek R, Binder T, Porenta G, Lang I, Christ G, Schemper M, Maurer G, Baumgartner H. Predictors of Outcome in Severe, Asymptomatic Aortic Stenosis. *N Engl J Med.* **2000**. 343(9):611-7.
- Rosenhek R, Klaar U, Schemper M, Scholten C, Heger M, Gabriel H, Binder T, Maurer G, Baumgartner H. Mild and Moderate Aortic Stenosis. Natural History and Risk Stratification by Echocardiography. *Eur Heart J.* **2004a**. 25(3):199-205.

- Rosenhek R, Rader F, Loho N, Gabriel H, Heger M, Klaar U, Schemper M, Binder T, Maurer G, Baumgartner H. Statins but Not Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors Delay Progression of Aortic Stenosis. *Circulation*. **2004b**. 110(10):1291-5.
- Rossebo AB, Pedersen TR, Allen C, Boman K, Chambers J, Egstrup K, Gerds E, Gohlke-Barwolf C, Holme I, Kesaniemi VA, Malbecq W, Nienaber C, Ray S, Skjaerpe T, Wachtell K, Willenheimer R. Design and Baseline Characteristics of the Simvastatin and Ezetimibe in Aortic Stenosis (SEAS) Study. *Am J Cardiol*. **2007**. 99(7):970-3.
- Rossenbacker T & Priori SG. The Brugada Syndrome. *Curr Opin Cardiol*. **2007**. 22(3):163-70.
- Royer A, van Veen TA, Le Bouter S, Marionneau C, Griol-Charhbil V, Leoni AL, Steenman M, van Rijen HV, Demolombe S, Goddard CA, Richer C, Escoubet B, Jarry-Guichard T, Colledge WH, Gros D, de Bakker JM, Grace AA, Escande D, Charpentier F. Mouse Model of SCN5A-Linked Hereditary Lenegre's Disease: Age-Related Conduction Slowing and Myocardial Fibrosis. *Circulation*. **2005**. 111(14):1738-46.
- Rubart M & Zipes DP. Mechanisms of Sudden Cardiac Death. *J Clin Invest*. **2005**. 115(9):2305-15.
- Rubtsov AM & Lopina OD. Ankyrins. *FEBS Lett*. **2000**. 482(1-2):1-5.
- Ruschendorf F & Nurnberg P. ALOHOMORA: a Tool for Linkage Analysis Using 10K SNP Array Data. *Bioinformatics*. **2005**. 21(9):2123-5.
- Russell MW, Law I, Sholinsky P, Fabsitz RR. Heritability of ECG Measurements in Adult Male Twins. *J Electrocardiol*. **1998**. 30 Suppl:64-8.
- Saffitz JE. Structural Heart Disease, SCN5A Gene Mutations, and Brugada Syndrome: a Complex Menage a Trois. *Circulation*. **2005**. 112(24):3672-4.
- Saffitz JE, Laing JG, Yamada KA. Connexin Expression and Turnover : Implications for Cardiac Excitability. *Circ Res*. **2000**. 86(7):723-8.
- Sanchez PL & Mazzone A. C-Reactive Protein in Degenerative Aortic Valve Stenosis. *Cardiovasc Ultrasound*. **2006**. 4:24.
- Sanchez PL, Santos JL, Kaski JC, Cruz I, Arribas A, Villacorta E, Cascon M, Palacios IF, Martin-Luengo C. Relation of Circulating C-Reactive Protein to Progression of Aortic Valve Stenosis. *Am J Cardiol*. **2006**. 97(1):90-3.
- Sarachek NS & Leonard JL. Familial Heart Block and Sinus Bradycardia. Classification and Natural History. *Am J Cardiol*. **1972**. 29(4):451-8.
- Sarkozy A & Brugada P. Sudden Cardiac Death and Inherited Arrhythmia Syndromes. *J Cardiovasc Electrophysiol*. **2005**. 16 Suppl 1:S8-20.
- Sata M & Walsh K. Endothelial Cell Apoptosis Induced by Oxidized LDL Is Associated With the Down-Regulation of the Cellular Caspase Inhibitor FLIP. *J Biol Chem*. **1998**. 273(50):33103-6.
- Satta J, Melkko J, Pollanen R, Tuukkanen J, Paakko P, Ohtonen P, Mennander A, Soini Y. Progression of Human Aortic Valve Stenosis Is Associated With Tenascin-C Expression. *J Am Coll Cardiol*. **2002**. 39(1):96-101.
- Satta J, Oiva J, Salo T, Eriksen H, Ohtonen P, Biancari F, Juvonen TS, Soini Y. Evidence for an Altered Balance Between Matrix Metalloproteinase-9 and Its Inhibitors in Calcific Aortic Stenosis. *Ann Thorac Surg*. **2003**. 76(3):681-8.
- Saura D, Garcia-Alberola A, Carrillo P, Pascual D, Martinez-Sanchez J, Valdes M. Brugada-Like Electrocardiographic Pattern Induced by Fever. *Pacing Clin Electrophysiol*. **2002**. 25(5):856-9.
- Schafer C, Heiss A, Schwarz A, Westenfeld R, Ketteler M, Floege J, Muller-Esterl W, Schinke T, Jahnke-Dechent W. The Serum Protein Alpha 2-Heremans-Schmid Glycoprotein/Fetuin-A Is a Systemically Acting Inhibitor of Ectopic Calcification. *J Clin Invest*. **2003**. 112(3):357-66.
- Schaub FJ, Han DK, Liles WC, Adams LD, Coats SA, Ramachandran RK, Seifert RA, Schwartz SM, Bowen-Pope DF. Fas/FADD-Mediated Activation of a Specific Program of Inflammatory Gene Expression in Vascular Smooth Muscle Cells. *Nat Med*. **2000**. 6(7):790-6.

