



HAL
open science

Etude et caractérisation des gènes impliqués dans la tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique

Nathalie Roux-Buisson Roux-Buisson

► **To cite this version:**

Nathalie Roux-Buisson Roux-Buisson. Etude et caractérisation des gènes impliqués dans la tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2012. Français. NNT : 2012GRENV010 . tel-00767106

HAL Id: tel-00767106

<https://theses.hal.science/tel-00767106>

Submitted on 19 Dec 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biotechnologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Nathalie ROUX-BUISSON

Thèse dirigée par Joël LUNARDI et
codirigée par Anne FOUREST-LIEUVIN

préparée au sein de l'équipe **Muscle et Pathologies** dirigée par I. Marty
du **GIN - Grenoble Institut des Neurosciences**
dans l'École Doctorale **Chimie et Science du Vivant**

ETUDE ET CARACTERISATION DES GENES IMPLIQUES DANS LA TACHYCARDIE VENTRICULAIRE POLYMORPHE CATECHOLAMINERGIQUE

Thèse soutenue publiquement le **2 Avril 2012**,

devant le jury composé de :

Monsieur Pierre-Simon JOUK

Professeur de l'Université Joseph FOURIER, Président

Madame Pascale GUICHENEY

Docteur de l'Université Pierre et Marie CURIE, Rapporteur

Monsieur Christophe HEYMES

Docteur de l'Université Paul SABATIER, Rapporteur

Monsieur Philippe CHEVALIER

Professeur de l'Université Claude BERNARD, Membre

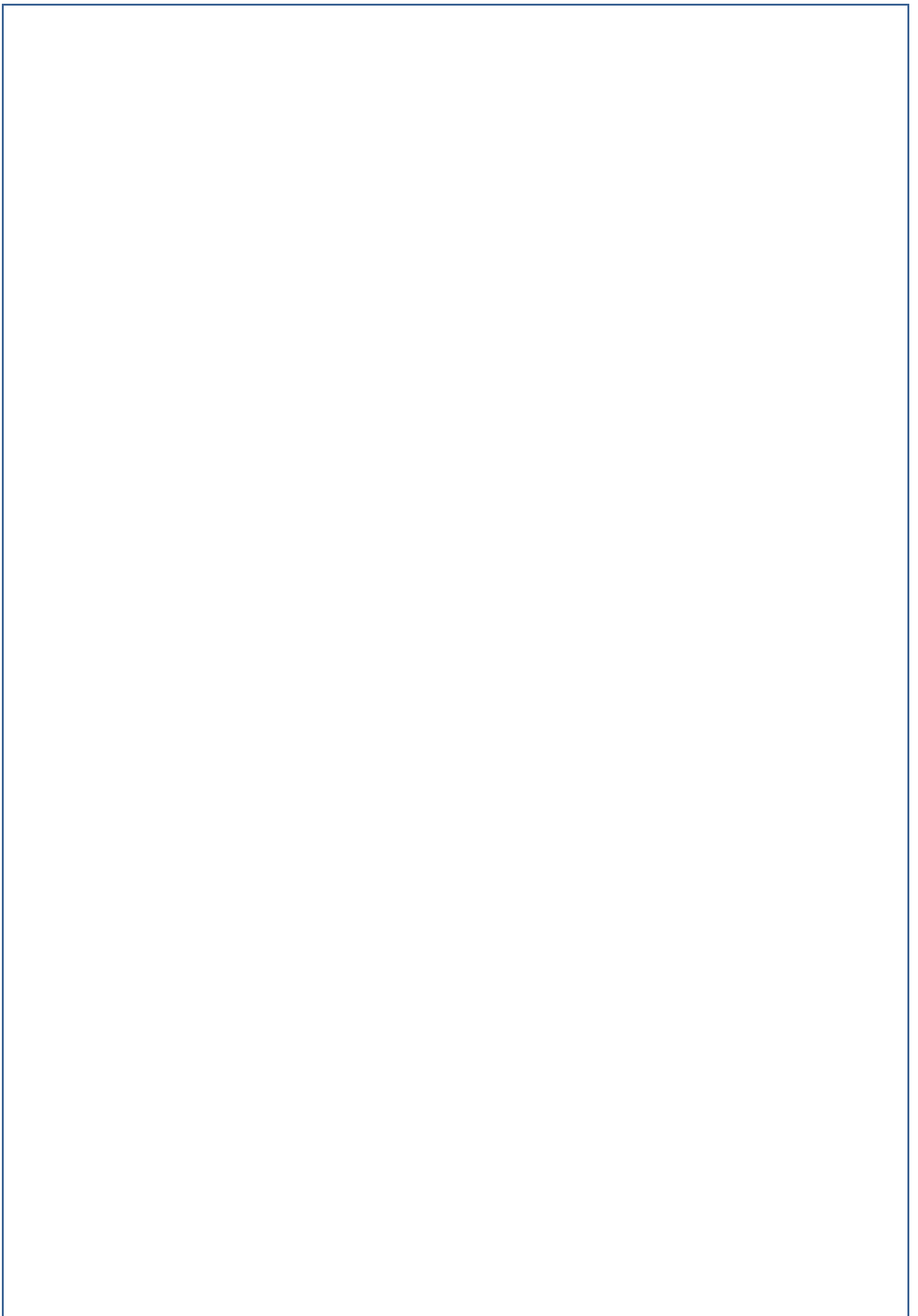
Madame Anne FOUREST-LIEUVIN

Docteur de l'Université Joseph FOURIER, Membre

Monsieur Joël LUNARDI

Professeur de l'Université Joseph FOURIER, membre





Remerciements

Je remercie Madame le Docteur Isabelle MARTY de m'avoir accueillie dans son équipe et permis de réaliser ce travail, dans d'aussi excellentes conditions de travail et d'encadrement.

Je remercie Madame le Docteur Pascale GUICHENEY et Monsieur le Docteur Christophe HEYMES d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Je remercie Messieurs les Professeurs Pierre-Simon JOUK et Philippe CHEVALIER d'avoir accepté de faire partie de mon jury et de juger ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur Joël LUNARDI pour sa confiance, son soutien et sa disponibilité.

Je remercie Madame le Docteur Anne FOUREST-LIEUVIN d'avoir accepté de co-diriger cette thèse ainsi que pour sa confiance et la transmission de ses connaissances scientifiques.

Je tiens à remercier tous ceux qui m'ont aidée au cours de la préparation de cette thèse, en particulier toutes les personnes du laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire du Centre Hospitalo-Universitaire de Grenoble et de l'équipe Muscle et Pathologies de l'Institut des Neurosciences de Grenoble.

Sommaire

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	9
I. Introduction générale	10
II. Rappels généraux sur le cœur.....	11
1. Anatomie	11
2. La circulation sanguine et le cycle cardiaque	11
III. L'activité électrique cardiaque.....	13
1. Automatisme cardiaque et dynamique de la conduction	13
2. Le potentiel d'action cardiaque.....	14
3. Le rôle du système nerveux autonome	18
4. L'électrocardiogramme	19
IV. Le cardiomyocyte, unité fonctionnelle de la contraction cardiaque	21
1. Le sarcomère, unité contractile du cardiomyocyte.....	22
2. Le couplage excitation-contraction (CEC)	24
V. Les protéines du complexe de relâchement calcique cardiaque (CRC).....	28
1. Le récepteur des dihydropyridines ou DHPR cardiaque	28
2. Le récepteur de la ryanodine de type 2 ou RyR2	29
3. La calséquestrine de type 2 ou Casq2	37
4. La triadine cardiaque CT1.....	43
5. La junctine	48
VI. Les troubles du rythme héréditaires.....	54
1. La mort subite d'origine cardiaque	54
2. Les troubles du rythme cardiaque.....	55
3. Les mécanismes des arythmies	56
4. Principaux troubles du rythme ventriculaire héréditaires	58
VII. La Tachycardie Ventriculaire Polymorphe Catécholaminergique.....	62
1. Aspects cliniques	62
2. Physiopathologie	64
3. Bases Génétiques	67
4. Bases moléculaires de la TVPC	72
VIII. Objectifs de la thèse	78

MATERIELS et METHODES.....	79
I. Population et patients	80
II. Aspects réglementaires.....	81
III. Stratégie d'identification des mutations	82
1. Stratégie d'analyse	82
2. Définition des régions génomiques analysées	83
IV. Méthodes de génétique moléculaire.....	87
1. Extraction des acides nucléiques.....	87
2. Amplification PCR à partir d'ADN génomique.....	89
3. Méthodes de criblage.....	89
4. Identification de mutation par séquençage	91
5. Haplotypage	92
6. Mise en évidence d'une mosaïque somatique.....	93
V. Critères de pathogénicité des variations nucléotidiques	95
VI. Etude par minigène des mutations c.381C>T et c.939+5G>C du gène <i>CASQ2</i>	97
1. Synthèse des minigènes et clonage.....	97
2. Culture cellulaire et transfection.....	98
3. Extraction de l'ARN total cellulaire, RT-PCR et analyse des produits d'amplification	98
VII. Caractérisation fonctionnelle de la mutation p.T59R du gène <i>TRDN</i>	100
1. Anticorps	100
2. Mutagenèse du cDNA de CT1 de rat	100
3. Etudes de surexpression de CT1 de rat dans une lignée cellulaire non myogénique, les cellules COS-7.	101
4. Transduction <i>in vivo</i> de CT1 dans des cardiomyocytes de souris KO <i>TRDN</i> à l'aide d'AAV2/9 recombinants.....	104
5. Analyses statistiques	106
RESULTATS et DISCUSSION.....	108
Partie 1. Gènes <i>RYR2</i> et <i>CASQ2</i>	109
I. Mutations du gène <i>RYR2</i>	110
1. Taux de mutations identifiées.....	110
2. Nature et topologie des mutations	113
3. Mosaïques germinales.....	116
4. Discussion	120
II. Mutations du gène <i>CASQ2</i>	125
1. Présentation clinique.....	125

2.	Nature et topologie des mutations	128
3.	Variations faux-sens	128
4.	Variations affectant l'épissage	133
5.	Discussion	139
III.	Conclusion partie 1	143
	Partie 2. Etude de nouveaux gènes	145
I.	Etudes génétiques.....	146
1.	Population étudiée	146
2.	Exclusion des gènes candidats <i>FKBP1B</i> et <i>ASPH</i>	146
3.	Identification de mutations dans le gène <i>TRDN</i>	150
II.	Caractérisation fonctionnelle de la variation p.T59R du gène <i>TRDN</i>	159
1.	Etudes sur cellules COS-7	159
2.	Etudes sur cardiomyocytes primaires	168
3.	Interprétation des résultats	172
III.	Discussion-conclusion partie 2.....	173
	CONCLUSION PERSPECTIVES	177
	Sites informatiques.....	182
	Bibliographie.....	184
	Annexes	196
	Publications	210

Abréviations

AA :	acide aminé
AAV :	adeno-associated virus
AAV2/9 :	AAV de type 2, sérotype de capsid 9
ACR :	arrêt cardio-respiratoire
AD :	autosomique dominant
ADN :	acide désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire (ou cDNA)
ADP :	adénosine diphosphate
AMP :	adénosine monophosphate
AMPc :	adénosine monophosphate cyclique
AR :	autosomique récessif
ARN :	acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
ASPH :	aspartate β -hydroxylase
ATP :	adénosine triphosphate
BrS :	Brugada syndrome
BSA :	bovine serum albumin
Ca ²⁺ :	cation calcium divalent
CamKII :	protéine kinase II dépendante de la Ca ²⁺ /calmoduline
Casq1 ou 2 :	calséquestrine de type 1 ou 2
CEC :	couplage excitation-contraction
CHX :	cycloheximide
CICR :	calcium induced calcium release
CMD :	cardiomyopathie dilatée
CMH :	cardiomyopathie hypertrophique
CMV :	cytomégalo virus
COS-7 :	african green monkey kidney fibroblast-like cell line
CRC :	complexe de relâchement calcique
CT1 :	cardiac triadin 1 (isoforme cardiaque de la triadine de type 1)
CVDA :	cardiomyopathie ventriculaire droite arythmogène
dNTP :	désoxyribonucléotide
ddNTP :	didésoxyribonucléotide
DAD :	delayed afterdepolarization
DFP :	diisopropylfluorophosphate
dHPLC :	denaturing high performance liquid chromatography
DHPR :	récepteur des dihydropyridines
DMEM :	Dulbecco's modified eagles medium, glucose 4,5g/l, L-glutamine 1%
DMSO :	diméthylsulfoxyde
DO :	densité optique
EAD :	early afterdepolarization
ECG :	électrocardiogramme
EE :	épreuve d'effort
ERAD :	endoplasmic reticulum-associated-degradation
ESE :	exonic splicing enhancer
ESS :	exonic splicing silencer
ESV :	extrasystole ventriculaire
Fam :	famille
FV :	fibrillation ventriculaire
FKBP12.6 :	FK506 binding protein, isoforme de masse moléculaire de 12.6 kDa
GAPDH :	glyceraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase
HEK-293 :	human embryonic kidney cells, clone 293
HRM :	high resolution melting
HRP :	horseradish peroxydase
IB :	immunoblot
IF :	immunofluorescence
Ig :	immunoglobuline
Ind :	individu
IP3 :	inositol 1,4,5 triphosphate
IP3R-I, II, III :	récepteur de l'IP3 de type I, II ou III
IPS :	induced pluripotent stem cells
ISE :	intronic splicing enhancer
ISS :	intronic splicing silencer

JLNS :	Jervell et Lange-Nielsen Syndrome
Jx :	jour x
kDa :	kilodalton
KO :	knock-out
LZ :	motifs leucines/isoleucines zipper
LTCC :	canal calcique voltage dépendant de type L (long lasting)
LQTS :	long QT syndrome
mAKAP :	muscle A kinase anchoring protein
MIR :	domaines présents dans la protéine <u>M</u> annosyltransférase, l' <u>I</u> P3R et le <u>R</u> yR
Mos :	mosaïque
MS :	mort subite
NCX :	échangeur Na ⁺ /Ca ²⁺
nM, μM, mM :	nanomolaire, micromolaire, millimolaire
NMD :	nonsense mediated decay
nt :	nucléotides
PA :	potentiel d'action
Pb :	paires de bases
PBS :	phosphate buffer saline
PBS-T :	PBS-Tween 20
PCR :	polymerase chain reaction
PCR-ARMS :	PCR amplification refractory mutation system
PDE4D3 :	phosphodiesterase de type 4D3
PFA :	paraformaldéhyde
PKA :	protéine kinase A
PLB :	phospholambane
PMSF :	fluorure de phénylméthanesulfonyl
PP1 / PP2A :	protéines phosphatases 1 et 2a
Po :	probabilité d'ouverture du canal RyR2
PR :	période réfractaire
RE :	réticulum endoplasmique
Rpm :	rotation par minute
RS :	réticulum sarcoplasmique
RSj :	RS jonctionnel
RT :	réverse transcription
RWS :	Romano-Ward syndrome
RyR1, 2, 3 :	récepteur de la ryanodine de type 1 ou 2 ou 3
SERCA :	sarco/endo réticulum Ca ²⁺ ATPase
SNP :	single nucleotide polymorphism
SOICR :	store overload induced Ca ²⁺ release
SPRY :	domaines identifiés dans la kinase <u>S</u> P1a et le <u>R</u> yR
SQTS :	short QT syndrome
SVF :	sérum de veau fœtal
TA :	température ambiante
Tm :	melting température
TM :	transmembranaire
TRDN :	triadine
Trisk :	triadin skeletal
TT :	tubules T ou tubules transverses
TTCC :	canal calcique voltage dépendant de type T (transient)
TV :	tachycardie ventriculaire
TVPC :	tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique
UPR :	unfolded protein response
3'UTR :	3' untranslated region
WT :	wild type

INTRODUCTION

BIBLIOGRAPHIQUE

I. Introduction générale

La mort subite secondaire à des troubles sévères du rythme ventriculaire est la cause la plus importante de mortalité dans le monde industrialisé (Boussy et al., 2008). Son incidence en France est estimée à 50 000 décès par an (Ferrieres et al., 1997). La plupart de ces arythmies survient dans un contexte de pathologie ischémique cardiaque acquise. Plus rarement, des pathologies héréditaires peuvent être à l'origine de ces morts subites.

La Tachycardie Ventriculaire Polymorphe Catécholaminergique (TVPC) est une pathologie rythmique héréditaire responsable de formes familiales de mort subite chez l'enfant et l'adulte jeune. Il s'agit d'une maladie rare dont la prévalence est estimée à 1/10 000 (Liu et al., 2008a). Ce trouble du rythme sera évoqué chez le patient jeune à l'occasion de syncopes répétées survenues à l'effort ou à l'émotion, voire après un arrêt cardiaque. L'épreuve d'effort et l'enregistrement Holter, essentiels au diagnostic, pourront révéler des épisodes de tachycardies ventriculaires caractéristiques lorsqu'elles sont bidirectionnelles. Le traitement repose principalement sur les β -bloquants et le défibrillateur implantable. En l'absence de traitement, la mortalité atteint 50% avant 40 ans.

L'analyse génétique permet, une fois la mutation causale identifiée chez un cas index, de réaliser un diagnostic présymptomatique chez les apparentés afin d'identifier les individus à risque et de mettre en place des mesures de prévention primaire. La génétique peut également avoir un rôle chez le cas index en cas de diagnostic difficile. Dans 60% des cas de TVPC, des mutations des gènes *RYR2* ou *CASQ2* sont identifiées respectivement dans des formes autosomiques dominantes ou récessives de TVPC (Lahat et al., 2001; Laitinen et al., 2001; Priori et al., 2001). Le récepteur de la ryanodine cardiaque, RyR2, est un canal calcique situé dans la membrane du réticulum sarcoplasmique (RS) des cellules musculaires cardiaques. La calséquestrine de type 2, Casq2 est la protéine majeure de liaison du Ca^{2+} dans le RS. Ces deux protéines jouent un rôle fondamental dans la fonction excitation-contraction des cardiomyocytes (Gyorke and Terentyev, 2008).

Cette thèse a pour objectif de présenter un état des lieux des mutations de *RYR2* et *CASQ2* dans la TVPC, ainsi que les résultats de l'analyse de 3 gènes candidats *TRDN*, *ASPH* et *FKBP1B*.

II. Rappels généraux sur le cœur

1. Anatomie

Le cœur est constitué de quatre cavités : deux cavités droites, l'oreillette et le ventricule droit et deux cavités gauches, l'oreillette et le ventricule gauche. On distingue le cœur « droit » du cœur « gauche », le cœur droit étant séparé du cœur gauche par une paroi : le septum. Pour chaque moitié du cœur, l'oreillette et le ventricule communiquent entre elles, simplement séparées l'une de l'autre par les valvules auriculo-ventriculaires. La valvule du cœur droit est appelée tricuspide (trois parties) et celle du cœur gauche bicuspidé (deux parties) ou mitrale.

La paroi du cœur comprend trois couches : le myocarde, l'endocarde et l'épicarde. Le myocarde forme la partie musculaire des parois cardiaques. C'est un muscle strié comme les muscles squelettiques, mais qui n'est rattaché à aucun os. Les parois des cavités cardiaques sont tapissées sur leur face interne par une membrane conjonctive, l'endocarde, et sur leur face externe par une membrane tissulaire, l'épicarde. L'épicarde correspond à la lame viscérale du péricarde séreux, le péricarde étant un sac fibro-séreux qui enveloppe le cœur. Ce sac est rempli d'un liquide aqueux qui sert de lubrifiant aux mouvements du cœur.

2. La circulation sanguine et le cycle cardiaque

Lors de la circulation sanguine, le sang oxygéné revient des poumons vers l'oreillette gauche, passe dans le ventricule gauche puis est éjecté dans la circulation systémique. Le sang désoxygéné est ramené par le retour veineux systémique jusqu'à l'oreillette droite, passe dans le ventricule droit puis est expulsé vers les poumons.

Le cœur réalise environ 2 milliards de contractions au cours d'une vie humaine. A chaque battement cardiaque, le cœur doit se relâcher pour que les cavités (ventricules et oreillettes) puissent se remplir de sang, puis se contracter pour envoyer le sang dans le corps et les poumons. Les phases de contraction (systole) et de relaxation (diastole) sont répétées de manière cyclique pour chaque battement cardiaque. Le cycle cardiaque débute par la systole auriculaire correspondant à la contraction des oreillettes droite et gauche permettant le remplissage des ventricules. Le remplissage ventriculaire se fait en deux phases : une première phase de remplissage passif au cours de laquelle la relaxation ventriculaire crée un

appel de sang dans les ventricules et une deuxième phase de remplissage actif où la contraction simultanée des oreillettes chasse le reste du sang dans les ventricules adjacents. Lorsque le sang circule de l'oreillette vers le ventricule, les valvules auriculo-ventriculaires s'abaissent sous l'effet de la charge du sang de part et d'autres des valvules. La relaxation des ventricules, agissant comme une pompe aspirante, facilite cette étape. Après fermeture des valvules auriculo-ventriculaires, la systole ventriculaire permet l'éjection du sang dans le système pulmonaire et systémique de façon simultanée. Lorsque les ventricules se contractent, les valvules se ferment sous l'effet de l'augmentation de la pression ventriculaire, évitant le reflux de sang dans les oreillettes. L'ouverture des deux ventricules sur l'artère pulmonaire et l'aorte est aussi protégée par les valvules pulmonaire et aortique qui empêchent le reflux de sang dans les ventricules au cours de la phase de repos des ventricules. Ensuite, les valvules aortique et pulmonaire se referment, le ventricule se relâche : c'est la diastole.

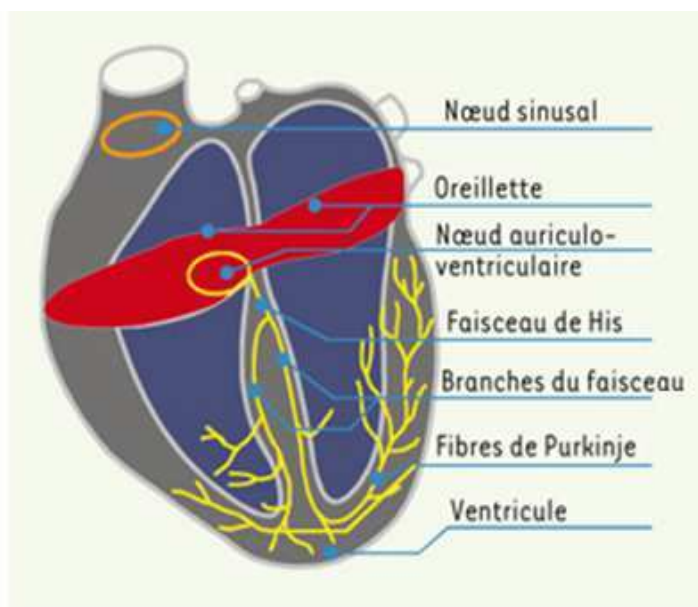
L'efficacité de la contractilité cardiaque résulte d'une orientation particulière des fibres musculaires au sein du myocarde et de la propagation ordonnée de la contraction cardiaque. Ceci permet de réaliser un mouvement de torsion du myocarde de la base vers l'apex, entraînant une éjection sanguine efficace. La contraction cardiaque est déclenchée régulièrement grâce à l'automatisme cardiaque.

III. L'activité électrique cardiaque

1. Automatisme cardiaque et dynamique de la conduction

La contraction cardiaque est spontanée et indépendante. Ainsi, un cœur excisé, placé dans un milieu oxygéné, peut continuer de battre spontanément. L'automatisme cardiaque permet au cœur de générer lui-même l'influx électrique nécessaire à son activité contractile grâce à des cellules myocardiques particulières, les cellules du tissu nodal. Ces cellules ont un aspect embryonnaire avec des constituants myofibrillaires peu évolués. Elles sont dénuées d'activité contractile mais possèdent une capacité de dépolarisation autonome. Une première structure est présente à la partie haute de l'oreillette droite : il s'agit du nœud sinusal. Il est situé dans l'oreillette droite au niveau de la jonction avec la veine cave supérieure et près de la *crista terminalis*. Dans le panicule adipeux à son contact, existent des ganglions nerveux qui sont responsables d'influences neurogènes sur l'activité sinusale. Plus bas, on retrouve une autre structure située dans la partie haute du septum interventriculaire : le nœud auriculo-ventriculaire, qui joue le rôle de filtre entre l'activité auriculaire et ventriculaire, puis le faisceau de His dont chaque branche de division s'engage dans le ventricule correspondant et s'arborise en de multiples ramifications : le réseau de Purkinje, tissu de jonction avec les fibres myocardiques (Figure 1).

Figure 1. Le tissu de conduction cardiaque (Lerebours, 2007).



Au sein du tissu de conduction, le nœud sinusal est le générateur d'impulsions. L'onde d'excitation se propage ensuite le long du tissu nodal d'abord dans les oreillettes vers le nœud auriculo-ventriculaire puis dans le faisceau de His et le réseau de Purkinje. La distribution étendue du réseau de Purkinje va au contact du muscle ventriculaire qui se dépolarise à son tour, ce qui assure une contraction unique et coordonnée. La propagation de la dépolarisation d'une cellule à l'autre au sein du muscle cardiaque se fait grâce à la transmission des courants locaux intracellulaires aux travers des jonctions communicantes (gap junctions). Les temps et les vitesses de conduction varient le long du tissu nodal : extrêmement lente dans le nœud sinusal, lente dans le nœud auriculo-ventriculaire afin d'assurer le remplissage ventriculaire, la vitesse de conduction est à l'inverse très rapide dans le faisceau de His et le réseau de Purkinje afin de dépolariser rapidement l'ensemble des myocytes et de synchroniser la contraction des deux ventricules.

2. Le potentiel d'action cardiaque

➤ Définitions

Toute cellule vivante est polarisée : elle est le siège de phénomènes électriques tels qu'il existe une différence de potentiel entre la face interne et la face externe de la membrane cellulaire, désignée communément sous le terme de potentiel de membrane.

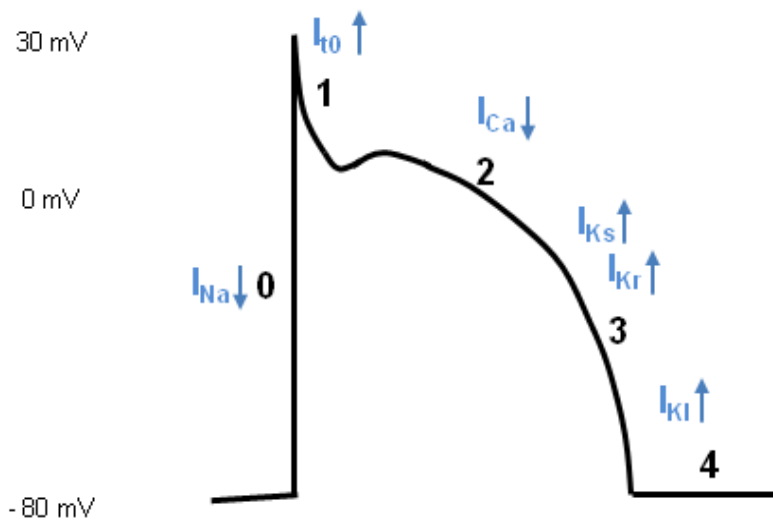
Lorsqu'une cellule myocardique est au repos, son potentiel de membrane est d'environ -80 mV. Si la cellule est excitée, par exemple par un stimulus électrique, elle se dépolarise. Lorsque le potentiel de membrane s'annule, c'est-à-dire atteint une valeur de 0 mV, c'est la dépolarisation. Le potentiel initial se régénère ensuite, c'est la repolarisation, qui est beaucoup plus lente que la dépolarisation. La repolarisation comprend 2 phases : une phase initiale de repolarisation lente puis une phase de repolarisation rapide. L'ensemble de ces phénomènes est appelé potentiel d'action (PA).

➤ Les différentes phases du PA

Un PA typique au niveau d'un myocyte ventriculaire est indiqué figure 2.

L'allure est particulière et résulte d'un équilibre entre les courants ioniques membranaires de dépolarisation et de repolarisation (Kushnir and Marks, 2010).

Figure 2. Représentation schématique d'un PA dans un myocyte ventriculaire (Pourrier and Nattel, 2004).



Les numéros en noir indiquent les phases du PA. En bleu sont indiqués les courants principaux mis en jeu durant les différentes phases du PA. Une flèche descendante indique un courant entrant et une flèche montante un courant sortant.

Le PA est divisé en cinq phases distinctes, chacune faisant intervenir un « jeu » de canaux ioniques donnés (Tableau 1). Initialement, les courants électriques locaux générés par le PA qui vient de se produire en amont vont dépolariser le potentiel de membrane jusqu'au potentiel de -70 mV, ce qui active les canaux sodiques ($\text{Na}_v1.5$). Lors de la phase 0 du PA, l'ouverture des canaux sodiques ($\text{Na}_v1.5$) entraîne un courant sodique entrant rapide (I_{Na}) amenant le potentiel de membrane à +30 mV : c'est la phase de dépolarisation. La phase 1 s'ensuit appelée phase de repolarisation précoce. Il s'agit d'une courte période qui se traduit par une « encoche » dans la courbe du PA. Cette phase correspond à une sortie de potassium liée à l'ouverture transitoire de canaux potassiques responsable d'un courant potassique sortant I_{t0} . La phase 2 ou phase de plateau est caractérisée par l'équilibre entre le courant calcique entrant I_{CaL} lié au canal DHPR et les courants potassiques sortants I_{K} avec une composante rapide I_{Kr} (canal HERG) et une composante lente I_{Ks} (canal KvLQT1). Le flux entrant de calcium va déclencher la libération massive de Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique (RS) permettant la contraction. Durant la phase 3 ou phase de repolarisation, le courant calcique est inactivé et les courants potassiques vont permettre la repolarisation cellulaire. La phase finale de repolarisation est assurée par la sortie d'ions potassiques due au

courant à rectification entrante I_{K1} lié au canal Kir2.1. La phase de repos du PA est appelée phase 4.

Tableau 1. Principaux canaux ioniques membranaires impliqués dans le PA des cardiomyocytes contractiles.

Canal	Na _v 1.5	Ca _v 1.2 (DHPR)	K _v 4.3	K _v 7.1 (KVLQT1)	K _v 11.1 (HERG)	Kir2.1
Gène codant la sous-unité α	<i>SCN5A</i>	<i>CACNA1C</i>	<i>KCND3</i>	<i>KCNQ1</i>	<i>KCNH2</i>	<i>KCNJ2</i>
Courant	Sodique I_{Na}	Calcique I_{CaL}	Potassique I_{to}	Potassique I_{Ks}	Potassique I_{Kr}	Potassique I_{K1}
Type de courant	Entrant dépolarisant	Entrant dépolarisant	Sortant repolarisant	Sortant repolarisant	Sortant repolarisant	Sortant repolarisant (rectification entrante)
Rôle dans le PA	Phase 0	Phase 2 (et 1 et 3)	Phase 1	Phase 3 (et 2)	Phase 3 (et 2)	Phases 3 et 4

Au niveau du nœud sinusal, les cellules nodales assurent l'automatisme cardiaque car elles possèdent la capacité de modifier elles-mêmes leur potentiel de repos. Elles n'ont pas de potentiel de repos stable et présentent une dépolarisation diastolique lente, due principalement au courant *pacemaker* I_f , qui leur permet d'atteindre le seuil d'activation du PA et le déclenchement de la propagation d'une impulsion. Le phénomène de dépolarisation spontanée au niveau du nœud sinusal se reproduit à une cadence donnée, qui correspond à la fréquence des battements cardiaques.

➤ La période réfractaire (PR)

La période réfractaire (PR) est définie comme la période pendant laquelle un nouveau PA normalement ne peut être déclenché. La PR est liée à l'inactivation des canaux sodiques. Pendant la phase 2, le plateau maintient les canaux sodiques inactivés. Ils sortent progressivement de leur état inactivé en phase 3. La PR absolue est la période pendant laquelle il est impossible de déclencher un nouveau PA car les canaux sodiques sont tous à l'état inactivés. La période réfractaire relative est celle où un stimulus d'intensité supranormale peut déclencher un nouveau PA (sortie progressive de l'état inactivé des canaux sodiques). La période réfractaire empêche la tétanisation du myocarde.

➤ Les canaux ioniques participant au PA

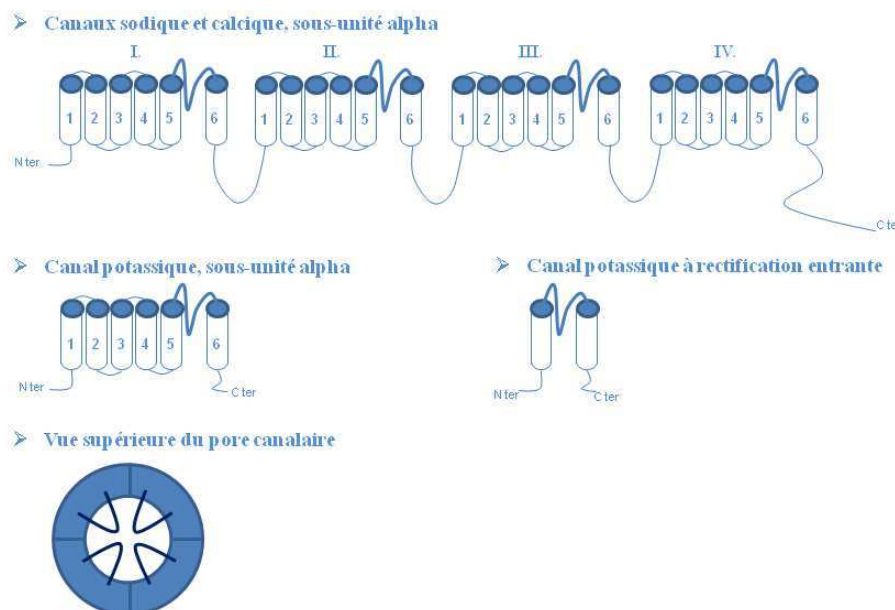
Les canaux ioniques voltage-dépendants de la membrane sarcolemmale sont fondamentaux pour une fonction électrophysiologique cardiaque normale. Ils sont constitués par des protéines formant des pores à travers la membrane qui vont permettre le passage d'ions. Ces flux ioniques vont se traduire par des modifications du potentiel membranaire et définir l'allure du potentiel d'action.

Ces canaux ioniques sont formés de plusieurs sous-unités, chacune codée par un gène distinct. La sous-unité α formant le pore est souvent suffisante pour générer un courant mais des sous-unités accessoires et des protéines modulatrices sont nécessaires pour permettre le trafic et les modifications post-traductionnelles des canaux (Figure 3).

Pour les canaux potassiques ($K_v4.3$, K_vLQT1 , $HERG$), une sous-unité α est formée de 6 segments transmembranaires hydrophobes (S1 à S6), la région du pore se situant entre les segments S5 et S6 tandis que le segment S4 contient une série d'acides aminés chargés positivement, qui sert de capteur de voltage du canal. Un homotétramère de quatre sous-unités α identiques est requis pour former le pore d'un canal ionique. Le canal potassique à rectification entrante $Kir2.1$ est plus simple sur le plan structural. Il s'agit d'un homotétramère, chaque sous-unité possédant deux domaines transmembranaires (Balsler, 1999; Felix, 2000; Roden et al., 2002).