- Schimpf R, Wolpert C, Gaita F, Giustetto C, Borggrefe M. Short QT Syndrome. *Cardiovasc Res*. **2005**. 67(3):357-66.
- Schlotterer C. The Evolution of Molecular Markers--Just a Matter of Fashion? *Nat Rev Genet*. **2004**. 5(1):63-9.
- 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(1):20-1.
- 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(5373):108-11.
- Schott JJ, Charpentier F, Peltier S, Foley P, Drouin E, Bouhour JB, Donnelly P, Vergraud G, Bachner L, Moisan JP, . Mapping of a Gene for Long QT Syndrome to Chromosome 4q25-27. *Am J Hum Genet*. **1995**. 57(5):1114-22.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative Quantification of 40 Nucleic Acid Sequences by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification. *Nucleic Acids Res*. **2002**. 30(12):e57.
- Schulze-Bahr E, Eckardt L, Breithardt G, Seidl K, Wichter T, Wolpert C, Borggrefe M, Haverkamp W. Sodium Channel Gene (SCN5A) Mutations in 44 Index Patients With Brugada Syndrome: Different Incidences in Familial and Sporadic Disease. *Hum Mutat*. **2003a**. 21(6):651-2.
- 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*. **2003b**. 111(10):1537-45.
- Schulze-Bahr E, Wang Q, Wedekind H, Haverkamp W, Chen Q, Sun Y, Rubie C, Hordt M, Towbin JA, Borggrefe M, Assmann G, Qu X, Somberg JC, Breithardt G, Oberti C, Funke H. KCNE1 Mutations Cause Jervell and Lange-Nielsen Syndrome. *Nat Genet*. **1997**. 17(3):267-8.
- Schulze-Bahr E. Arrhythmia Predisposition: Between Rare Disease Paradigms and Common Ion Channel Gene Variants. *Journal of the American College of Cardiology*. **2006**. 48(9, Supplement 1):A67-A78.
- Schwartz PJ. The Congenital Long QT Syndromes From Genotype to Phenotype: Clinical Implications. *J Intern Med*. **2006**. 259(1):39-47.
- Schwartz PJ, Priori SG, Napolitano C. How Really Rare Are Rare Diseases?: the Intriguing Case of Independent Compound Mutations in the Long QT Syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol*. **2003**. 14(10):1120-1.
- 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(1):89-95.
- 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(6):783-90.
- Scotland P, Zhou D, Benveniste H, Bennett V. Nervous System Defects of AnkyrinB (-/-) Mice Suggest Functional Overlap Between the Cell Adhesion Molecule L1 and 440-KD AnkyrinB in Premyelinated Axons. *J Cell Biol*. **1998**. 143(5):1305-15.
- Shahi CN, Ghaisas NK, Goggins M, Foley B, Crean P, Kelleher D, Walsh M. Elevated Levels of Circulating Soluble Adhesion Molecules in Patients With Nonrheumatic Aortic Stenosis. *Am J Cardiol*. **1997**. 79(7):980-2.
- Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME. Medial Localization of Mineralization-Regulating Proteins in Association With Monckeberg's Sclerosis: Evidence for Smooth Muscle Cell-Mediated Vascular Calcification. *Circulation*. **1999**. 100(21):2168-76.
- Shao JS, Cheng SL, Pingsterhaus JM, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. Msx2 Promotes Cardiovascular Calcification by Activating Paracrine Wnt Signals. *J Clin Invest*. **2005**. 115(5):1210-20.
- Shavelle DM, Takasu J, Budoff MJ, Mao S, Zhao XQ, O'Brien KD. HMG CoA Reductase Inhibitor (Statin) and Aortic Valve Calcium. *Lancet*. **2002**. 359(9312):1125-6.