Les canaux sodiques ($Na_v1.5$) et calciques (DHPR) sont formés d'un monomère contenant quatre répétitions de six segments transmembranaires. Le segment S4 de chaque domaine fonctionne comme un senseur des variations de potentiel.

Figure 3. Représentation schématique des canaux sodique, potassique et calcique (Balsler, 1999).



3. Le rôle du système nerveux autonome

Le système nerveux autonome n'intervient pas dans la genèse de l'activité électrique cardiaque mais va permettre la régulation de l'activité cardiaque en fonction d'états physiologiques variés et aussi d'événements anormaux.

Brièvement, l'activation du système nerveux sympathique augmente la fréquence cardiaque et la contractilité myocardique, tandis que le système parasympathique ou vagal a un effet inverse. La modulation de la fréquence cardiaque constitue un mécanisme d'adaptation aux exigences du métabolisme tissulaire : apport en oxygène et en substances nutritives aux tissus utilisateurs.

L'innervation sympathique cardiaque est issue de deux chaînes paravertébrales cervicales, plus particulièrement des ganglions inférieurs, les ganglions stellaires droit et gauche. Le ganglion stellaire droit se distribue préférentiellement au nœud sinusal et au cœur droit tandis que le ganglion stellaire gauche se distribue au nœud auriculo-ventriculaire et au cœur gauche. L'innervation parasympathique est assurée par les fibres présynaptiques des nerfs vagues dont les corps cellulaires sont situés dans le centre cardio-inhibiteur du tronc cérébral. Les corps cellulaires post-synaptiques sont rassemblés dans des ganglions intrinsèques disséminés dans le voisinage des nœuds sino-auriculaire et auriculo-ventriculaire, ainsi que le long des artères coronaires. L'innervation des cellules myocardiques par les fibres sympathiques est proche de l'épicarde tandis que l'innervation parasympathique est principalement sous-endocardique.

L'action du système nerveux autonome s'exerce par l'intermédiaire de neurotransmetteurs libérés au niveau des terminaisons nerveuses et qui vont moduler l'activité de paramètres électrophysiologiques en jouant notamment sur l'activité des canaux ioniques de la membrane des cellules cardiaques.

L'effet du tonus sympathique s'exerce par l'intermédiaire des catécholamines, adrénaline et noradrénaline, libérées par les terminaisons nerveuses, mais aussi, par la glande médullosurrénale. En réponse à la stimulation adrénergique via les récepteurs β , le rythme sinusal s'accélère. Des études *in vitro* de cellules du nœud sinusal montrent une diminution de la durée du PA et une accélération de la pente de dépolarisation diastolique spontanée. Le potentiel de repos atteint alors plus rapidement le niveau du seuil auquel se forme un nouveau PA. La conduction au niveau du nœud auriculo-ventriculaire est accélérée. Au niveau des cellules myocardiques auriculaires et ventriculaires, la stimulation β -adrénergique se traduit par une stimulation du courant entrant de calcium. Cette libération de catécholamines exerce

un effet positif sur l'intensité (effet inotrope) et la fréquence (effet chronotrope) de contraction, ainsi que sur la vitesse de relaxation (effet lusitrope). L'intervention du système adrénergique répond à toute augmentation de l'activité métabolique, due par exemple à l'exercice physique.

Le tonus vagal pour sa part assure le retour à l'équilibre et, lorsqu'il prédomine, maintient le fonctionnement tissulaire en régime d'économie. La stimulation des nerfs parasympathiques produit l'effet inverse de celui produit par les nerfs sympathiques. Les nerfs parasympathiques agissent par libération d'acétylcholine. Le seuil du PA est atteint plus lentement et la fréquence cardiaque diminue. A l'état de repos, l'influence parasympathique est dominante et la fréquence cardiaque chez un sujet normal est largement inférieure à 100 pulsations / minute. Ce système est qualifié de frein vagal.

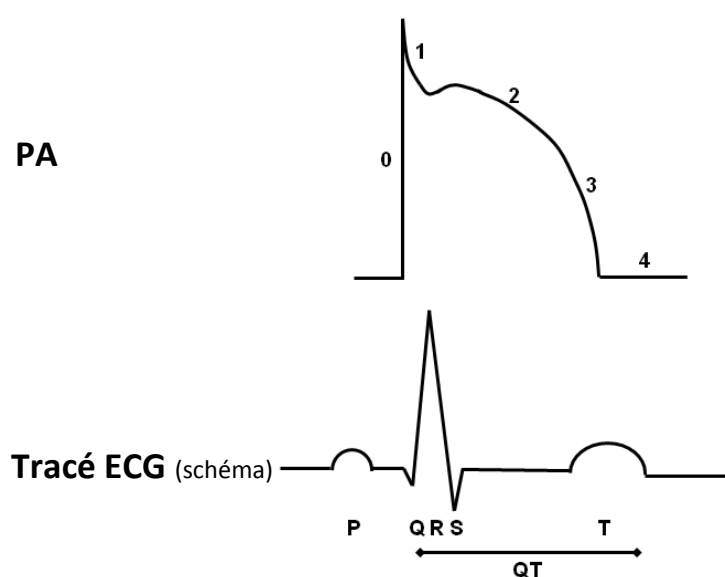
4. L'électrocardiogramme

L'électrocardiogramme (ECG) est l'enregistrement de l'activité électrique du cœur de surface.

Chaque battement cardiaque peut se décomposer en trois phases (Figure 4):

1. L'onde P qui traduit l'activation des oreillettes (dépolérisation auriculaire)
2. Le complexe QRS témoin de l'activation des ventricules (dépolérisation ventriculaire).
La repolarisation auriculaire a lieu au cours de cette phase.
3. L'onde T correspondant à la repolarisation ventriculaire.

Figure 4. Représentation schématique d'un enregistrement ECG lors d'un battement cardiaque.



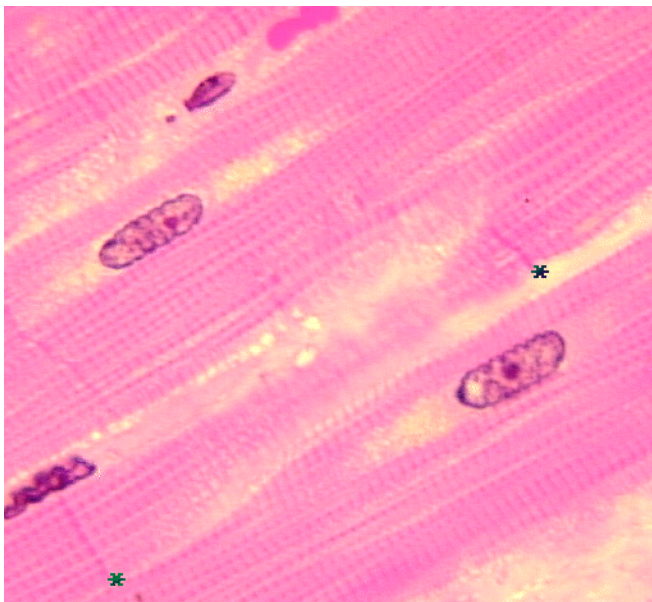
L'intervalle QT, défini comme le temps entre le début de l'intervalle QRS et la fin de l'onde T, traduit la durée de la dépolarisation et la repolarisation ventriculaire.

Les troubles du rythme et de la conduction cardiaque (modification de la fréquence, battements surajoutés...) vont pouvoir être visualisés sur l'ECG. Par exemple, des modifications de l'intervalle QT pourront refléter des troubles affectant la dépolarisation ou la repolarisation ventriculaire.

IV. Le cardiomyocyte, unité fonctionnelle de la contraction cardiaque

Les cardiomyocytes sont les cellules contractiles du cœur. Ce sont des cellules musculaires striées spécialisées, mononucléées. Elles ont une forme de cylindre allongé, de 15µm de diamètre environ et 100µm de long (Fornes, 2006). Leur cytoplasme, ou sarcoplasme, est presque entièrement occupé par les myofibrilles, constituées de sarcomères, qui permettent la contraction des cardiomyocytes (Figure 5). Leur nom est dû à leur aspect strié en microscopie. Ces stries sont dues aux piles de myofibrilles, composées de zones de filaments épais (sombres) et fins (clairs) qui alternent et se chevauchent. Les cardiomyocytes sont reliés bout à bout par des jonctions intercellulaires observables en microscopie optique sous forme de petites lignes transversales, les stries scalariformes.

Figure 5. Vue en microscopie photonique de cellules musculaires cardiaques de singe.



Les cellules musculaires ont globalement une forme rectangulaire. Chaque cellule apparaît striée transversalement en coupe longitudinale. Le noyau est visible chez plusieurs d'entre elles. Les astérisques correspondent aux stries scalariformes Source Biodidac (<http://biodidac.bio.uottawa.ca/>).

Il existe trois types de jonctions cellulaires :

- les desmosomes, qui lient solidement les cellules par des ancrages impliquant les filaments intermédiaires,
- les jonctions adhérentes, qui ancrent les fibres d'actine des sarcomères à chaque extrémité de la cellule,

- les jonctions communicantes (gap junctions), qui assurent le couplage électrique et chimique intercellulaire. Elles permettent la transmission de l'excitation d'une cellule à l'autre et donc la synchronisation de l'activité cardiaque.

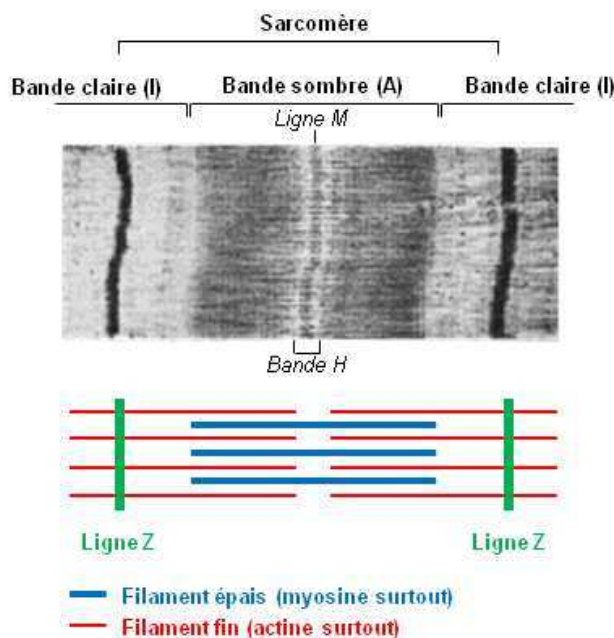
A la différence des cardiomyocytes, les cellules musculaires squelettiques sont polynucléées. Elles résultent de la fusion de cellules précurseurs et peuvent atteindre plusieurs centimètres (longueur d'un muscle).

1. Le sarcomère, unité contractile du cardiomyocyte

➤ Organisation du sarcomère

Les **sarcomères** sont les unités contractiles des cardiomyocytes (Figure 6). Ils sont constitués de deux sortes de filaments : les filaments fins et les filaments épais. Les filaments fins sont ancrés sur une structure transverse la ligne Z. On définit un sarcomère comme étant le segment entre deux lignes Z voisines.

Figure 6. Le sarcomère.



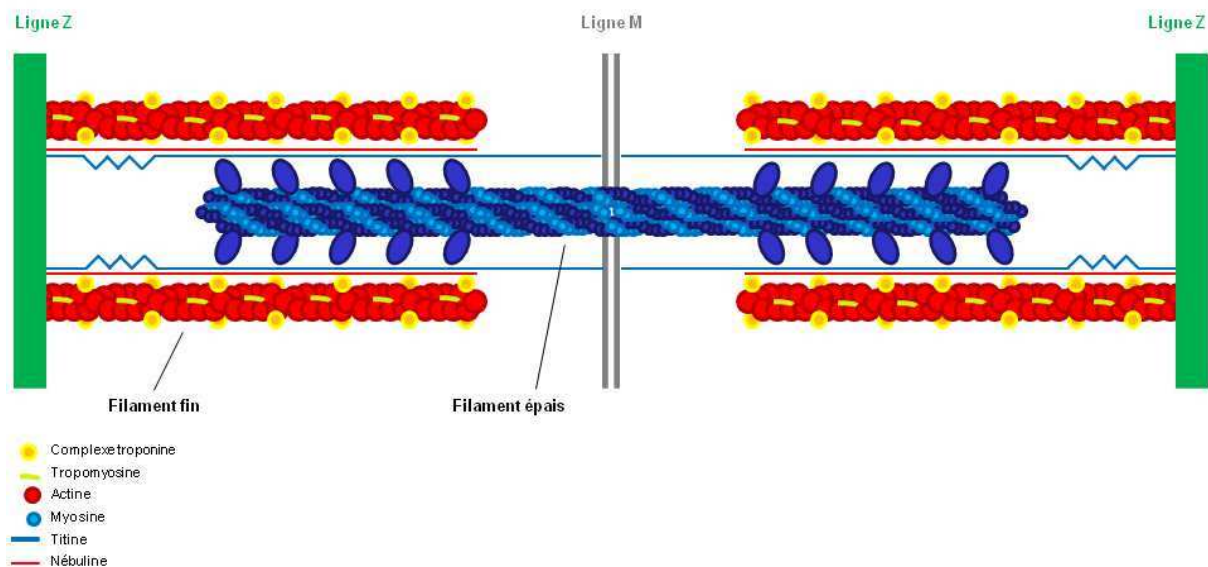
Un sarcomère est constitué d'une bande A et de deux demi-bandes I, reliés par la ligne Z. Les bandes A (anisotropes) sont composées de filaments épais (myosine surtout) qui chevauchent les filaments fins (actine surtout). Les bandes I (isotropes) sont dépourvues de myosine et sont composées de filaments fins. La bande H correspond à la région où les filaments épais de myosine ne chevauchent pas les filaments fins d'actine. Au milieu de la bande H se trouvent la ligne M, où s'attachent les myosines « têtes-bêches ».

Les filaments fins ont un diamètre d'environ 7 nm et sont constitués de plusieurs types de

molécules, l'actine, la tropomyosine et la troponine (Figure 7). Les filaments épais ont un diamètre d'environ 15 nm et sont essentiellement constitués d'une espèce moléculaire, la myosine. Ce sont des moteurs moléculaires capables de se mouvoir le long des filaments d'actine, permettant le raccourcissement des sarcomères lors de la contraction.

L'organisation sarcomérique du muscle squelettique et du cœur sont presque identiques mais les protéines impliquées, même lorsqu'elles portent le même nom, correspondent le plus souvent à des isoformes tissulaires spécifiques.

Figure 7. Organisation des protéines dans le sarcomère.



La myosine est composée d'une chaîne légère en forme de bâtonnet flexible et de la queue de la chaîne lourde de la myosine qui porte les têtes de myosine. Les filaments de myosine sont connectés entre eux au niveau de la ligne M et stabilisés par la myoméline et la protéine M à ce niveau.

Six filaments d'actine entourent chaque filament de myosine. Ces filaments d'actine (actine F) sont des polymères d'actine globulaire (actine G). Ils sont arrangés en double hélice et centrés sur un axe de tropomyosine à laquelle ils sont attachés. Les filaments d'actine sont reliés à la ligne Z, elle-même composée d'un assemblage macromoléculaire où se trouvent entre autres les protéines alpha-actinine, téléthonine, gamma-filamine, myotiline, obscurine, titine et nébuline. La titine est la plus grande protéine connue, elle s'étend sur un demi-sarcomère de la ligne Z à la ligne M, conférant au sarcomère des propriétés élastiques.

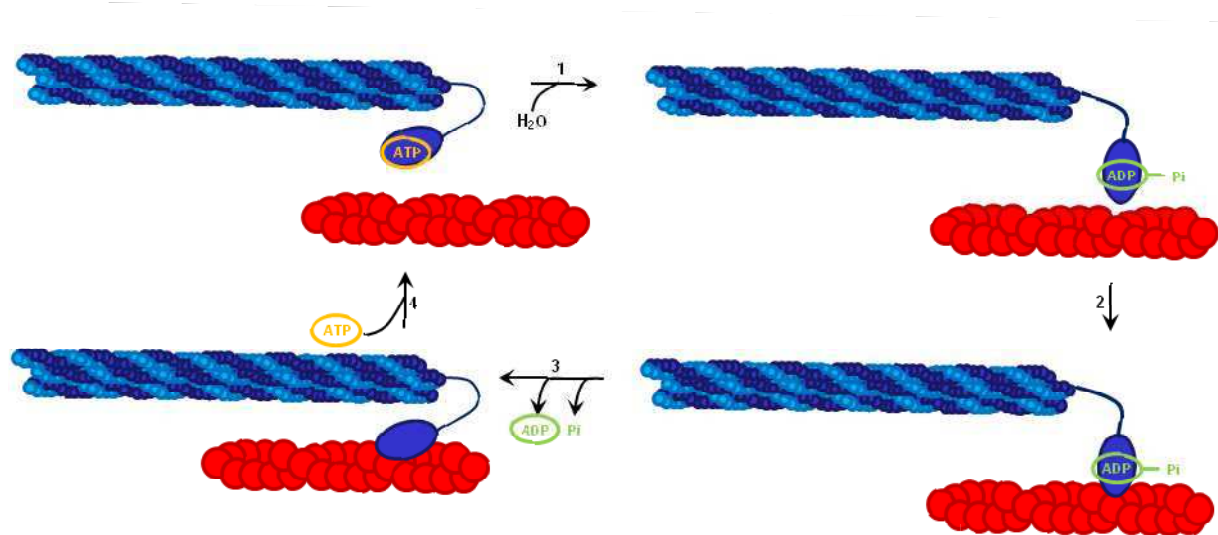
Le complexe des troponines est ancré à intervalles réguliers sur la tropomyosine. Ce complexe est formé de la troponine C (TnC) qui lie le calcium sous forme Ca^{2+} , de la troponine I (TnI) inhibitrice qui, au repos, masque les sites de fixation de la myosine sur l'actine, et de la troponine T (TnT) responsable de la liaison du complexe avec la tropomyosine.