- Shendure J, Mitra RD, Varma C, Church GM. Advanced Sequencing Technologies: Methods and Goals. *Nat Rev Genet.* **2004.** 5(5):335-44.
- Sherman J, Tester DJ, Ackerman MJ. Targeted Mutational Analysis of Ankyrin-B in 541 Consecutive, Unrelated Patients Referred for Long QT Syndrome Genetic Testing and 200 Healthy Subjects. *Heart Rhythm.* **2005.** 2(11):1218-23.
- Shifman S & Darvasi A. The Value of Isolated Populations. *Nat Genet.* **2001.** 28(4):309-10.
- Shimizu W, Matsuo K, Kokubo Y, Satomi K, Kurita T, Noda T, Nagaya N, Suyama K, Aihara N, Kamakura S, Inamoto N, Akahoshi M, Tomoike H. Sex Hormone and Gender Difference--Role of Testosterone on Male Predominance in Brugada Syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol.* **2007.** 18(4):415-21.
- Shrivastava-Ranjan P, Faundez V, Fang G, Rees H, Lah JJ, Levey AI, Kahn RA. Mint3/X11{Gamma} Is an ADP-Ribosylation Factor-Dependent Adaptor That Regulates the Traffic of the Alzheimer's Precursor Protein From the Trans-Golgi Network. *Mol Biol Cell.* **2008.** 19(1):51-64.
- Shuraih M, Ai T, Vatta M, Sohma Y, Merkle EM, Taylor E, Li Z, Xi Y, Razavi M, Towbin JA, Cheng J. A Common SCN5A Variant Alters the Responsiveness of Human Sodium Channels to Class I Antiarrhythmic Agents. *J Cardiovasc Electrophysiol.* **2007.** 18(4):434-40.
- Shyu AB, Wilkinson MF, van Hoof A. Messenger RNA Regulation: to Translate or to Degrade. *EMBO J.* **2008.** 27(3):471-81.
- Sicouri S & Antzelevitch C. A Subpopulation of Cells With Unique Electrophysiological Properties in the Deep Subepicardium of the Canine Ventricle. The M Cell. *Circ Res.* **1991.** 68(6):1729-41.
- Simmons CA, Grant GR, Manduchi E, Davies PF. Spatial Heterogeneity of Endothelial Phenotypes Correlates With Side-Specific Vulnerability to Calcification in Normal Porcine Aortic Valves. *Circ Res.* **2005.** 96(7):792-9.
- Skjaerpe T, Hegrenaes L, Hatle L. Noninvasive Estimation of Valve Area in Patients With Aortic Stenosis by Doppler Ultrasound and Two-Dimensional Echocardiography. *Circulation.* **1985.** 72(4):810-8.
- Skowasch D, Schrepf S, Preusse CJ, Likungu JA, Welz A, Luderitz B, Bauriedel G. Tissue Resident C Reactive Protein in Degenerative Aortic Valves: Correlation With Serum C Reactive Protein Concentrations and Modification by Statins. *Heart.* **2006.** 92(4):495-8.
- Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshezhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P. A Genome-Wide Association Study Identifies Novel Risk Loci for Type 2 Diabetes. *Nature.* **2007.** 445(7130):881-5.
- Smits JP, Eckardt L, Probst V, Bezzina CR, Schott JJ, Remme CA, Haverkamp W, Breithardt G, Escande D, Schulze-Bahr E, Le Marec H, Wilde AA. Genotype-Phenotype Relationship in Brugada Syndrome: Electrocardiographic Features Differentiate SCN5A-Related Patients From Non-SCN5A-Related Patients. *J Am Coll Cardiol.* **2002.** 40(2):350-6.
- 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(6):969-81.
- Soini Y, Salo T, Satta J. Angiogenesis Is Involved in the Pathogenesis of Nonrheumatic Aortic Valve Stenosis. *Hum Pathol.* **2003.** 34(8):756-63.
- Soini Y, Satta J, Maatta M, Autio-Harmainen H. Expression of MMP2, MMP9, MT1-MMP, TIMP1, and TIMP2 mRNA in Valvular Lesions of the Heart. *J Pathol.* **2001.** 194(2):225-31.
- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, Cremer T, Lichter P. Matrix-Based Comparative Genomic Hybridization: Biochips to Screen for Genomic Imbalances. *Genes Chromosomes Cancer.* **1997.** 20(4):399-407.
- Somers P, Knaapen M, Kockx M, van Cauwelaert P, Bortier H, Mistiaen W. Histological Evaluation of Autophagic Cell Death in Calcified Aortic Valve Stenosis. *J Heart Valve Dis.* **2006.** 15(1):43-7.
- Speer MY & Giachelli CM. Regulation of Cardiovascular Calcification. *Cardiovasc Pathol.* **2004.** 13(2):63-70.

- Splianakis CG, Laloti MD, Town T, Lee GR, Flavell RA. Interchromosomal Associations Between Alternatively Expressed Loci. *Nature*. **2005**. 435(7042):637-45.
- Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, Napolitano C, Schwartz PJ, Joseph RM, Condouris K, Tager-Flusberg H, Priori SG, Sanguinetti MC, Keating MT. Ca(V)_{1.2} Calcium Channel Dysfunction Causes a Multisystem Disorder Including Arrhythmia and Autism. *Cell*. **2004**. 119(1):19-31.
- Splawski I, Timothy KW, Tateyama M, Clancy CE, Malhotra A, Beggs AH, Cappuccio FP, Sagnella GA, Kass RS, Keating MT. Variant of SCN5A Sodium Channel Implicated in Risk of Cardiac Arrhythmia. *Science*. **2002**. 297(5585):1333-6.
- Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Atkinson DL, Keating MT. Molecular Basis of the Long-QT Syndrome Associated With Deafness. *N Engl J Med*. **1997a**. 336(22):1562-7.
- Splawski I, Tristani-Firouzi M, Lehmann MH, Sanguinetti MC, Keating MT. Mutations in the HminK Gene Cause Long QT Syndrome and Suppress IKs Function. *Nat Genet*. **1997b**. 17(3):338-40.
- Sprecher DL, Schaefer EJ, Kent KM, Gregg RE, Zech LA, Hoeg JM, McManus B, Roberts WC, Brewer HB, Jr. Cardiovascular Features of Homozygous Familial Hypercholesterolemia: Analysis of 16 Patients. *Am J Cardiol*. **1984**. 54(1):20-30.
- Srivatsa SS, Harrity PJ, Maercklein PB, Kleppe L, Veinot J, Edwards WD, Johnson CM, Fitzpatrick LA. Increased Cellular Expression of Matrix Proteins That Regulate Mineralization Is Associated With Calcification of Native Human and Porcine Xenograft Bioprosthetic Heart Valves. *J Clin Invest*. **1997**. 99(5):996-1009.
- Steel KP. One Connexin, Two Diseases. *Nat Genet*. **1998**. 20(4):319-20.
- Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebersold R, Schinke T, Karsenty G, Giachelli CM. Smooth Muscle Cell Phenotypic Transition Associated With Calcification: Upregulation of Cbfa1 and Downregulation of Smooth Muscle Lineage Markers. *Circ Res*. **2001**. 89(12):1147-54.
- Stephan E. Hereditary Bundle Branch System Defect: Survey of a Family With Four Affected Generations. *Am Heart J*. **1978**. 95(1):89-95.
- Stephan E, de Meeus A, Bouvagnet P. Hereditary Bundle Branch Defect: Right Bundle Branch Blocks of Different Causes Have Different Morphologic Characteristics. *Am Heart J*. **1997**. 133(2):249-56.
- Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, Smith VE, Kitzman DW, Otto CM. Clinical Factors Associated With Calcific Aortic Valve Disease. Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol*. **1997**. 29(3):630-4.
- Sumioka A, Saito Y, Sakuma M, Araki Y, Yamamoto T, Suzuki T. The X11L/X11beta/MINT2 and X11L2/X11gamma/MINT3 Scaffold Proteins Shuttle Between the Nucleus and Cytoplasm. *Exp Cell Res*. **2008**. 314(5):1155-62.
- Sumiyoshi M, Nakazato Y, Tokano T, Yasuda M, Minoda Y, Nakata Y, Daida H. Sinus Node Dysfunction Concomitant With Brugada Syndrome. *Circ J*. **2005**. 69(8):946-50.
- Sveinbjornsdottir S, Hicks AA, Jonsson T, Petursson H, Gugmundsson G, Frigge ML, Kong A, Gulcher JR, Stefansson K. Familial Aggregation of Parkinson's Disease in Iceland. *N Engl J Med*. **2000**. 343(24):1765-70.
- Swan H, Piippo K, Viitasalo M, Heikkila P, Paavonen T, Kainulainen K, Kere J, Keto P, Kontula K, Toivonen L. Arrhythmic Disorder Mapped to Chromosome 1q42-Q43 Causes Malignant Polymorphic Ventricular Tachycardia in Structurally Normal Hearts. *J Am Coll Cardiol*. **1999**. 34(7):2035-42.
- Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Candidate-Gene Approaches for Studying Complex Genetic Traits: Practical Considerations. *Nat Rev Genet*. **2002**. 3(5):391-7.
- Tada H, Aihara N, Ohe T, Yutani C, Hamada S, Miyanuma H, Takamiya M, Kamakura S. Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Underlies Syndrome of Right Bundle Branch Block, ST-Segment Elevation, and Sudden Death. *Am J Cardiol*. **1998**. 81(4):519-22.
- Takehara N, Makita N, Kawabe J, Sato N, Kawamura Y, Kitabatake A, Kikuchi K. A Cardiac Sodium Channel Mutation Identified in Brugada Syndrome Associated With Atrial Standstill. *J Intern Med*. **2004**. 255(1):137-42.