➤ La contraction sarcomérique

En diastole, la tropomyosine et la troponine I masquent les sites de fixation des têtes de myosine sur l'actine. Lors de la contraction, l'augmentation du calcium cytosolique induit la liaison du Ca^{2+} sur la troponine C, entraînant une modification conformationnelle de celle-ci, ce qui libère les sites de fixation de la myosine sur l'actine. Les têtes de myosine hydrolysent alors une molécule d'ATP et se replient pour se rapprocher de leur site de fixation (Figure 8, étape 1) et ne libèrent le phosphate inorganique qu'une fois la liaison établie (étape 2). Le

relargage de l'ADP permet aux têtes de myosine de se replier complètement ce qui provoque le raccourcissement des sarcomères (étape 3). Le décrochage des têtes de myosine est induit par la fixation d'un nouvel ATP (étape 4). Ce cycle peut se reproduire tant que la concentration calcique reste élevée et s'arrête par la libération du Ca^{2+} de la troponine C qui est repompé. Le sarcomère se rallonge, le muscle se relâche.

Figure 8. Mouvement de la myosine le long de l'actine lors de la contraction musculaire

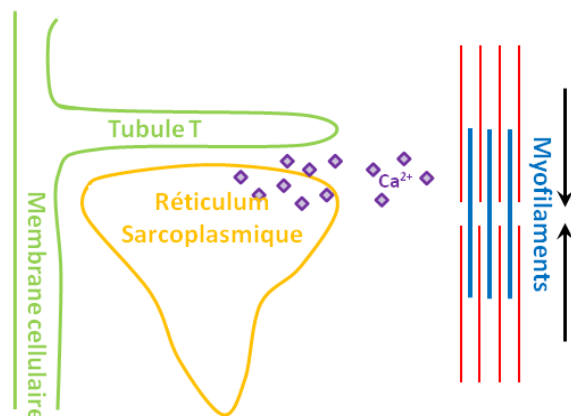


2. Le couplage excitation-contraction (CEC)

- La dyade, lieu du CEC

Le couplage excitation-contraction (CEC) représente l'ensemble des phénomènes par lesquels l'excitation électrique de la cellule cardiaque entraîne la contraction du muscle (Bers, 2002). Il est réalisé grâce à une organisation subcellulaire particulière : la dyade (Figure 9).

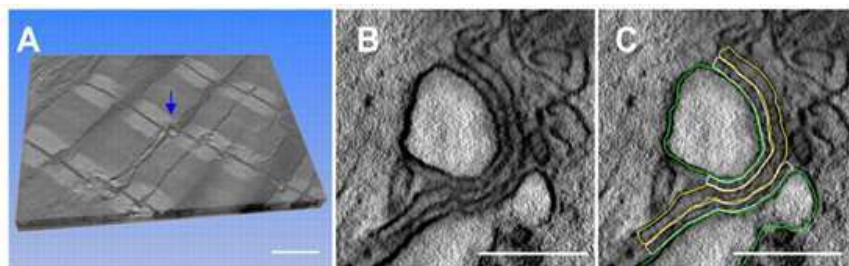
Figure 9. Représentation schématique d'une dyade.



La dyade est formée de zones de rapprochement étroites entre deux structures membranaires particulières, les tubules T et le réticulum sarcoplasmique jonctionnel :

- Les tubules transverses ou tubules T sont des invaginations membranaires transversales de la membrane cellulaire des cardiomyocytes, ou sarcolemme. Les tubules T permettent la conduction de la dépolarisation membranaire vers le centre de la cellule.
- Le réticulum sarcoplasmique (RS) est un organe intracellulaire spécialisé dans le stockage et la libération du calcium nécessaire à la contraction des sarcomères. Le RS joue un rôle fondamental dans la régulation de l'homéostasie calcique intracellulaire et le CEC. Il est organisé en deux compartiments, le RS longitudinal qui forme un réseau le long des sarcomères et le RS jonctionnel (RSj) correspondant aux citernes terminales du RS, qui font face aux tubules T au niveau des dyades.

Figure 10. Image de dyade en microscopie électronique (Hayashi et al., 2009b).



A. L'image correspond à une reconstruction en volume à partir d'images en 2D sur des sections de 1,42 nm. La flèche situe l'image de la dyade vue en B et C. Barre = 1 μ m. B et C. Vue d'une dyade en microscopie électronique. Les tubules T sont indiqués en vert et le RS jonctionnel en jaune. Barre = 200 nm.

Les dyades constituent un lieu privilégié d'échanges entre les milieux intra et extracellulaires grâce à de nombreuses protéines membranaires.

➤ Dynamique du couplage excitation-contraction (CEC)

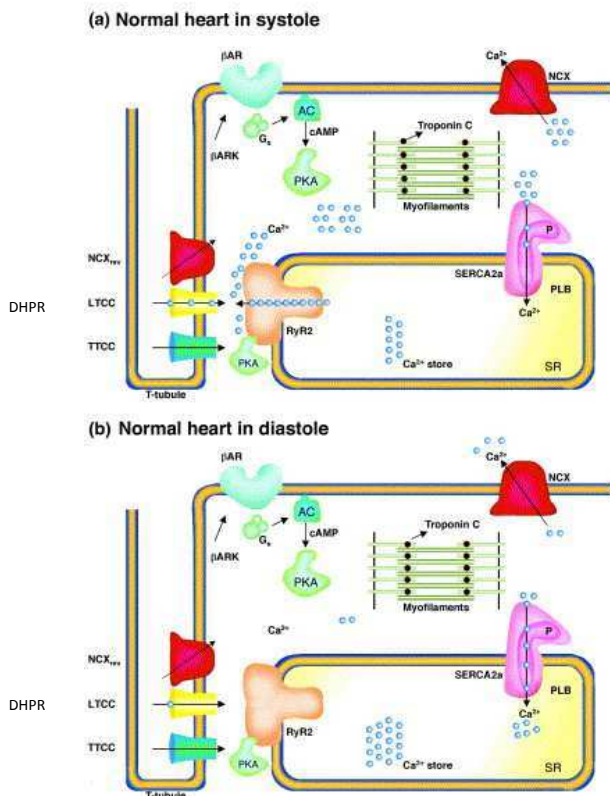
Le CEC est réalisé grâce au Complexe de Relâchement Calcique (CRC) situé au niveau des dyades et centré sur deux canaux calciques, le récepteur aux dihydropyridines ou DHPR dans la membrane plasmique, au niveau du tubule T, et le récepteur de la ryanodine de type 2 ou RyR2, qui lui fait face dans la membrane du RS jonctionnel (Figure 11).

A chaque battement cardiaque, pendant la phase de plateau descendant du PA, il y a une entrée de calcium dans la cellule par le DHPR. Ceci entraîne une augmentation locale modérée de Ca^{2+} cytoplasmique, qui active les canaux calciques RyR2 situés en regard. L'ouverture des canaux RyR2 conduit à une libération massive de calcium du RS. La

concentration du Ca^{2+} cytoplasmique augmente alors d'un facteur 10, passant de 100 nM à 1 μM environ. L'augmentation de la concentration de calcium libre intracellulaire va permettre l'activation des unités myofibrillaires et la contraction. Le processus d'activation du canal RyR2 par augmentation locale du calcium cytoplasmique est connu sous le nom de libération de calcium induite par le calcium (calcium-induced calcium-release ou CICR).

En diastole, les ions calciques Ca^{2+} libres dans le cytosol vont être repompés vers le RS via la pompe Ca^{2+} ATPase (SERCA2a). L'activité de SERCA2a est régulée par le phospholambane qui inhibe la pompe lorsqu'il est déphosphorylé. Parallèlement, l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) et la pompe Ca^{2+} mitochondriale participent également à l'élimination du calcium libre cytosolique, et donc à l'initiation de la relaxation myocardique.

Figure 11. Couplage excitation-contraction des cardiomyocytes ventriculaires (Wehrens and Marks, 2003).



a. En systole, la dépolarisation des tubules T active le DHPR (jaune) qui déclenche la sortie de Ca^{2+} du RS à travers RyR2 (orange). (En plus du DHPR, une entrée de Ca^{2+} peut se faire par un autre canal calcique, TTCC et le NCX). La concentration calcique intracellulaire augmente. La fixation de Ca^{2+} entraîne un changement conformationnel de la troponine C (noir). Celle-ci va alors pointer les myofilaments d'actine et de myosine, mécanisme de la contraction musculaire. La voie adrénergique (vert) peut stimuler le CEC par un jeu de phosphorylation.

b. En diastole, le Ca^{2+} intracellulaire est pompé du cytosol vers le RS à travers la pompe SERCA2a (rose), régulée par le phospholambane (PLB, violet). Le calcium est également exclu de la cellule par l'échangeur membranaire $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX, rouge).

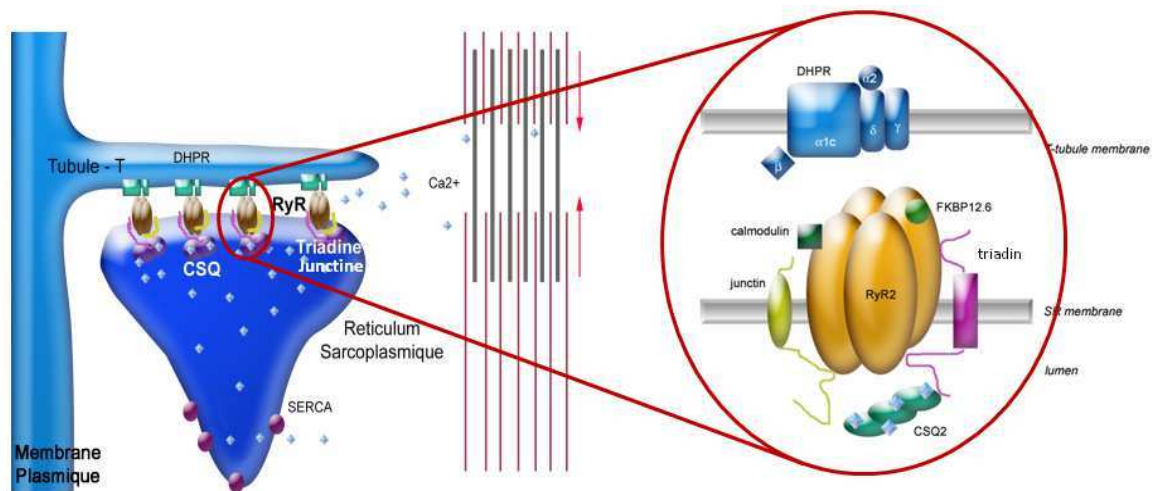
Une différence fondamentale entre le muscle cardiaque et le muscle squelettique est l'existence d'un couplage mécanique direct entre le DHPR et le RyR dans le muscle squelettique qui est absent au niveau cardiaque. Le changement de conformation du DHPR voltage-dépendant lors du PA entraîne une modification du couplage RyR-DHPR et l'activation du RyR. Ce mécanisme d'activation du RyR squelettique est dit induit par le voltage ou VICR (Voltage Induced Calcium Release).

L'ensemble des mouvements du Ca^{2+} au cours d'un cycle de contraction-relaxation du myocyte cardiaque est désigné sous le terme de transitoire calcique. Il se décompose en deux phases : la première de quelques millisecondes est due à l'influx de Ca^{2+} extracellulaire et au CICR et correspond à une forte augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire; la seconde phase beaucoup plus lente correspond à la diminution de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire jusqu'à son niveau diastolique et est liée au repompage du Ca^{2+} dans le RS et les mitochondries ainsi qu'à sa sortie de la cellule. Le transitoire calcique résulte de la sommation spatio-temporelle de milliers d'étincelles calciques ou sparks, qui sont définis comme la libération élémentaire de calcium à partir d'un CRC (Cheng and Lederer, 2008).

V. Les protéines du complexe de relâchement calcique cardiaque (CRC)

Le CRC est centré sur les deux canaux calciques impliqués dans le CICR, le DHPR et RyR2. Au niveau du RS, RyR2 forme un complexe quaternaire avec trois autres protéines du RS : la calséquestrine, une protéine luminale, et la triadine et la junctine, deux protéines membranaires (Figure 12).

Figure 12. Représentation schématique du CRC.



Le CRC est constitué par le DHPR (vert) dans la membrane du tubule T et RyR2 (marron) dans la membrane du RS, entouré de protéines accessoires ayant un rôle régulateur de l'activité des canaux ou structural. La triadine est indiquée en fuschia, la junctine en jaune, la calséquestrine en violet à gauche et vert à droite. D'autres protéines interviennent : FKBP12.6 (vert), calmoduline (vert). Le Ca²⁺ est figuré par des losanges bleus.

1. Le récepteur des dihydropyridines ou DHPR cardiaque

Le récepteur des dihydropyridines (DHPR) est aussi désigné par les termes LTCC (canal calcique voltage-dépendant de type L (long lasting)) et Cav1.2. La sélectivité du canal pour les ions Ca²⁺ est très forte. Ce canal est constitué de 5 sous-unités, α₁, α₂, β, δ et γ (Figure 3). La sous-unité α₁ cardiaque (α_{1c}) forme le pore de la protéine, tandis que les autres sous-unités ont une action régulatrice.

2. Le récepteur de la ryanodine de type 2 ou RyR2

Ce récepteur fait partie de la famille des récepteurs de la ryanodine (RyR) qui sont des canaux calciques situés dans la membrane du RE/RS. Leur nom provient de la capacité des récepteurs à lier la ryanodine, un alcaloïde végétal extrait de *Ryana speciosa* (Kushnir and Marks, 2010). RyR2 fait partie d'une famille de 3 isoformes RyR1, 2 et 3. Chaque isoforme est codée par un gène spécifique : *RYR1* situé en 19q13.1, *RYR2* en 1q42 et *RYR3* en 15q14-q15, les gènes présentant des similitudes importantes. RyR1 est exprimé principalement dans le muscle squelettique, mais peut être retrouvé à bas niveau dans le muscle cardiaque (Neylon et al., 1995). RyR2 est la forme prédominante du muscle cardiaque. RyR2 est également exprimé à un niveau élevé dans les cellules de Purkinje du cervelet et le cortex cérébral (Furuichi et al., 1994; Lai et al., 1992; Nakanishi et al., 1992; Sharp et al., 1993). RyR3 est exprimé à faible niveau dans des tissus variés dont le muscle squelettique ou le cerveau (Ogawa, 1994).

➤ Le gène *RYR2*

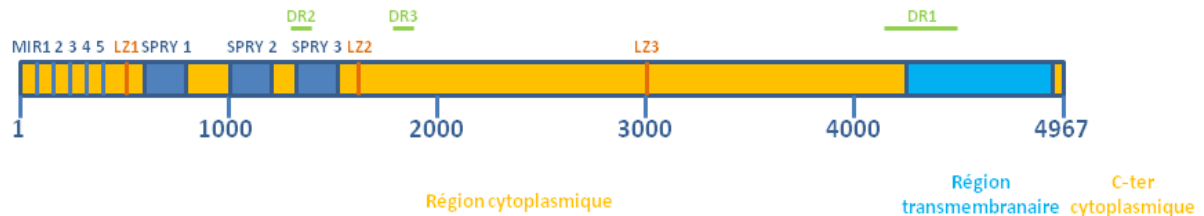
Le gène *RYR2* est un très grand gène s'étendant sur 790 000 pb et comprenant 105 exons. Un exon alternatif de 24 bp est présent entre les exons 80 et 81. L'ARNm de *RYR2* (105 exons) a une taille de 16365 pb. Le cDNA de *RYR2* a été cloné à partir du cœur de lapin dès 1990 (Nakai et al., 1990; Otsu et al., 1990).

➤ Structure protéique de RyR2

La séquence protéique de RyR2 est composée de 4967 acides aminés (AA) et présente une identité de 60 à 70% avec les isoformes RyR1 et RyR3. Certains motifs sont répétés dans la séquence et présents dans d'autres protéines mais leurs fonctions ne sont pas forcément connues (Figure 13) : 1) les domaines SPRY qui sont retrouvés dans les protéines de la superfamille des immunoglobulines, 2) les domaines MIR dont le nom provient des 3 protéines où ils sont connus (la protéine Mannosyltransférase, l'IP3R (récepteur de l'IP3) et le RyR), 3) les séquences de type leucine-zippers qui interviennent dans les interactions protéine-protéine. Les divergences de séquences entre les trois isoformes sont concentrées dans trois régions de diversité : D1 (AA 4209-4560 de la séquence de RyR2), D2 (AA 1353-1397), D3 (AA 1852-1890). Ces régions constitueraient soit des régions non conservées à travers l'évolution sans importance fonctionnelle particulière, soit des régions responsables de fonctions spécifiques d'isoforme. La région D2 de RyR1 contient ainsi la séquence

responsable du couplage physique entre RyR1 et le DHPR et est absente dans l'isoforme RyR2 (Perez et al., 2003).

Figure 13. Représentation schématique de la séquence linéaire de RyR2 avec les domaines répétés et les régions divergentes (Hamilton and Serysheva, 2009).

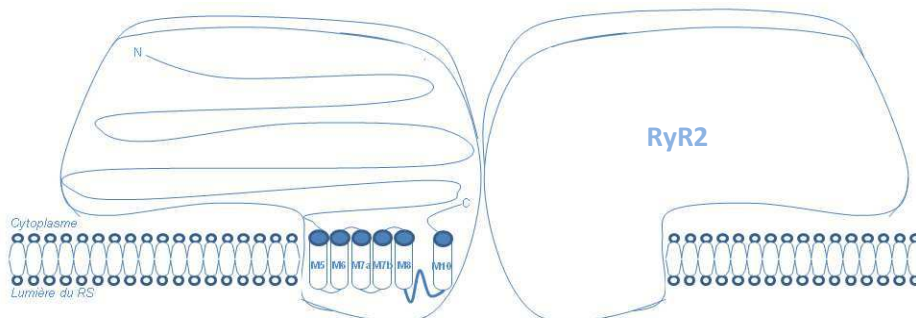


Les chiffres en bleu correspondent à la numérotation en acides aminés (AA) de RyR2. Régions divergentes DR1 (AA 4209-4560), DR2 (1353-1397), DR3 (1852-1890) ; Motifs Leucine-zipper LZ1 (565-594), LZ2 (1604-1632), LZ3 (3004-3035), MIR 1 (110-165), 2 (172-217), 3 (225-280), 4 (286-343), 5 (351-408) ; SPRY 1 (599-809), 2 (1025-1222), 3 (1337-1562).

La grande taille de la protéine (>500kDa) a fait de son étude structurale un défi. Seule l'extrémité N-terminale de la protéine a pu être cristallisée pour l'instant (~10%, (Lobo and Van Petegem, 2009; Tung et al., 2010)). Cependant, plusieurs éléments de structure sont connus à partir de données de cryomicroscopie. Les connaissances reposent principalement sur RyR1 qui a été l'isoforme la plus étudiée car elle est présente en quantité importante dans le muscle squelettique et est relativement facile à purifier.

Les RyR sont des canaux calciques homotétramériques de haut poids moléculaire ancrés dans la membrane du RS et dont l'allure est comparée à celle d'un champignon (Figure 14). La majeure partie de la protéine forme un volumineux assemblage cytoplasmique, correspondant au chapeau du champignon, qui est relié à la partie transmembranaire, correspondant au pied du champignon.

Figure 14. Représentation schématique du canal RyR2 inséré dans la membrane du RS.

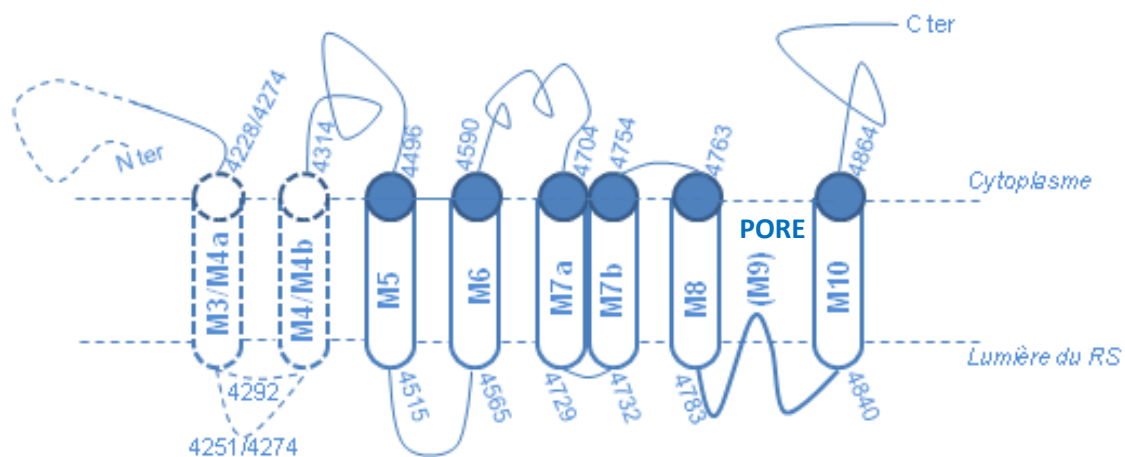


Le schéma représente la structure tétramérique du canal RyR2 en forme de champignon, soulignant la partie cytoplasmique volumineuse. Les domaines transmembranaires putatifs sont figurés dans le monomère en avant à gauche de la figure.

La région cytoplasmique est constituée de 90% de la protéine et contient les sites responsables de la régulation du canal. La partie cytoplasmique de la protéine abriterait des cavités pouvant permettre la liaison de facteurs régulateurs. A chaque extrémité cytoplasmique de la molécule sont définies des régions dites régions « clamp » qui forment une sorte de pince, intervenant dans l'interaction entre les monomères RyRs et avec des facteurs régulateurs. Ce sont dans ces régions situées dans la partie N-terminale de la protéine que se trouvent les domaines MIR. La première séquence de type leucine zipper serait également dans cette région et permettrait l'interaction du RyR avec les kinases et les phosphatases, régulatrices du canal.

La partie transmembranaire de la protéine représente environ 10% de la protéine (AA C-terminaux) et participe à la formation du pore permettant le passage des ions Ca^{2+} à travers la membrane du réticulum. Le nombre de segments transmembranaires n'est toujours pas défini avec certitude en raison du niveau de résolution insuffisant lors des études tridimensionnelles. Il est cependant établi que ce nombre est pair, les extrémités N et C-terminales de la protéine étant cytoplasmiques (Figure 15, (Du et al., 2002; Grunwald and Meissner, 1995; Hamilton and Serysheva, 2009; Liu et al., 2001; Marty et al., 1994)).

Figure 15. Topologie transmembranaire de RyR2 selon le modèle de Du et al., 2002.

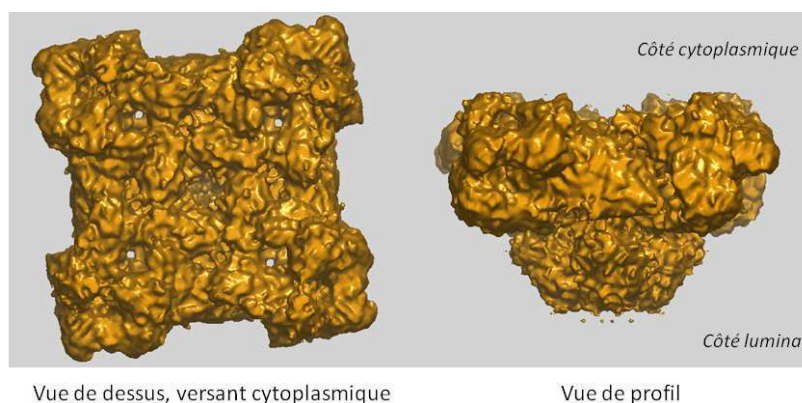


Les nombres correspondent aux acides aminés délimitant les séquences transmembranaires potentielles. Le numéro qui suit le M indique le segment transmembranaire selon le modèle à 10 domaines transmembranaires publié antérieurement (Zorzato et al., 1990). M9 est entre parenthèses car il apparaît maintenant que cette séquence n'est pas un segment transmembranaire mais correspond à la région participant au pore canalaire.

On pense actuellement que la région transmembranaire serait composée de 6 à 8 segments transmembranaires. Les éléments de la structure secondaire de la région du pore seraient constitués de trois hélices : une première hélice traversant la membrane (hélice 1, potentiel segment transmembranaire 8 ou TM8), une hélice courte (hélice 2, qui fait probablement partie du pore) formant l'entrée du canal côté luminal, et l'hélice 3, positionnée parallèlement au plan de la membrane sur la face cytoplasmique de la région transmembranaire (Hamilton and Serysheva, 2009). La région formant le pore, comprise entre les segments transmembranaires TM8 et TM10, est constituée d'une séquence très conservée hydrophobe présente au niveau des RyRs et des récepteurs à l'IP3, de type GXRXGGGXGD (AA 4820 – 4829 RyR2 humain (Zhao et al., 1999). En plus de cette séquence, l'acide glutamique 4830 et la glutamine 4881 interviendraient également dans le passage du calcium à travers le pore (Welch et al., 2004). Les travaux de Bhat puis Meur ont cherché à identifier la ou les séquence(s) permettant la rétention de protéine au niveau du réticulum. Leurs études montrent que les segments TM4 et TM10 sont nécessaires à la localisation du canal dans le RE (Bhat and Ma, 2002; Meur et al., 2007). Il a été proposé que l'extrémité C-terminale cytoplasmique de RyR2, particulièrement les 15 derniers acides aminés, jouerait un rôle dans la tétramérisation de la protéine (Stewart et al., 2003).

Des études de cryomicroscopie électronique ont été réalisées pour étudier les changements de conformations du canal lors de son ouverture et de sa fermeture (Figure 16, (Samso et al., 2009; Serysheva et al., 1999; Sharma et al., 2000)). Bien que la résolution structurale soit relativement faible (25-30 Å), les données obtenues semblent montrer que la transition de l'état fermé à l'état ouvert du canal modifierait à la fois la région cytoplasmique (ouverture des clamps) et la région transmembranaire (« dégagement » de la partie centrale). Le mécanisme d'ouverture du canal s'approcherait du mécanisme d'ouverture d'un diaphragme de caméra photographique.

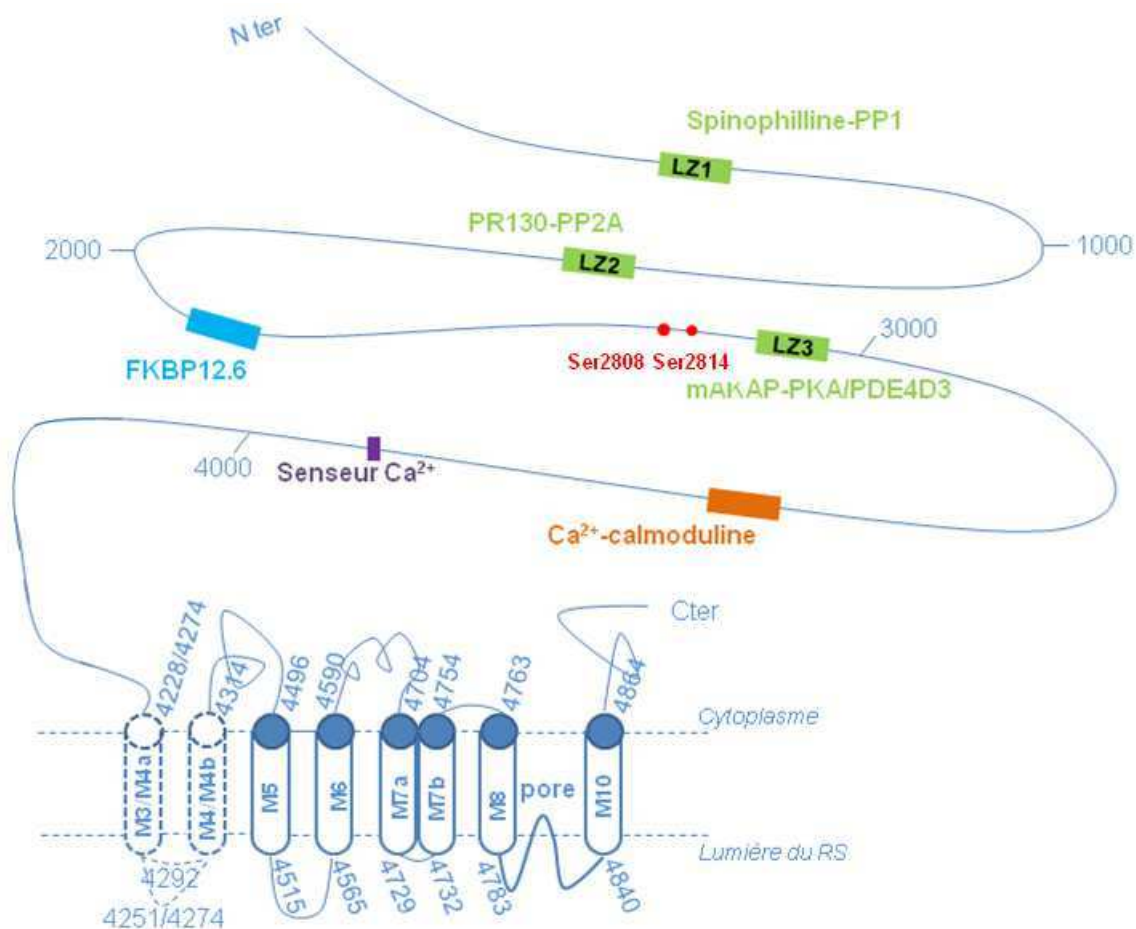
Figure 16. RyR1 de lapin fermé en cryomicroscopie électronique (Ludtke et al., 2005).



➤ Partenaires protéiques, régulations

L'intégrité des interactions entre RyR2 et les protéines régulatrices est essentielle à l'homéostasie calcique du cardiomyocyte (Figure 17) et joue un rôle déterminant au cours des pathologies cardiaques. Les principales protéines cytoplasmiques vont être présentées ici tandis que la triadine, la junctine et la calséquestrine situées dans le RS seront détaillées dans des paragraphes indépendants. En plus des facteurs protéiques, l'activité du canal est également sensible à des facteurs non protéiques, principalement aux variations de concentrations en ions Ca^{2+} cytoplasmique et lumenale.

Figure 17. Domaines fonctionnels sur RyR2 (Wehrens and Marks, 2003).



Les motifs Leucine/Isoleucine-zipper (LZ1, 2 et 3 en vert) interviendraient dans la liaison des phosphatases PP1 et PP2A par l'intermédiaire de la spinophilline et de PR130 (vert). La protéine kinase A (PKA) et la phosphodiesterase 4D3 (PDE4D3) interagissent via mAKAP (muscle A kinase anchoring protein, vert). Les deux sites de liaison de la calmoduline sont figurés en orange. Sont également figurés le site d'interaction de FKBP12.6 (bleu) et les sérines cibles (rouge) de la PKA (2808) et CamKII (Ca^{2+} /calmoduline kinase II, 2814) ainsi qu'un site possible de sensibilité au Ca^{2+} (violet).

a. La calstabine 2 ou FKBP12.6

La protéine FKBP12.6 appartient à la famille des FKBP (FK506 Binding Protein) et est codée par le gène *FKBP1B* situé sur le chromosome 2 chez l'homme. La protéine est également désignée sous le nom de calstabine 2 en raison de son activité stabilisatrice de RyR2. Deux isoformes sont issues de l'épissage alternatif du gène *FKBP1B* différant par leurs parties C-terminales. C'est une enzyme à activité peptidyl-propyl-*cis-trans*-isomérase de 12,6 kDa qui se fixe sur chaque monomère de RyR2 avec une forte affinité et une stœchiométrie de 1:1. La fonction enzymatique peptidyl-propyl-*cis-trans*-isomérase n'est pas nécessaire à la fixation de la protéine sur RyR2. Marx et *al.* ont montré que la phosphorylation de RyR2 par la protéine kinase A dissocie FKBP12.6 et en conséquence augmente la probabilité d'ouverture (P_o) du canal tandis que l'interaction FKBP12.6-RyR2 stabilise l'état fermé du canal (Marx et al., 2000). Cependant, des résultats discordants ont été obtenus par d'autres équipes (Timerman et al., 1996; Xiao et al., 2005). Il a été montré que la liaison de la protéine FKBP12.6 sur RyR2 était sensible à la nitrosylation et à l'état d'oxydation de RyR2, ce qui pourrait expliquer éventuellement les discordances entre certaines études.

Le site de liaison de FKBP12.6 sur RyR2 est controversé. En 2000, des expériences de mutagenèse dirigée ont identifié les résidus Ile 2427 et Pro 2428 comme importants pour la liaison de la protéine FKBP12.6 (Marx et al., 2000). Par la suite, d'autres études utilisant des délétions ciblées ont impliqué une région couvrant les acides aminés 1815 à 1855 (Kushnir et al., 2010). Les futures études cristallographiques de RyR2 permettront certainement de mieux définir les acides aminés impliqués dans cette interaction.

Les souris KO *FKBP1B* présentent une probabilité d'ouverture de RyR2 augmentée, qui est associée à des arythmies ventriculaires déclenchées à l'effort et responsables de morts subites chez l'animal (Wehrens et al., 2003).

b. La calmoduline

La calmoduline est une protéine ubiquitaire de 17 kDa qui possède 4 domaines « EF hands » de liaison du Ca^{2+} . Elle peut se fixer avec une stœchiométrie de 1:1 sur chaque monomère de RyR2, la fixation entraînant une inhibition du canal. Les acides aminés impliqués dans cette interaction ont été identifiés au niveau des acides aminés 3583-3603 (Yamaguchi et al., 2003).

c. Les kinases et phosphatases régulatrices du canal

L'activité de RyR2 est dépendante de l'état de phosphorylation du canal et de ses partenaires par différentes kinases et phosphatases.

Deux protéines kinases sont capables de phosphoryler RyR2 : la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase II dépendante de la Ca^{2+} /calmoduline (CamKII). La PKA est liée au canal

par la protéine mAKAP (muscle A kinase anchoring protein). Cette protéine se lie au niveau de domaines leucine / isoleucine-zippers de RyR2 (LZ3 : AA 3004-3035). La phosphorylation du canal par la PKA sur la sérine 2808 (RyR2 humain) conduit à l'activation du canal, notamment lors du stress. La stimulation du système nerveux sympathique entraîne l'activation des récepteurs β -adrénergiques couplés à des protéines G spécifiques, qui activent l'adénylate cyclase. Celle-ci génère de l'AMP cyclique (AMPC) qui active la PKA, qui à son tour, phosphoryle RyR2. Cette phosphorylation entraîne l'activation de RyR2 par la dissociation transitoire de FKBP12.6 mais également par une autre voie, indépendamment de la présence de FKBP12.6 (Wehrens et al., 2003; Wehrens et al., 2004). Cette activation se mesure par une augmentation de la probabilité d'ouverture P_o du canal. Au niveau cellulaire, la phosphorylation de RyR2 pourrait augmenter la synchronisation de l'ouverture des canaux RyR2. Cette cascade de réaction traduit un effet adaptatif bénéfique, en réponse au stress, permettant une meilleure performance du CEC. Cependant, une hyperphosphorylation chronique du canal par la PKA a un effet délétère lié à un état de sous-conductance permanent qui est retrouvé dans l'insuffisance cardiaque.