- Tan BH, Iturralde-Torres P, Medeiros-Domingo A, Nava S, Tester DJ, Valdivia CR, Tusie-Luna T, Ackerman MJ, Makielski JC. A Novel C-Terminal Truncation SCN5A Mutation From a Patient With Sick Sinus Syndrome, Conduction Disorder and Ventricular Tachycardia. *Cardiovasc Res*. **2007**.
- Tan HL. Sodium Channel Variants in Heart Disease: Expanding Horizons. *J Cardiovasc Electrophysiol*. **2006**. 17 Suppl 1:S151-S157.
- Tan HL, Bardai A, Shimizu W, Moss AJ, Schulze-Bahr E, Noda T, Wilde AA. Genotype-Specific Onset of Arrhythmias in Congenital Long-QT Syndrome: Possible Therapy Implications. *Circulation*. **2006**. 114(20):2096-103.
- Tan HL, Bezzina CR, Smits JP, Verkerk AO, Wilde AA. Genetic Control of Sodium Channel Function. *Cardiovasc Res*. **2003**. 57(4):961-73.
- Tan HL, Bink-Boelkens MT, Bezzina CR, Viswanathan PC, Beaufort-Krol GC, van Tintelen PJ, van den Berg MP, Wilde AA, Balsem JR. A Sodium-Channel Mutation Causes Isolated Cardiac Conduction Disease. *Nature*. **2001**. 409(6823):1043-7.
- Tan HL, Hofman N, Van Langen IM, van der Wal AC, Wilde AA. Sudden Unexplained Death: Heritability and Diagnostic Yield of Cardiologic and Genetic Examination in Surviving Relatives. *Circulation*. **2005**. 112(2):207-13.
- Tanaka K, Sata M, Fukuda D, Suematsu Y, Motomura N, Takamoto S, Hirata Y, Nagai R. Age-Associated Aortic Stenosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *J Am Coll Cardiol*. **2005**. 46(1):134-41.
- Tawil R, Ptacek LJ, Pavlakis SG, DeVivo DC, Penn AS, Ozdemir C, Griggs RC. Andersen's Syndrome: Potassium-Sensitive Periodic Paralysis, Ventricular Ectopy, and Dysmorphic Features. *Ann Neurol*. **1994**. 35(3):326-30.
- Tentolouris C, Kontozoglou T, Toutouzias P. Familial Calcification of Aorta and Calcific Aortic Valve Disease Associated With Immunologic Abnormalities. *Am Heart J*. **1993**. 126(4):904-9.
- Tester DJ & Ackerman MJ. Postmortem Long QT Syndrome Genetic Testing for Sudden Unexplained Death in the Young. *J Am Coll Cardiol*. **2007**. 49(2):240-6.
- Tester DJ, Arya P, Will M, Haglund CM, Farley AL, Makielski JC, Ackerman MJ. Genotypic Heterogeneity and Phenotypic Mimicry Among Unrelated Patients Referred for Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia Genetic Testing. *Heart Rhythm*. **2006a**. 3(7):800-5.
- Tester DJ, Cronk LB, Carr JL, Schulz V, Salisbury BA, Judson RS, Ackerman MJ. Allelic Dropout in Long QT Syndrome Genetic Testing: a Possible Mechanism Underlying False-Negative Results. *Heart Rhythm*. **2006b**. 3(7):815-21.
- 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(10):1099-105.
- The ENCODE Project Consortium. The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project. *Science*. **2004**. 306(5696):636-40.
- The International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature*. **2003**. 426(6968):789-96.
- The International HapMap Consortium. A Haplotype Map of the Human Genome. *Nature*. **2005**. 437(7063):1299-320.
- The International HapMap Consortium. A Second Generation Human Haplotype Map of Over 3.1 Million SNPs. *Nature*. **2007**. 449(7164):851-61.
- The Utah Marker Development Group. A Collection of Ordered Tetranucleotide-Repeat Markers From the Human Genome. *Am J Hum Genet*. **1995**. 57(3):619-28.
- The Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-Wide Association Study of 14,000 Cases of Seven Common Diseases and 3,000 Shared Controls. *Nature*. **2007**. 447(7145):661-78.

- Tirkkonen M, Tanner M, Karhu R, Kallioniemi A, Isola J, Kallioniemi OP. Molecular Cytogenetics of Primary Breast Cancer by CGH. *Genes Chromosomes Cancer*. **1998**. 21(3):177-84.
- Tiso N, Stephan DA, Nava A, Bagattin A, Devaney JM, Stanchi F, Larderet G, Brahmbhatt 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(3):189-94.
- Tomaselli GF. A Failure to Adapt: Ankyrins in Congenital and Acquired Arrhythmias. *Circulation*. **2007**. 115(4):428-9.
- Torun D, Sezer S, Baltali M, Adam FU, Erdem A, Ozdemir FN, Haberal M. Association of Cardiac Valve Calcification and Inflammation in Patients on Hemodialysis. *Ren Fail*. **2005**. 27(2):221-6.
- Towler DA, Bidder M, Latifi T, Coleman T, Semenkovich CF. Diet-Induced Diabetes Activates an Osteogenic Gene Regulatory Program in the Aortas of Low Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. *J Biol Chem*. **1998**. 273(46):30427-34.
- Tress ML, Martelli PL, Frankish A, Reeves GA, Wesselink JJ, Yeats C, Olason PL, Albrecht M, Hegyi H, Giorgetti A, Raimondo D, Lagarde J, Laskowski RA, Lopez G, Sadowski MI, Watson JD, Fariselli P, Rossi I, Nagy A, Kai W, Storling Z, Orsini M, Assenov Y, Blankenburg H, Huthmacher C, Ramirez F, Schlicker A, Denoed F, Jones P, Kerrien S, Orchard S, Antonarakis SE, Reymond A, Birney E, Brunak S, Casadio R, Guigo R, Harrow J, Hermjakob H, Jones DT, Lengauer T, Orengo CA, Patthy L, Thornton JM, Tramontano A, Valencia A. The Implications of Alternative Splicing in the ENCODE Protein Complement. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2007**. 104(13):5495-500.
- Trochu JN, Kyndt F, Schott JJ, Gueffet JP, Probst V, Benichou B, Le Marec H. Clinical Characteristics of a Familial Inherited Myxomatous Valvular Dystrophy Mapped to Xq28. *J Am Coll Cardiol*. **2000**. 35(7):1890-7.
- Tseng TT, McMahon AM, Johnson VT, Mangubat EZ, Zahm RJ, Pacold ME, Jakobsson E. Sodium Channel Auxiliary Subunits. *J Mol Microbiol Biotechnol*. **2007**. 12(3-4):249-62.
- Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Braman JC, Knowlton R, Schumm JW, Eiberg H, Mohr J, Kennedy D, Plavsic N, et al. Cystic Fibrosis Locus Defined by a Genetically Linked Polymorphic DNA Marker. *Science*. **1985**. 230(4729):1054-7.
- Tukkie R, Sogaard P, Vleugels J, de Groot IK, Wilde AA, Tan HL. Delay in Right Ventricular Activation Contributes to Brugada Syndrome. *Circulation*. **2004**. 109(10):1272-7.
- Tuvia S, Buhusi M, Davis L, Reedy M, Bennett V. Ankyrin-B Is Required for Intracellular Sorting of Structurally Diverse Ca²⁺ Homeostasis Proteins. *J Cell Biol*. **1999**. 147(5):995-1008.
- Urena P, Malergue MC, Goldfarb B, Prieur P, Guedon-Rapoud C, Petrover M. Evolutive Aortic Stenosis in Hemodialysis Patients: Analysis of Risk Factors. *Nephrologie*. **1999**. 20(4):217-25.
- Van Langen IM, Birnie E, Alders M, Jongbloed RJ, Le Marec H, Wilde AA. The Use of Genotype-Phenotype Correlations in Mutation Analysis for the Long QT Syndrome. *J Med Genet*. **2003**. 40(2):141-5.
- Van Norstrand DW, Valdivia CR, Tester DJ, Ueda K, London B, Makielski JC, Ackerman MJ. Molecular and Functional Characterization of Novel Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1 Like Gene (GPD1-L) Mutations in Sudden Infant Death Syndrome. *Circulation*. **2007**.
- van Tintelen JP, Hofstra RM, Wiesfeld AC, van den Berg MP, Hauer RN, Jongbloed JD. Molecular Genetics of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy: Emerging Horizon? *Curr Opin Cardiol*. **2007**. 22(3):185-92.
- van Veen AA, van Rijen HV, Opthof T. Cardiac Gap Junction Channels: Modulation of Expression and Channel Properties. *Cardiovasc Res*. **2001**. 51(2):217-29.
- van Veen TA, Stein M, Royer A, Le Quang K, Charpentier F, Colledge WH, Huang CL, Wilders R, Grace AA, Escande D, de Bakker JM, van Rijen HV. Impaired Impulse Propagation in Scn5a-Knockout Mice: Combined Contribution of Excitability, Connexin Expression, and Tissue Architecture in Relation to Aging. *Circulation*. **2005**. 112(13):1927-35.