Le canal peut également être phosphorylé sur la sérine 2814 par la CaMKII (Wehrens et al., 2004) mais son effet activateur semble moins important que celui de la PKA. Cette phosphorylation est indépendante de l'interaction RyR2-FKBP12.6 et augmente moins la probabilité d'ouverture P_o du canal. Elle semble jouer un rôle important dans la régulation du CEC lors de la modification du rythme cardiaque et serait impliquée dans le contrôle de la relation force-fréquence (Kushnir et al., 2010). La CaMKII pourrait être sensible à la stimulation adrénérge. Certains auteurs lui imputent également un rôle possible dans l'insuffisance cardiaque (Kushnir and Marks, 2010).

Deux phosphatases permettent de déphosphoryler le canal : la protéine phosphatase 1 (PP1) et la protéine phosphatase 2A (PP2A) qui vont se lier au canal par leurs protéines d'ancrage respectives, la spinophiline et la protéine PR130. La protéine PP1 déphosphoryle les sérines 2809 et 2814 tandis que la PP2a déphosphoryle la sérine 2814 (Huke and Bers, 2008).

La phosphodiesterase de type 4D3, PDE4D3 interagit également avec RyR2 par l'intermédiaire de la protéine d'ancrage mAKAP et permet de réduire localement la concentration en AMPC et donc de diminuer l'activité de la PKA. Cette interaction est très étudiée car elle ouvre des perspectives dans les cibles thérapeutiques des troubles du rythme (Kapiloff et al., 2001).

Les partenaires protéiques de RyR2 sont très nombreux. Cette liste n'est pas exhaustive, d'autres protéines interagissant avec RyR2 : la protéine Homer, qui a un rôle structural, la protéine S100A possédant un motif EF-hand, ou la sorcine, dont la liaison aurait un effet

inhibiteur sur RyR2. Enfin, des voies indirectes peuvent impliquer de nombreuses protéines comme la calcineurine ou protéine phosphatase PP2B par exemple. Des facteurs non protéiques peuvent influencer l'activité du canal (calcium, magnésium, ATP, potentiel redox).

d. le calcium

Le facteur le plus important qui régule l'ouverture et la fermeture de RyR2 au niveau cardiaque est l'ion Ca^{2+} (Chen and MacLennan, 1994). Le canal possède deux sites cytosoliques de fixation pour le calcium. L'un, de haute affinité, est responsable de l'activation et de l'ouverture du canal lors du CICR. L'autre, de faible affinité, est impliqué dans l'inactivation du canal à la fin du CICR (Bezprozvanny et al., 1991; Smith et al., 1986; Zimanyi and Pessah, 1991). Lorsque la concentration en Ca^{2+} cytosolique est faible (100 à 200 nM), le canal est en position fermée (Copello et al., 1997). Lorsque la concentration cytosolique en Ca^{2+} augmente, les ions Ca^{2+} se fixent sur les sites de haute affinité du canal et entraînent son ouverture (augmentation de P_o). L'activité du canal est maximale quand la concentration cytosolique atteint 10 μM . Au-delà, l'élévation de la concentration cytosolique va se traduire par une diminution de P_o .

Le canal est également sensible au calcium luminal du RS. Dans un modèle *in vitro* étudiant le canal dans une bicouche lipidique, il a été montré que P_o augmente avec la concentration en Ca^{2+} intraluminal. La constante de dissociation du Ca^{2+} intraluminal déterminant l'activation du RyR avoisine 1 mM, qui est la valeur du Ca^{2+} intraluminal en diastole. En physiologie, le rôle régulateur du Ca^{2+} intraluminal pourrait être double. Il interviendrait dans l'inactivation du canal pour terminer le CICR lorsqu'il atteint une valeur seuil basse. Il maintiendrait le canal inactivé en diastole le temps que le stock calcique du RS se reconstitue (jusqu'à une valeur seuil haute, période réfractaire). Le mécanisme par lequel le canal est sensible au Ca^{2+} luminal du RS reste incertain. La régulation pourrait se faire grâce à un site de fixation du calcium sur sa face luminale et/ou par l'intermédiaire de son interaction avec la calséquestrine. Enfin, cette régulation pourrait résulter du passage du calcium à travers le canal, qui agirait sur les sites cytosoliques de fixation du calcium du canal.

➤ Etudes fonctionnelles *in vitro*, invalidation

RyR2 est le canal calcique clé du RS impliqué dans le couplage excitation-contraction. L'existence d'un canal calcique dans la membrane du RS, nécessaire au déclenchement de la contraction musculaire, a été montrée dès 1992 grâce à la mesure d'un courant calcique à partir d'une préparation de membrane du RS (Coronado et al., 1992). L'étude en bicouche lipidique du RyR purifié a permis d'établir qu'il s'agissait du canal calcique responsable du

relâchement de Ca^{2+} induit par la dépolarisation de la membrane plasmique (Lai et al., 1988). Le RyR est un canal perméable à différents ions monovalents et divalents avec une forte sélectivité pour les cations par rapport aux anions (Coronado et al., 1994; Fill and Copello, 2002). Il présente une conductance élevée pour le Ca^{2+} mais une faible sélectivité pour le Ca^{2+} par rapport aux cations monovalents. En conditions physiologiques, RyR2 laisse passer majoritairement des ions Ca^{2+} en raison de la concentration en Ca^{2+} du RS de l'ordre du millimolaire.

En 1998, Takeshima et al. ont créé une lignée de souris KO *RyR2* (Takeshima et al., 1998). Ces souris ne sont pas viables et décèdent *in utero* à J10 de vie embryonnaire. Des battements cardiaques sont détectables mais les embryons présentent des malformations cardiaques sévères probablement responsables du décès. L'existence de battements cardiaques dans les souris KO *RyR2* fait supposer l'intervention d'autres canaux calciques du RS. Les mécanismes compensateurs les plus évidents à évoquer sont une expression de RyR1 ou RyR3, ou l'intervention du récepteur de l' IP_3 de type II ($\text{IP}_3\text{R-II}$). L' $\text{IP}_3\text{R-II}$ est un canal calcique de la membrane du RS de structure proche du RyR. Il est impliqué dans les voies de signalisation de l' IP_3 , qui jouent un rôle dans la régulation de l'expression des gènes.

En conclusion, ces données soulignent le caractère essentiel de RyR2 dans le développement cardiaque et la mise en place d'un couplage excitation-contraction pérenne (Takeshima et al., 1998).

3. La calséquestrine de type 2 ou Casq2

La calséquestrine est la principale protéine chélatrice du calcium dans la lumière du RS (Beard et al., 2004; Gyorke and Terentyev, 2008; Knollmann, 2009). Elle peut lier le calcium avec une haute capacité et une relativement faible affinité, ce qui permet à la fois le stockage et la libération rapide du Ca^{2+} nécessaire à la contraction musculaire. En plus de sa fonction de liaison du calcium, la calséquestrine possède une propriété de polymérisation et une fonction de « modulation » de l'activité du RyR qui ont été très étudiées.

➤ Les gènes *CASQ1* et *CASQ2*

Il existe deux isoformes de la calséquestrine résultant de l'expression de deux gènes distincts *CASQ1* et *CASQ2*, chacun composé de 11 exons et situé sur le chromosome 1, respectivement en 1q21 et 1p11-p13.3. L'ARNm de *CASQ1* est long de 1993 pb (NM_001231.4) et celui de *CASQ2* de 2716 pb (NM_001232.3). Les deux isoformes présentent une homologie de

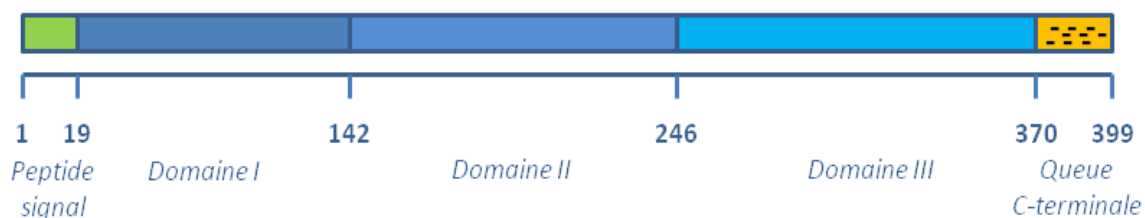
séquences protéiques élevée de 80%. L'isoforme Casq1 (396 AA), dite « squelettique », est exprimée dans le muscle squelettique au niveau des fibres lentes et rapides tandis que l'isoforme Casq2 (399 AA), dite « cardiaque », est la seule présente dans le muscle cardiaque mais est aussi retrouvée dans les fibres lentes musculaires squelettiques de manière minoritaire (25% Casq2 / 75% Casq1). Casq2 est exprimée dans le cœur dès la vie fœtale. Dans le muscle squelettique, au niveau des fibres rapides, Casq2 est prédominante pendant la vie fœtale et en période néonatale. Ensuite, Casq1 est exprimée et remplace Casq2. Au niveau des fibres lentes, il y a également un switch d'isoforme mais Casq2 reste exprimée, bien que minoritaire.

Les deux gènes codent pour un précurseur de la calséquestrine possédant un peptide signal N-terminal (AA 1-34 pour Casq1 et AA 1-19 pour Casq2). Le précurseur perd ensuite son peptide signal pour former la protéine mature d'environ 40 kDa.

➤ Structure, liaison du calcium et polymérisation de Casq2

La structure primaire de la protéine montre qu'il s'agit d'une protéine très riche en résidus acides dont les charges électro négatives vont intervenir dans la liaison des ions Ca^{2+} (Figure 18).

Figure 18. Représentation schématique de la protéine Casq2 humaine.

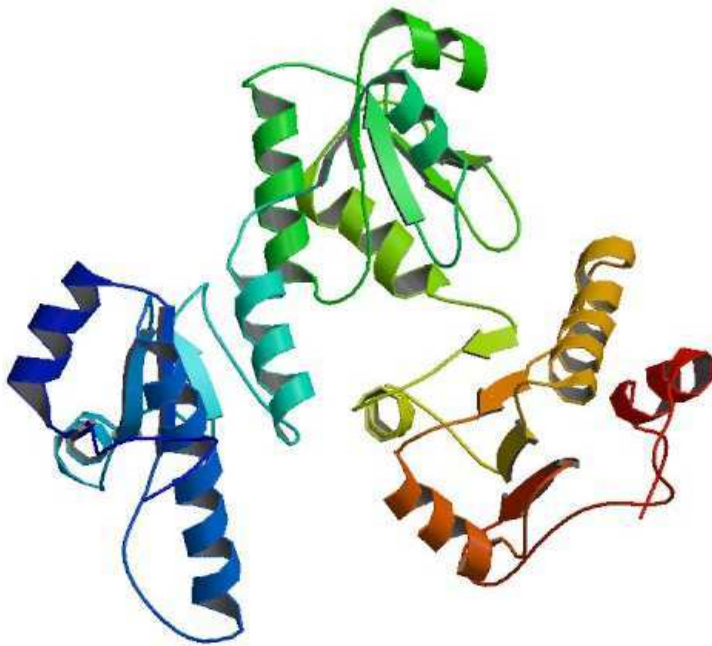


Les numéros correspondent aux acides aminés limitant chaque domaine. Les signes - - - soulignent la richesse en résidus chargés négativement de la partie C-terminale de Casq2.

La structure cristallographique de la calséquestrine cardiaque a été déterminée en 2004 chez le chien puis en 2007 chez l'homme (Kim et al., 2007; Park et al., 2004; Wang et al., 1998). Les études ont permis d'identifier trois domaines identiques de type thioredoxine-like pour chaque monomère, désignés comme domaine I, II et III. Au niveau de Casq2 humaine, le domaine I est réparti des acides aminés 22 à 142, le domaine II des acides aminés 143 à 246 et le domaine 3 des acides aminés 247 à 370 suivi d'une queue C-terminale de 29 acides aminés riche en charges négatives (Figures 18 et 19, (Kim et al., 2007)). Chaque domaine est constitué de 5 feuillets β et de 4 hélices α alternés formant un centre hydrophile entouré de

résidus acides en périphérie, générant des surfaces électronégatives. L'ensemble fait que le centre de la protéine est plutôt hydrophile qu'hydrophobe. Les cations (Ca^{2+}) vont alors permettre de stabiliser le centre acide de la molécule.

Figure 19. Représentation schématique de la structure de la calséséquestrine cardiaque humaine (2VAF).

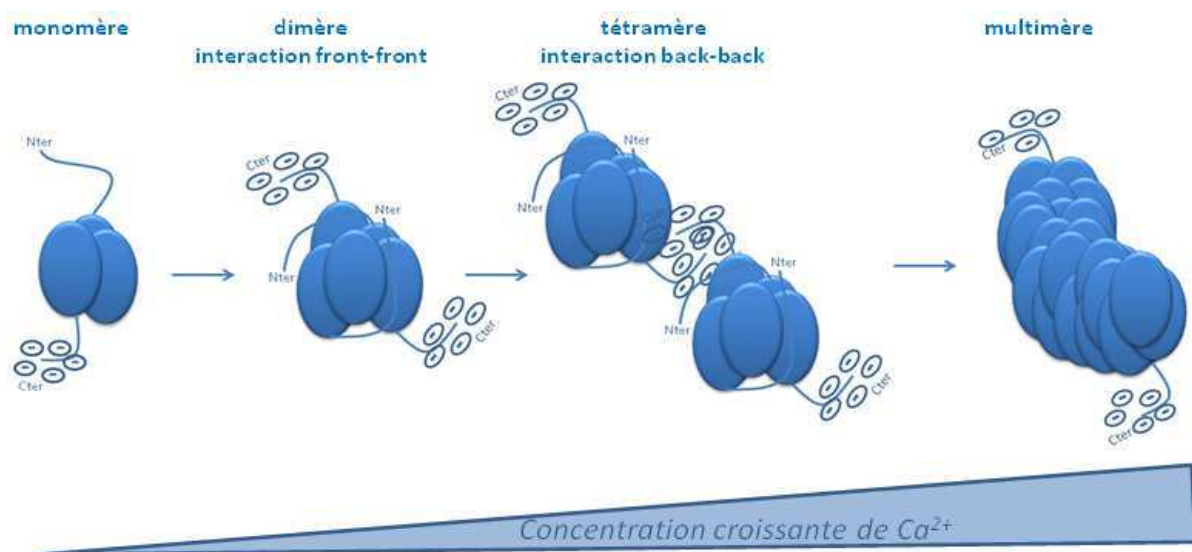


La structure cristallographique est déterminée des acides aminés 22 à 399. Les trois domaines thioredoxine-like sont distingués par des teintes différentes (Kim et al., 2007).

A la différence de protéines comme la calmoduline ou la troponine C, la calséséquestrine ne possède pas de site de liaison du Ca^{2+} précis comme un motif « EF-hand ». Chaque monomère de calséséquestrine contient environ 50 sites de liaison pour l'ion Ca^{2+} , sites qui sont simplement formés par le regroupement d'au moins deux résidus chargés négativement avec une interaction électrostatique entre l'ion divalent Ca^{2+} et les charges négatives des acides aminés de la protéine. La capacité de liaison de la calséséquestrine est de l'ordre de 40 à 50 moles de Ca^{2+} par mole de calséséquestrine avec une faible affinité ($K_d \sim 1\text{mM}$). Cette propriété permet de stocker le calcium dans le RS jusqu'à une concentration totale de 20 mM alors que la concentration en calcium libre avoisinerait 1 mM. Ceci permet de prévenir la précipitation du calcium dans le RS et de réguler la SERCA et RyR2 via la concentration calcique luminaire.

Les expériences réalisées par Park et al. à l'aide de protéines tronquées ont permis de montrer que la polymérisation de la calséquestrine dépendrait de la concentration calcique (Figure 20, (Park et al., 2003)). Brièvement, la calséquestrine est sous forme monomérique lorsque la concentration en Ca^{2+} est faible et elle polymérise lorsque la concentration en Ca^{2+} augmente ($>1\text{mM}$). Ainsi, en l'absence de calcium, la calséquestrine est non repliée du fait de la répulsion intramoléculaire liée aux charges négatives. Lorsque la concentration calcique augmente, les domaines thioredoxine-like de la protéine s'assemblent. A une concentration supérieure de calcium, des interactions « front-to-front » se mettent en place impliquant les extrémités N-terminales de la protéine et entraînant la formation de dimères. Ensuite, des interactions « back-to-back » qui impliquent les régions riches en résidus négatifs comme la queue C-terminale interviennent et permettent la formation de tétramères et de polymères linéaires résultant d'un assemblage de dimères « front-to-front » et « back-to-back » (Park et al., 2003). En microscopie électronique, les polymères de calséquestrine sont visualisables sous forme de structures denses aux électrons au niveau du RS jonctionnel.

Figure 20. Modèle de polymérisation de la calséquestrine en fonction de la concentration calcique.



➤ Localisation, modifications post-traductionnelles, partenaires protéiques

La calséquestrine est située dans la lumière du réticulum sarcoplasmique jonctionnel des cellules musculaires striées où elle interagit avec la triadine et la junctine au sein du CRC. Le mécanisme de rétention de la calséquestrine dans la lumière du RS reste incomplètement compris. Il a été évoqué que la polymérisation de la calséquestrine et/ou son interaction avec les autres protéines du CRC soient impliquées dans sa rétention. Ainsi, l'insertion d'étiquettes dans la séquence de la calséquestrine ou la modification du milieu intraluminal provoquent la

perte de la rétention de la protéine. Par ailleurs, l'absence de triadine chez la souris est associée à une perte de la concentration de la calséquestrine au niveau jonctionnel et à une délocalisation dans l'ensemble du RS (Houle et al., 2006; Shen et al., 2007).