- Vatta M, Ackerman MJ, Ye B, Makielski JC, Ughanze EE, Taylor EW, Tester DJ, Balijepalli RC, Foell JD, Li Z, Kamp TJ, Towbin JA. Mutant Caveolin-3 Induces Persistent Late Sodium Current and Is Associated With Long-QT Syndrome. *Circulation*. **2006**. 114(20):2104-12.
- 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(3):337-45.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E et al. The Sequence of the Human Genome. *Science*. **2001**. 291(5507):1304-51.
- Verkerk AO, Wilders R, Schulze-Bahr E, Beekman L, Bhuiyan ZA, Bertrand J, Eckardt L, Lin D, Borggrefe M, Breithardt G, Mannens MM, Tan HL, Wilde AA, Bezzina CR. Role of Sequence Variations in the Human Ether-a-Go-Go-Related Gene (HERG, KCNH2) in the Brugada Syndrome. *Cardiovasc Res*. **2005**. 68(3):441-53.
- Vila M & Przedborski S. Genetic Clues to the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Nat Med*. **2004**. 10 Suppl:S58-S62.
- Viskin S, Zeltser D, Ish-Shalom M, Katz A, Glikson M, Justo D, Tekes-Manova D, Belhassen B. Is Idiopathic Ventricular Fibrillation a Short QT Syndrome? Comparison of QT Intervals of Patients With Idiopathic Ventricular Fibrillation and Healthy Controls. *Heart Rhythm*. **2004**. 1(5):587-91.
- Vissers LE, van Ravenswaaij CM, Admiraal R, Hurst JA, de Vries BB, Janssen IM, van der Vliet WA, Huys EH, de Jong PJ, Hamel BC, Schoenmakers EF, Brunner HG, Veltman JA, van Kessel AG. Mutations in a New Member of the Chromodomain Gene Family Cause CHARGE Syndrome. *Nat Genet*. **2004**. 36(9):955-7.
- Viswanathan PC, Benson DW, Balsler JR. A Common SCN5A Polymorphism Modulates the Biophysical Effects of an SCN5A Mutation. *J Clin Invest*. **2003**. 111(3):341-6.
- Volders PG, Zhu Q, Timmermans C, Eurlings PM, Su X, Arens YH, Li L, Jongbloed RJ, Xia M, Rodriguez LM, Chen YH. Mapping a Novel Locus for Familial Atrial Fibrillation on Chromosome 10p11-Q21. *Heart Rhythm*. **2007**. 4(4):469-75.
- Wallby L, Janerot-Sjoberg B, Steffensen T, Broqvist M. T Lymphocyte Infiltration in Non-Rheumatic Aortic Stenosis: a Comparative Descriptive Study Between Tricuspid and Bicuspid Aortic Valves. *Heart*. **2002**. 88(4):348-51.
- Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Bero A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglou T, Hubbell E, Robinson E, Mittmann M, Morris MS, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson TJ, Lipshutz R, Chee M, Lander ES. Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome. *Science*. **1998**. 280(5366):1077-82.
- Wang DW, Desai RR, Crotti L, Arnestad M, Insolia R, Pedrazzini M, Ferrandi C, Vege A, Rognum T, Schwartz PJ, George AL, Jr. Cardiac Sodium Channel Dysfunction in Sudden Infant Death Syndrome. *Circulation*. **2007a**. 115(3):368-76.
- 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(3):341-6.
- Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, de Jager T, Schwartz PJ, Towbin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD, Keating MT. Positional Cloning of a Novel Potassium Channel Gene: KVLQT1 Mutations Cause Cardiac Arrhythmias. *Nat Genet*. **1996**. 12(1):17-23.
- 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(5):805-11.

- Wang R, Chen W, Cai S, Zhang J, Bolstad J, Wagenknecht T, Liu Z, Chen SR. Localization of an NH₂-Terminal Disease-Causing Mutation Hot Spot to the "Clamp" Region in the Three-Dimensional Structure of the Cardiac Ryanodine Receptor. *J Biol Chem*. **2007b**. 282(24):17785-93.
- Ward OC. A New Familial Cardiac Syndrome in Children. *J Ir Med Assoc*. **1964**. 54:103-6.
- Warrier B, Mallipeddi R, Karla PK, Lee CH. The Functional Role of C-Reactive Protein in Aortic Wall Calcification. *Cardiology*. **2005**. 104(2):57-64.
- Watanabe H, Darbar D, Ingram CR, Jiramongkolchai K, Chopra SS, Kucera G, Stubblefield T, Wang J, Roden DM. Abstract 356: Loss of Function Mutations of Sodium Channel Beta-1 and Beta-2 Subunits Associated With Atrial Fibrillation and ST-Segment Elevation. *Circulation*. **2007**. 116(16_MeetingAbstracts):II.
- Webb JG, Pasupati S, Humphries K, Thompson C, Altwegg L, Moss R, Sinhal A, Carere RG, Munt B, Ricci D, Ye J, Cheung A, Lichtenstein SV. Percutaneous Transarterial Aortic Valve Replacement in Selected High-Risk Patients With Aortic Stenosis. *Circulation*. **2007**. 116(7):755-63.
- Wehrens XH. The Molecular Basis of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia: What Are the Different Hypotheses Regarding Mechanisms? *Heart Rhythm*. **2007**. 4(6):794-7.
- Weiss R, Barmada MM, Nguyen T, Seibel JS, Cavlovich D, Kornblit CA, Angelilli A, Villanueva F, McNamara DM, London B. Clinical and Molecular Heterogeneity in the Brugada Syndrome: a Novel Gene Locus on Chromosome 3. *Circulation*. **2002**. 105(6):707-13.
- Weiss RM, Ohashi M, Miller JD, Young SG, Heistad DD. Calcific Aortic Valve Stenosis in Old Hypercholesterolemic Mice. *Circulation*. **2006**. 114(19):2065-9.
- Weissenbach J, Gyapay G, Dib C, Vignal A, Morissette J, Millasseau P, Vaysseix G, Lathrop M. A Second-Generation Linkage Map of the Human Genome. *Nature*. **1992**. 359(6398):794-801.
- Westenskow P, Splawski I, Timothy KW, Keating MT, Sanguinetti MC. Compound Mutations: a Common Cause of Severe Long-QT Syndrome. *Circulation*. **2004**. 109(15):1834-41.
- Wever EF & Robles de Medina EO. Sudden Death in Patients Without Structural Heart Disease. *J Am Coll Cardiol*. **2004**. 43(7):1137-44.
- Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, Shen Y, Chen L, McGuire A, He W, Chen YJ, Makhijani V, Roth GT, Gomes X, Tartaro K, Niazi F, Turcotte CL, Irzyk GP, Lupski JR, Chinault C, Song XZ, Liu Y, Yuan Y, Nazareth L, Qin X, Muzny DM, Margulies M, Weinstock GM, Gibbs RA, Rothberg JM. The Complete Genome of an Individual by Massively Parallel DNA Sequencing. *Nature*. **2008**. 452(7189):872-6.
- Wichter T, Matheja P, Eckardt L, Kies P, Schafers K, Schulze-Bahr E, Haverkamp W, Borggrefe M, Schober O, Breithardt G, Schafers M. Cardiac Autonomic Dysfunction in Brugada Syndrome. *Circulation*. **2002**. 105(6):702-6.
- Wilde AA, Antzelevitch C, Borggrefe M, Brugada J, Brugada R, Brugada P, Corrado D, Hauer RN, Kass RS, Nademanee K, Priori SG, Towbin JA. Proposed Diagnostic Criteria for the Brugada Syndrome: Consensus Report. *Circulation*. **2002**. 106(19):2514-9.
- Wilde AA & Bezzina CR. Genetics of Cardiac Arrhythmias. *Heart*. **2005**. 91(10):1352-8.
- Wolf CM & Berul CI. Inherited Conduction System Abnormalities--One Group of Diseases, Many Genes. *J Cardiovasc Electrophysiol*. **2006**. 17(4):446-55.
- Wolpert C, Echternach C, Veltmann C, Antzelevitch C, Thomas GP, Spehl S, Streitner F, Kuschyk J, Schimpf R, Haase KK, Borggrefe M. Intravenous Drug Challenge Using Flecainide and Ajmaline in Patients With Brugada Syndrome. *Heart Rhythm*. **2005**. 2(3):254-60.
- Wood JN & Baker M. Voltage-Gated Sodium Channels. *Curr Opin Pharmacol*. **2001**. 1(1):17-21.
- Wright AF, Carothers AD, Pirastu M. Population Choice in Mapping Genes for Complex Diseases. *Nat Genet*. **1999**. 23(4):397-404.
- Wu L, Yong SL, Fan C, Ni Y, Yoo S, Zhang T, Zhang X, Obejero-Paz CA, Rho HJ, Ke T, Szafranski P, Jones SW, Chen Q, Wang QK. Identification of a New Co-Factor, MOG1, Required for the Full Function of Cardiac Sodium Channel Nav1.5. *J Biol Chem*. **2008**. 283(11):6968-78.

- Xia M, Jin Q, Bendahhou S, He Y, Larroque MM, Chen Y, Zhou Q, Yang Y, Liu Y, Liu B, Zhu Q, Zhou Y, Lin J, Liang B, Li L, Dong X, Pan Z, Wang R, Wan H, Qiu W, Xu W, Eurlings P, Barhanin J, Chen Y. A Kir2.1 Gain-of-Function Mutation Underlies Familial Atrial Fibrillation. *Biochem Biophys Res Commun*. **2005**. 332(4):1012-9.
- Xiao W & Oefner PJ. Denaturing High-Performance Liquid Chromatography: A Review. *Hum Mutat*. **2001**. 17(6):439-74.
- Yamaguchi M, Shimizu M, Ino H, Terai H, Hayashi K, Kaneda T, Mabuchi H, Sumita R, Oshima T, Hoshi N, Higashida H. Compound Heterozygosity for Mutations Asp611-->Tyr in KCNQ1 and Asp609-->Gly in KCNH2 Associated With Severe Long QT Syndrome. *Clin Sci (Lond)*. **2005**. 108(2):143-50.
- Yan GX & Antzelevitch C. Cellular Basis for the Brugada Syndrome and Other Mechanisms of Arrhythmogenesis Associated With ST-Segment Elevation. *Circulation*. **1999**. 100(15):1660-6.
- Yang P, Koopmann TT, Pfeufer A, Jalilzadeh S, Schulze-Bahr E, Kaab S, Wilde AA, Roden DM, Bezzina CR. Polymorphisms in the Cardiac Sodium Channel Promoter Displaying Variant in Vitro Expression Activity. *Eur J Hum Genet*. **2007**.
- Yang P, Kupersmidt S, Roden DM. Cloning and Initial Characterization of the Human Cardiac Sodium Channel (SCN5A) Promoter. *Cardiovasc Res*. **2004a**. 61(1):56-65.
- Yang Y, Xia M, Jin Q, Bendahhou S, Shi J, Chen Y, Liang B, Lin J, Liu Y, Liu B, Zhou Q, Zhang D, Wang R, Ma N, Su X, Niu K, Pei Y, Xu W, Chen Z, Wan H, Cui J, Barhanin J, Chen Y. Identification of a KCNE2 Gain-of-Function Mutation in Patients With Familial Atrial Fibrillation. *Am J Hum Genet*. **2004b**. 75(5):899-905.
- Yilmaz MB, Guray U, Guray Y, Cihan G, Caldir V, Cay S, Kisacik HL, Korkmaz S. Lipid Profile of Patients With Aortic Stenosis Might Be Predictive of Rate of Progression. *Am Heart J*. **2004**. 147(5):915-8.
- Ylstra B, van d, I, Carvalho B, Brakenhoff RH, Meijer GA. BAC to the Future! or Oligonucleotides: a Perspective for Micro Array Comparative Genomic Hybridization (Array CGH). *Nucleic Acids Res*. **2006**. 34(2):445-50.
- Yoshioka M, Yuasa S, Matsumura K, Kimura K, Shiomi T, Kimura N, Shukunami C, Okada Y, Mukai M, Shin H, Yozu R, Sata M, Ogawa S, Hiraki Y, Fukuda K. Chondromodulin-I Maintains Cardiac Valvular Function by Preventing Angiogenesis. *Nat Med*. **2006**. 12(10):1151-9.
- Yu FH & Catterall WA. Overview of the Voltage-Gated Sodium Channel Family. *Genome Biol*. **2003**. 4(3):207.
- Yu FH, Westenbroek RE, Silos-Santiago I, McCormick KA, Lawson D, Ge P, Ferriera H, Lilly J, DiStefano PS, Catterall WA, Scheuer T, Curtis R. Sodium Channel Beta4, a New Disulfide-Linked Auxiliary Subunit With Similarity to Beta2. *J Neurosci*. **2003**. 23(20):7577-85.
- Zareba W, Moss AJ, Schwartz PJ, Vincent GM, Robinson JL, Priori SG, Benhorin J, Locati EH, Towbin JA, Keating MT, Lehmann MH, Hall WJ. Influence of Genotype on the Clinical Course of the Long-QT Syndrome. International Long-QT Syndrome Registry Research Group. *N Engl J Med*. **1998**. 339(14):960-5.
- Zareba W, Sattari MN, Rosero S, Couderc JP, Moss AJ. Altered Atrial, Atrioventricular, and Ventricular Conduction in Patients With the Long QT Syndrome Caused by the DeltaKPQ SCN5A Sodium Channel Gene Mutation. *Am J Cardiol*. **2001**. 88(11):1311-4.
- Zebboudj AF, Imura M, Bostrom K. Matrix GLA Protein, a Regulatory Protein for Bone Morphogenetic Protein-2. *J Biol Chem*. **2002**. 277(6):4388-94.
- Zhang J, Feuk L, Duggan GE, Khaja R, Scherer SW. Development of Bioinformatics Resources for Display and Analysis of Copy Number and Other Structural Variants in the Human Genome. *Cytogenet Genome Res*. **2006**. 115(3-4):205-14.
- Zhang L, Vincent GM, Baralle M, Baralle FE, Anson BD, Benson DW, Whiting B, Timothy KW, Carlquist J, January CT, Keating MT, Splawski I. An Intronic Mutation Causes Long QT Syndrome. *J Am Coll Cardiol*. **2004**. 44(6):1283-91.
- Zipes DP & Wellens HJ. Sudden Cardiac Death. *Circulation*. **1998**. 98(21):2334-51.
- Zoghbi WA, Farmer KL, Soto JG, Nelson JG, Quinones MA. Accurate Noninvasive Quantification of Stenotic Aortic Valve Area by Doppler Echocardiography. *Circulation*. **1986**. 73(3):452-9.