Casq2 possède un site de N-glycosylation en position 335 de la séquence humaine. La question s'est posée de savoir si cette glycosylation pouvait avoir un rôle dans l'adressage de la protéine. Les différentes études réalisées vont à l'encontre de cette hypothèse puisque, ni la délétion du site de glycosylation sur Casq1, ni l'hyperglycosylation de Casq2 n'altère l'adressage de la protéine (Kirchhefer et al., 2010; Nori et al., 2001).

La phosphorylation *in vitro* de la calséquestrine par la caséine kinase II ainsi que l'identification de séquences consensus (Ser/Thr-X-X-Asp/Glu) de phosphorylation par cette enzyme dans la calséquestrine sont connues. Deux sites de phosphorylation de la protéine Casq2 humaine ont été identifiés au niveau des sérines 385 et 393 situées dans la partie C-terminale de la protéine. Les études des caractéristiques physico-chimiques d'une protéine Casq2 mutée S385D et S393D suggèrent que la phosphorylation de la protéine sur ces deux sites rendrait la partie C-terminale « plus stable » et augmenterait la capacité de liaison du calcium de la protéine (Sanchez et al., 2011).

La calséquestrine interagit avec la triadine et la junctine, et donc indirectement via ces deux protéines, elle interagit avec RyR2. Une interaction directe de la calséquestrine avec RyR2 a également été envisagée. L'interaction de la calséquestrine avec les autres protéines du CRC impliquerait la partie N-terminale ou C-terminale de la protéine chargée. La région d'interaction de la calséquestrine avec la triadine a été définie plus précisément au niveau d'une séquence riche en résidus aspartate au niveau des acides aminés 354 à 367 (Shin et al., 2000).

➤ Etudes fonctionnelles *in vitro*, surexpression, invalidation génique

Du fait de son interaction avec les protéines du CRC, outre son rôle de chélateur calcique, la calséquestrine aurait un effet régulateur sur la libération de calcium du RS via le CRC.

Sur un modèle de bicouche lipidique où a été incorporé le RyR2 purifié, l'addition de Casq2 sur le versant luminal du canal ne modifie pas la probabilité d'ouverture du canal ni sa réponse au calcium luminal. L'addition de triadine et de junctine entraîne une augmentation de l'activité du canal mais le canal reste insensible au calcium intraluminal. L'addition de Casq2 avec de la triadine et de la junctine entraîne une diminution importante de l'activité de RyR, suggérant que Casq2 puisse servir de capteur qui inhiberait le canal à des basses concentrations calciques (Gyorke and Terentyev, 2008). Le modèle suivant a été proposé : 1)

lorsque les concentrations de calcium sont basses, la calséquestrine, qui se trouve sous forme monomérique, interagit avec la triadine et la junctine +/- RyR2 et exerce un effet inhibiteur sur le relâchement de calcium. Ceci pourrait expliquer l'inactivation de RyR2 suite au CICR, en accord avec la sensibilité du canal au Ca²⁺ luminal. 2) lorsque la concentration de calcium est plus élevée, la calséquestrine s'assemble pour former des dimères, des tétramères puis des polymères linéaires de grande taille et enfin, pour des concentrations de calcium encore plus élevées, la calséquestrine n'interagirait plus avec ses partenaires au sein du CRC, levant son effet inhibiteur, au moment du CICR par exemple (Figure 20, (Gyorke and Terentyev, 2008)). Des modèles murins de surexpression de Casq2 ont été obtenus par deux groupes différents. La surexpression entraîne une hypertrophie cardiaque sévère associée à une diminution de la contractilité myocardique, de l'amplitude du transitoire calcique et de l'amplitude et de la fréquence des étincelles calciques (Jones et al., 1998).

Un modèle de souris KO *CASQ2* a été créé (Knollmann et al., 2006). En conditions basales, la fonction contractile cardiaque des souris KO est normale avec une libération du calcium et un contenu calcique dans la lumière du RS normaux. Cependant, lors d'une exposition des souris aux catécholamines, la fuite diastolique est augmentée entraînant des libérations spontanées de calcium anormales. Des épisodes de tachycardies ventriculaires polymorphes non soutenues et des contractions ventriculaires prématurées ont été observées chez quelques souris. Au total, ces données ont mis en évidence un rôle de Casq2 dans la libération de calcium lors de stimulation adrénergique. L'absence de Casq2 n'était pas compensée par une expression de Casq1, ni par une augmentation de la calréticuline, une autre protéine chélatrice du calcium dans le RS. Un autre modèle de souris déficiente a été créé par délétion de l'exon 9 du gène *CASQ2*. L'ARNm (ARN messenger) de Casq2 est indétectable et ainsi que la protéine. De manière intéressante, le taux de calréticuline est augmenté mais les analyses ont été réalisées sur des souris plus âgées présentant une hypertrophie cardiaque. Le contenu calcique du RS et le transitoire calcique sont inchangés au repos. La souris présentait par ailleurs des arythmies ventriculaires déclenchées lors d'une stimulation adrénergique, globalement comparables aux souris KO *CASQ2* (Alcalai et al., 2011; Song et al., 2007).

Casq2 ne semble pas indispensable à la vie comme le montrent les données animales. Son rôle lors de l'adaptation au stress adrénergique apparaît fondamental, son absence entraînant alors la survenue de troubles du rythme cardiaque.

4. La triadine cardiaque CT1

CT1 est codée par le gène *TRDN*. Cette protéine transmembranaire du RS participe au CRC dans les cellules musculaires striées cardiaque et squelettique (Gyorke and Terentyev, 2008; Knollmann, 2009; Marty et al., 2009; Peng et al., 1994; Perez, 2011).

➤ Le gène *TRDN*

Le gène *TRDN* constitué de 41 exons et long de 420 000 pb, se situe en 6q22-q23 chez l'homme (Thevenon et al., 2003). Quatre isoformes principales ont été décrites issues de l'épissage alternatif du gène : Trisk95, Trisk 51, Trisk 49 et Trisk 32 (Marty et al., 1995; Thevenon et al., 2003). Trisk est un acronyme pour Triadin Skeletal et le nombre qui est adjacent correspond au poids moléculaire théorique de chaque isoforme. Ces quatre isoformes ont été clonées initialement à partir de muscle squelettique de rat au laboratoire. Les isoformes principales exprimées dans le muscle squelettique sont Trisk 95 et Trisk 51. Dans le muscle cardiaque, la triadine de 32 kDa, Trisk 32, aussi désignée par CT1 pour Cardiac Triadin isoforme 1, est la seule isoforme exprimée en quantité significative (Kobayashi and Jones, 1999).

Figure 21. Organisation du gène *TRDN* et du transcrit CT1 (d'après Thévenon et al., 2003).



Le gène de la triadine comporte 41 exons, le transcrit CT1 est issu des exons 1 à 8 et 8b (8 bis). Les exons 1 à 8 sont communs à l'ensemble des isoformes tandis que l'exon 8bis est spécifique à CT1. La flèche noire indique le codon de terminaison du transcrit CT1. Les exons 9 à 41 codent pour les autres isoformes de la triadine.

Le transcrit de CT1 est composé des exons 1 à 8, communs aux différentes isoformes de la triadine, et de l'exon 8 bis, spécifique de cette isoforme (Figure 21). L'étude du rôle de la protéine du spliceosome SRp38 a permis de proposer que cette protéine permette l'inclusion de l'exon 8 bis au niveau de l'ARN de CT1 lors de l'épissage du pré-ARNm de *TRDN* au niveau cardiaque (Feng et al., 2009). Feng et ses collègues ont en effet montré que 1) SRp38 se lie *in vitro* spécifiquement sur l'exon 8 bis du pré-ARNm de CT1 et favorise son inclusion dans l'ARNm et 2) l'inactivation du gène SRp38 dans un modèle murin est associée à une diminution de l'ARNm de CT1 d'un facteur 4 à 5 au niveau cardiaque (Feng et al., 2009).

➤ La protéine CT1

L'isoforme cardiaque de la triadine CT1 ou Trisk 32 est composée de 287 AA chez le rat, et a un poids moléculaire de 32 kDa (Marty et al., 2009; Peng et al., 1994; Vassilopoulos et al.,

2005).

L'identité stricte entre Trisk 32 et CT1 a été démontrée grâce au clonage du cDNA de cette isoforme à partir des tissus musculaires cardiaque et squelettique chez le rat et la souris, et la reconnaissance de l'isoforme à l'aide d'anticorps spécifique de Trisk 32 dans les deux tissus (Kobayashi and Jones, 1999; Marty, 2004).

Initialement, trois isoformes de la triadine avaient été rapportées dans le cœur : CT1, CT2 et CT3 mais il a été montré que l'isoforme CT2 correspondait à une forme glycosylée de CT1 et l'existence de CT3 (≈ 90 kDa) n'a jamais clairement été démontrée par la suite (Hong et al., 2001; Kobayashi and Jones, 1999). Dans un modèle de souris KO *TRDN*, un immunoblot réalisé à partir d'homogénat cardiaque a permis de montrer la disparition du doublet présent aux alentours de 35-40 kDa, correspondant à la triadine CT1 glycosylée et non glycosylée, tandis que la bande de poids moléculaire apparent de 92 kDa persistait chez la souris KO, suggérant que cette bande était due à une réaction croisée non spécifique (Chopra et al., 2009).

La protéine CT1 est constituée d'un segment N-terminal cytoplasmique, suivi d'une hélice transmembranaire (AA 48-68) et d'un segment intraluminal C-terminal (Figure 22, (Knudson et al., 1993; Marty et al., 1995)). La partie N-terminale cytoplasmique, le segment transmembranaire et le début de la partie luminaire sont communs à toutes les isoformes de la triadine (AA 1-264) qui se distinguent par la longueur de leur partie C-terminale et par leurs derniers acides aminés spécifiques à chacune d'elles (Marty, 2004).

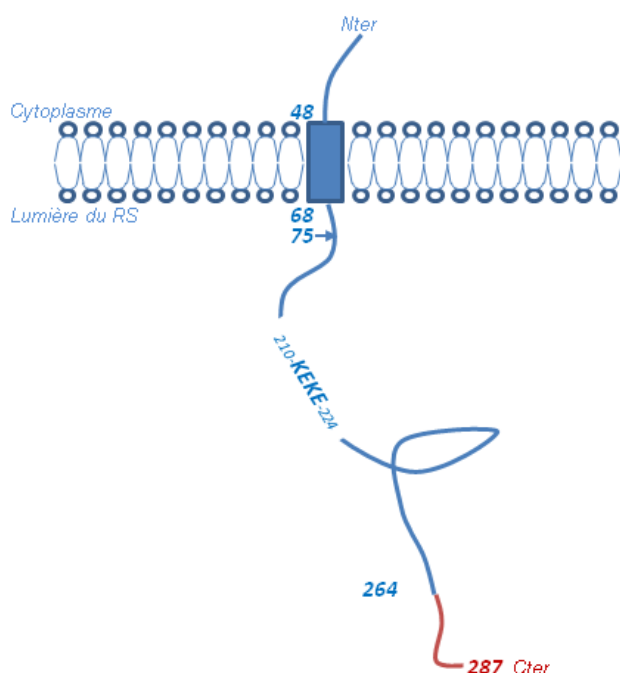


Figure 22. Représentation schématique de la triadine cardiaque CT1.

La numérotation des acides aminés correspond à la séquence CT1 de rat. La séquence est commune à l'ensemble des isoformes des acides aminés 1 à 264. La séquence spécifique de CT1 est en rouge (AA 265-286). La séquence transmembranaire est figurée par un rectangle bleu (AA 48-68). Le site de glycosylation en position 75 est figuré par une flèche. Le domaine d'interaction de CT1 avec RyR2 et Casq2 est indiqué par les lettres KEKE.

Le site de glycosylation de la protéine CT1 a été défini au niveau de l'asparagine en position 75 (N-glycosylation), dans la région luminale de la protéine, juste après le segment transmembranaire (Kobayashi and Jones, 1999). Il existe un équilibre entre la forme glycosylée et la forme non glycosylée de la protéine. Il a été montré que la forme glycosylée est dégradée plus activement par le protéasome que la forme non glycosylée, suggérant un rôle de la glycosylation dans la régulation du taux de triadine (Milstein et al., 2008).

Un domaine d'interaction de la protéine CT1 avec RyR2 et Casq2 a été identifié dans la partie luminale de la protéine commune à l'ensemble des isoformes de la triadine. Ce domaine est composé d'une alternance de lysines (acide aminé K) et de glutamates (acide aminé E), d'où son nom : domaine « KEKE ». Les acides aminés 210 à 224 de la triadine, chargés positivement, interagissent avec la région riche en aspartates de Casq2 (AA 354-367), chargées négativement, par une interaction de type « polar zipper » (Kobayashi et al., 2000; Terentyev et al., 2005). La séquence 210 à 224 de la triadine formerait un feuillet bêta, n'impliquant dans cette interaction que les acides aminés pairs (Kobayashi et al., 2000). Les acides aminés 4837 et 4838 de RyR2 participeraient à l'interaction du canal avec CT1 (Goonasekera et al., 2007).

➤ Etudes fonctionnelles

Plus de 20 ans après la découverte de la triadine et malgré de nombreuses études, son rôle reste incomplètement compris.

Lors de sa découverte, il a été proposé que la triadine serve de lien entre le RyR et le DHPR (Caswell et al., 1991). Cette idée fut abandonnée, son extrémité N-terminale de 47 acides aminés étant trop courte pour couvrir la distance qui sépare la membrane du RS, dans laquelle est le RyR, de la membrane plasmique, dans laquelle est le DHPR.

Par la suite, plusieurs rôles ont été envisagés :

- Il a été proposé que la triadine, du fait de son interaction avec RyR2 et Casq2, permette l'« ancrage » de Casq2 à RyR2 et sa concentration dans le RS jonctionnel, permettant ainsi le maintien d'un stock calcique à proximité du RyR (Guo and Campbell, 1995; Zhang et al., 1997).
- Il a été évoqué un rôle modulateur, a priori activateur, de l'activité canalaire de RyR2 par la triadine, qui a pu être mis en évidence par différentes études considérant l'influence de la triadine sur le relâchement du Ca^{2+} par le RyR (Gyorke et al., 2004; Kirchhefer et al., 2001; Terentyev et al., 2005).

- Enfin, plus récemment des études ont montré que la triadine est impliquée dans le maintien et/ou la mise en place de l'intégrité structurale et fonctionnelle du CRC (Chopra et al., 2009; Oddoux et al., 2009; Shen et al., 2007).

La fonction de la triadine cardiaque a été étudiée par différentes approches, études sur bicouches lipidiques, surexpression, modèle murin d'inactivation du gène *TRDN*.

Brièvement, les études réalisées sur des bicouches lipidiques et les études de surexpression sur des cardiomyocytes ont permis de montrer que la triadine active la libération du calcium du RS par le RyR (Gyorke et al., 2004; Kirchhefer et al., 2007; Kirchhefer et al., 2001; Kirchhof et al., 2007; Terentyev et al., 2005).

Une souris transgénique surexprimant CT1 a été créée en 2001 avec laquelle différentes expériences ont été réalisées (Kirchhefer et al., 2001). Dans les cardiomyocytes, l'imagerie calcique met en évidence une augmentation de la durée et l'amplitude des relâchements de Ca^{2+} . Les expériences de voltage clamp montrent que la surexpression de CT1 diminue l'entrée de Ca^{2+} par le DHPR et augmente la durée nécessaire à son activation. *In vivo*, l'effort (nage) ou la mise en condition de stress mental (« air jet test ») déclenchent des tachycardies ventriculaires chez la souris (Kirchhefer et al., 2001; Kirchhof et al., 2007).

Une première souris KO *TRDN* a été obtenue et sa caractérisation cardiaque publiée en 2009 (Chopra et al., 2009). Une souris KO *TRDN* a également été créée au laboratoire présentant également un phénotype cardiaque (Oddoux et al., 2009; données non publiées)). La composition protéique et la structure du CRC cardiaque sont altérées par l'absence de triadine. Le niveau d'expression des protéines du RS jonctionnel, RyR2, Casq2, la junctine et la junctophiline 2, est réduit de moitié ou plus par rapport aux souris sauvages. Le niveau des autres protéines étudiées, le DHPR et SERCA2a, est inchangé. L'étude ultrastructurale montre une diminution de la surface des contacts entre le RS jonctionnel et les tubules T. Par ailleurs, les études en immunofluorescence montrent une diminution de la co-localisation de RyR2 et Casq2, avec un marquage de Casq2 compatible avec une localisation dans l'ensemble du RS. Une partie de Casq2 n'étant plus liée à la triadine, elle se disperserait dans le RS. Les analyses mettent également en évidence une diminution de la co-localisation de RyR2 et du DHPR. Ces résultats suggèrent une possible perte de l'interface RyR-DHPR et consécutivement une anomalie du CEC lié au CICR dont la fonction correcte implique une interface correcte.

Les changements dans la structure et la composition protéique du CRC ont des conséquences

fonctionnelles importantes. Le CICR est diminué et le rétrocontrôle négatif de la libération de calcium par le RS sur le DHPR est altéré. L'homéostasie calcique est perturbée avec une augmentation du contenu en Ca^{2+} du RS et une diminution de l'amplitude du transitoire calcique. *In vivo*, les souris KO présentent des troubles du rythme ventriculaire déclenchés par les catécholamines. En conséquence, les auteurs ont proposé, comme support physiopathologique des arythmies ventriculaires, qu'une entrée de calcium persistante par le DHPR contribuerait à la surcharge calcique du RS, et entraînerait une augmentation de la fréquence de libération calcique spontanée du RS, support connu des arythmies lors de stimulation adrénergique.

Il s'agissait à notre connaissance de la première observation qui abordait l'implication possible de la triadine dans la mise en place ou le maintien de l'architecture diadique au niveau cardiaque.