Sites internet

Affymetrix

<http://www.affymetrix.com/>

Agilent

<http://www.agilent.com/>

CEPH (Centre d'Etude du Polymorphisme Humain) : base de données génotypiques

<http://www.cephb.fr/cephdb/php/fr/>

Database of Genomic Variants

<http://projects.tcag.ca/variation/>

ECR Browser

<http://ecrbrowser.dcode.org/>

Ensembl

<http://www.ensembl.org/>

HapMap

<http://www.hapmap.org/>

Inherited Arrhythmias Database

<http://www.fsm.it/cardmoc/>

NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

PicTar

<http://pictar.bio.nyu.edu/>

Primer3

http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi/

QT drug list (Arizona CERT)

<http://www.qtdrugs.org/>

TargetScan

<http://www.targetscan.org/>

The Human Gene Mutation Database

<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>

Résumé

Génétique des cardiopathies rythmiques et dégénératives

Les progrès réalisés dans le domaine de la génétique et la physiopathologie des cardiopathies ont été considérables ces dernières années grâce à des approches familiales et des approches sur de grandes cohortes de patients. Cependant ces pathologies sont souvent hétérogènes et le diagnostic moléculaire n'est posé que dans 55 à 70% des cas pour les arythmies héréditaires et est quasiment inexistant pour les pathologies valvulaires en particulier pour les atteintes aortiques.

La première partie de ce travail a consisté à étudier des troubles du rythme cardiaque primaires responsables de mort subite sur cœur sain. Dans ce domaine, mes recherches ont notamment permis de préciser le rôle de l'ankyrine-B dans la dysfonction sinusale et d'améliorer la compréhension des relations génotype-phénotype des mutations du gène *ANK2*, d'identifier un premier locus pour un nouveau syndrome de repolarisation précoce maligne, et un nouveau gène, *SCN1B*, pour le syndrome de Brugada et les troubles de conduction.

La seconde partie de ce travail a porté sur le rétrécissement aortique calcifié, une pathologie d'étiologie indéterminée vraisemblablement liée au vieillissement. Par une approche d'épidémiologie génétique, nous avons montré l'existence de formes familiales et entrepris l'étude génétique d'une grande famille de 48 patients. Les travaux pour identifier le premier gène de cette pathologie sont en cours.

Mots-clés : génétique – analyse de liaison – arythmie – mort subite – syndrome ankyrine-B – syndrome de Brugada – maladie dégénérative – rétrécissement aortique calcifié

Abstract

Genetics of arrhythmic and degenerative heart diseases

Major advances in genetics and pathophysiology of heart diseases have been achieved these last years using familial approaches and large cohort of patients. However these diseases are generally heterogeneous and molecular diagnosis is established in only 55 to 70% of cases for hereditary arrhythmias and is almost absent for valvular diseases and in particular for aortic valve affections.

The first part of this work focused on primary arrhythmias responsible for sudden death on structurally normal hearts. In this field, my work showed the critical role of ankyrin-B in sinus node dysfunction and refined the knowledge of genotype-phenotype relations of *ANK2* mutations. I also identified a first locus for a new malignant early repolarization syndrome, and a new gene, *SCN1B*, for Brugada syndrome and conduction disease.

The second part of this work focused on calcific aortic valve stenosis, a disease with unknown etiology and probably age-related. By a genetic epidemiological approach, we identified familial forms of the disease and initiate genetic study of a large family of 48 patients. Characterization of the first gene of this disease is in progress.

Keywords : genetics – linkage analysis – arrhythmia – sudden death – ankyrin-B syndrome – Brugada syndrome – degenerative disease – calcific aortic valve stenosis

**Inserm U915, l'institut du thorax – UFR de Médecine – 1 rue Gaston Veil –
44035 Nantes**