Le phénotype musculaire squelettique de la souris KO *TRDN* a été caractérisé à partir des deux modèles murins précités (Oddoux et al., 2009; Shen et al., 2007). Une diminution du taux de calséquestrine est retrouvée alors que l'expression de RyR et de la junctine est peu modifiée. Des anomalies ultrastructurales sont présentes au niveau des triades (interface tubules T-RS dans le muscle squelettique). Une diminution de l'amplitude du transitoire calcique et une diminution de la force musculaire sont observées.

Au total, même si le rôle de la triadine reste encore incomplètement compris, son implication dans le CRC et les phénotypes cardiaques et musculaires mis à jour dans les différents modèles d'études animaux ont suggéré qu'elle soit impliquée en pathologie chez l'homme, même si aucune mutation de ce gène n'avait été mise en évidence à ce jour. Les pathologies où son implication a été supposée sont celles où des protéines du CRC sont déjà connues. Il s'agit :

- au niveau musculaire squelettique, de l'hyperthermie maligne ou des myopathies à cores qui sont associées à des mutations de RyR1.
- en rythmologie cardiaque, de la TVPC qui est associée à des mutations de RyR2 et Casq2.

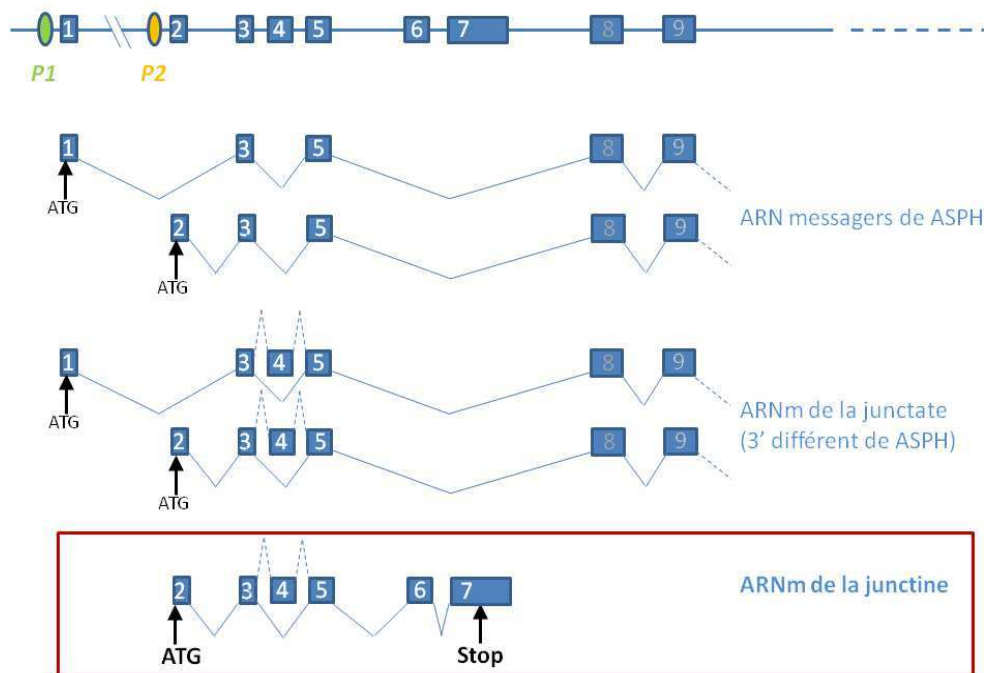
5. La junctine

Il a été proposé que la triadine et la junctine aient un rôle proche ou redondant du fait de similarités entre ces deux protéines concernant leur localisation, leur structure et leurs domaines d'interactions.

➤ Le gène *ASPH*

Le gène *ASPH* situé en 8q12.1 chez l'homme code pour trois protéines distinctes issues de l'épissage alternatif de ce gène : la junctine, la junctate ou protéine Humbug, et la protéine aspartate β -hydroxylase, ou *ASPH* (Figure 23). Ce gène est constitué de 30 exons connus et de deux promoteurs P1 et P2. La junctate et la protéine *ASPH* sont exprimées sous la dépendance du promoteur P1 dans de nombreux types cellulaires tandis que la junctine est exprimée exclusivement sous la dépendance du promoteur P2 de manière tissu-spécifique au niveau du muscle strié et du cœur (Feriotto et al., 2007; Feriotto et al., 2005). Le codon initiateur de la junctine situé dans l'exon 2 est distinct de celui des isoformes plus longues des protéines junctate et *ASPH* situé dans l'exon 1. Il existe deux isoformes de la junctine chez l'homme : une isoforme longue codée par les exons 2 à 7, et une isoforme courte similaire, sauf qu'elle est dépourvue de l'exon 4 (Figure 23). Seuls les exons 6 et 7 sont spécifiques de la junctine tandis que les exons 2 à 5 sont présents dans des isoformes de la junctate et de la protéine *ASPH*.

Figure 23. Structure et organisation de la partie 5' du gène *ASPH* (d'après Feriotto et al., 2003).



Les chiffres indiquent les numéros des exons. Les promoteurs sont indiqués par P1 et P2. L'épissage permettant l'obtention des ARNm de la junctine sont encadrés en rouge. (ARNm : ARN messenger)

- La junctine, différences avec la junctate et la protéine ASPH, structure et partenaires protéiques

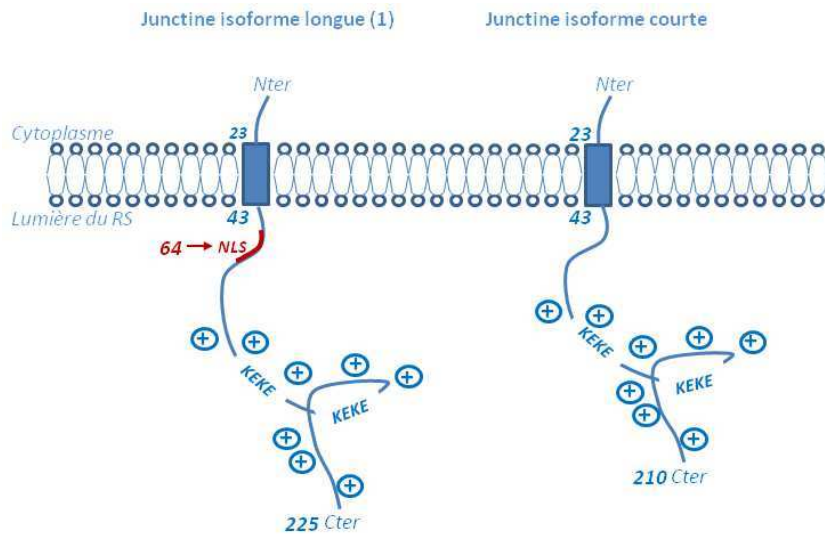
Les trois protéines junctine, junctate et ASPH sont des protéines transmembranaires à un segment membranaire. Leurs parties N-terminales et leurs séquences transmembranaires ont des séquences similaires mais elles diffèrent par leur partie C-terminale.

La protéine ASPH catalyse la réaction post-traductionnelle d'hydroxylation du carbone β des résidus aspartate ou asparagine de domaines EGF-like de nombreuses protéines (la protéine C, les facteurs de coagulation VII, IX et X, les facteurs du complément C1R et C1S). Il a été envisagé que cette protéine puisse être impliquée dans certains processus métastatiques (Lavaissiere et al., 1996). La junctine et la junctate sont dépourvues dans leur partie C-terminale du domaine β -hydroxylase comprenant l'activité catalytique de la protéine ASPH.

La protéine junctate est une protéine de 32 kDa exprimée dans de nombreux types cellulaires où elle se situe dans la membrane du réticulum. Cette protéine est capable de lier le calcium avec une haute capacité et une faible affinité (Treves et al., 2000).

La junctine est exprimée uniquement au niveau des muscles squelettiques et cardiaque (Jones et al., 1995). L'isoforme courte de 210 acides aminés a une masse moléculaire de 24 kDa, et la longue de 225 acides aminés, 26 kDa (Figure 24). Comme la triadine, la junctine présente un segment N-terminal cytoplasmique (AA 1-22) suivi d'une hélice alpha transmembranaire (AA 23-43) et d'un segment intraluminal C-terminal (AA 44-Cter). La séquence transmembranaire de la junctine présente 60% d'identité avec la séquence de la triadine. La partie intraluminaire C-terminale de la protéine possède des motifs KEKE impliqués dans l'interaction de la protéine avec la calséquestrine, la triadine et le RyR (Zhang et al., 1997). A la différence de la triadine, la junctine ne semble pas posséder un domaine distinct de liaison avec la calséquestrine puisque la délétion de différents motifs KEKE est associée à une diminution de l'interaction entre les deux protéines. L'isoforme longue possède une séquence consensus NLS de N-glycosylation (AA 64).

Figure 24. Représentation schématique des deux isoformes de la junctine (d'après Treves et al., 2000).



L'isoforme longue contient une insertion de 15 acides aminés (AA 57-71, rouge). La position 64 correspond à une asparagine située dans une séquence consensus de N-glycosylation NLS (Asn-Leu-Ser). Les + indiquent l'importance des acides aminés chargés positivement dans la séquence primaire.

➤ Etudes fonctionnelles

La junctine participe au CRC où elle aurait à la fois, un rôle d'« ancrage » de la calséquestrine, une fonction structurale dans la dyade, et une fonction régulatrice des relâchements de Ca^{2+} . Les études réalisées à l'aide de bicouche lipidique montrent un rôle activateur de RyR2 (Gyorke et al., 2004). En même temps, la surexpression de la junctine à l'aide d'adénovirus entraîne une diminution du transitoire calcique et de la capacité de raccourcissement des cardiomyocytes. La répression de son expression par l'utilisation d'antisens induit l'effet inverse. La surexpression de la junctine dans le cœur chez une souris transgénique conduit à une hypertrophie cardiaque associée à une diminution du taux d'expression de la triadine, de la calséquestrine et de l'échangeur NCX, ainsi qu'une modification du transitoire calcique. Outre ces données, les auteurs ont mis en évidence des modifications ultrastructurales du RS (réduction de l'épaisseur des citernes terminales, augmentation de la densité de la calséquestrine sous les pieds de RyR, augmentation des contacts entre la citerne terminale et le tubule T) (Gyorke and Terentyev, 2008; Zhang et al., 2001). La suppression de la junctine dans un modèle de souris KO entraîne une augmentation marquée du taux d'expression de l'échangeur NCX mais pas de modification marquée de la triadine et la calséquestrine. Le transitoire calcique est modifié avec une augmentation de la charge calcique du RS, associé à une augmentation de l'amplitude et de la fréquence des étincelles calciques. L'étude de l'activité électrique cellulaire a permis de mettre en évidence la survenue de post-dépolarisations tardives. Après injection d'isoprotérénol, les souris

présentaient des arythmies comprenant des contractions ventriculaires prématurées, des blocs auriculo-ventriculaires, des tachycardies ventriculaires. Les souris déficientes en junctine présentaient une mortalité augmentée, un quart des souris décédant avant trois mois et la moitié avant un an sans anomalie cardiaque morphologique identifiée (Yuan et al., 2007). Les modèles animaux soulignent le rôle de la junctine dans la physiologie de l'homéostasie calcique cardiaque, et la sévérité du phénotype associé à son absence.

Le tableau ci-dessous résume les observations obtenues à partir des différents modèles transgéniques de souris ayant permis l'étude fonctionnelle de Casq2, la triadine et la junctine.

Tableau 2. Caractéristiques cardiaques principales des souris Casq2 nulles, Trdn nulles et Jcn nulles (d'après (Hong et al., 2007; Knollmann, 2009; Yuan et al., 2007)).

	Casq2 nulle	Trdn nulle	Jcn nulle
Aspects structuraux			
Hypertrophie cardiaque	+	++	0
Ultrastructure RS	modifiée	modifiée	np
Volume RS	↓	inchangée	np
Nombre et surface dyades	inchangée	↓ (50%)	np
Expression protéique			
RyR2	inchangée	↓ (50%)	inchangée
Casq2	<i>absente</i>	↓ ↓	inchangée
Triadine	↓ ↓	<i>absente</i>	inchangée
Junctine	↓ ↓	↓ ↓	<i>absente</i>
NCX	np	np	↑
SERCA2A	inchangée	inchangée	inchangée
Aspects fonctionnels (repos)			
Contractilité cardiaque <i>in vivo</i>	inchangée	↑	↑
Libération de Ca ²⁺ du RS (fraction libérée)	inchangée (↑)	↓ (↓)	↑
Contenu en Ca ²⁺ du RS	↓ modérée	↑	↑
SERCA2A	inchangée	inchangée	
Conséquences d'une stimulation à l'isoprotérénol			
Fuite de Ca ²⁺ du RS	↑ ↑	↑ ↑	
Libération prématurée de Ca ²⁺ du RS	↑ ↑	↑ ↑	
Contraction cardiaque prématurée	↑ ↑	↑ ↑	
Contenu en Ca ²⁺ du RS	↓	↑	↑
Risque d'arythmies <i>in vivo</i>	↑ ↑	↑ ↑	↑ ↑

(np : non précisé)

On notera que :

- L'absence de Casq2 ou de CT1 est associée à des anomalies ultrastructurales du RS. On ne sait pas si ces anomalies sont en faveur d'un rôle structural de ces protéines ou une conséquence d'anomalies du cycle calcique.
- L'absence de ces deux mêmes protéines est associée à une chute d'expression de la junctine alors que l'absence de la junctine ne modifie pas leur expression mais entraîne une augmentation de l'expression du NCX.

- L'absence de Casq2 ne modifie pas les paramètres de contractilité au repos mais seulement à l'effort, alors que l'absence de triadine ou de junctine modifie les paramètres de repos.
- L'absence de l'une de ces protéines augmente le risque d'arythmies *in vivo* lors de stimulation adrénergique.

Ces données soulignent l'importance de ces trois protéines dans le cycle calcique du RS et leur implication potentielle dans la genèse de troubles du rythme cardiaque.

VI. Les troubles du rythme héréditaires

Les troubles du rythme ventriculaire d'origine héréditaire sont des pathologies rares mais sévères. Elles sont associées à un risque de mort subite, et se manifestent fréquemment par des histoires familiales de syncope et/ou de mort subite. Elles sont désignées sous le terme de canalopathies car elles sont causées par des mutations dans des gènes codant pour des canaux ioniques ou des protéines associées. Les quatre syndromes les plus fréquents sont le syndrome du QT long congénital (LQTS), le syndrome du QT court (SQTS), le syndrome de Brugada et la Tachycardie Ventriculaire Polymorphe Catécholaminergique (TVPC).

1. La mort subite d'origine cardiaque

La mort subite d'origine cardiaque (MS) est définie comme une mort naturelle dans l'heure qui suit le début des symptômes, due à une cause cardiaque impliquant une perte brutale de conscience, en présence ou en absence de maladie cardiaque préexistante.

Les morts subites d'origine cardiaque selon cette définition représentent 250 000 à 400 000 morts par an aux Etats-Unis (Merri et al., 1989; Towbin, 1995). Elles représentent la moitié de la mortalité des maladies cardio-vasculaires et sont la cause de mort la plus fréquente chez l'adulte aux Etats-Unis (Zipes and Wellens, 1998). Il existe une prédominance masculine de la MS d'origine cardiaque qui est trois fois plus fréquente chez l'homme que chez la femme.

La grande majorité des MS d'origine cardiaque est secondaire à une maladie cardiaque (atteinte coronarienne, insuffisance cardiaque, cardiomyopathies, valvulopathies, malformations congénitales). Elles sont dues à un trouble du rythme aigu fatal, comme la tachycardie ventriculaire ou la fibrillation ventriculaire et peuvent constituer la première manifestation de la maladie cardiaque (25-50% des cas).

En opposition, les décès par fibrillation ventriculaire primitive sans atteinte cardiaque structurale représentent environ 5% des cas de morts subites cardiaques (Priori et al., 1997).

Le risque de récurrence à type de syncope, fibrillation ventriculaire ou arrêt cardiaque pour les patients ayant présenté un arrêt cardiaque récupéré est estimé à environ 30% dans les trois ans qui suivent. L'intérêt de la prévention est donc fondamentale en particulier la mise en place d'un défibrillateur implantable. La fibrillation ventriculaire est alors souvent désignée sous le

terme d'idiopathique parce qu'aucune cause anatomique sous-jacente n'est identifiée. Cependant, chez une partie des patients, des canalopathies d'origine génétique sont à l'origine de ces troubles du rythme, dont la survenue sera favorisée par certaines circonstances déclenchantes.

Certains des troubles du rythme héréditaires observés sont proches de ceux décrits lors de maladies cardiaques comme l'insuffisance cardiaque. Ainsi, l'arythmie à l'origine de la MS chez les patients en insuffisance cardiaque est souvent une tachycardie ventriculaire polymorphe (TVP) qui va dégénérer en fibrillation ventriculaire aboutissant au décès du patient. Cette TVP est à rapprocher des troubles ventriculaires rencontrés dans le syndrome du QT long avec une augmentation de la durée du PA.

La compréhension des bases génétiques de la survenue des troubles du rythme reste encore à élucider dans certains cas. Elle permettra de progresser dans le diagnostic génétique des pathologies héréditaires mais elle représente plus largement un intérêt majeur pour mieux comprendre les arythmies, primitives et secondaires, et améliorer leur prise en charge.

2. Les troubles du rythme cardiaque

Les troubles du rythme cardiaque sont visibles par des anomalies du tracé ECG.

On distingue classiquement, en fonction du point de départ de l'arythmie, les arythmies d'origine supraventriculaire et les arythmies d'origine ventriculaire. Lorsque les troubles du rythme sont d'origine supraventriculaire, le retentissement hémodynamique est souvent moins sévère. Sur le tracé électrocardiographique, les complexes ventriculaires, sauf exception, sont fins car ils se transmettent normalement aux ventricules par le faisceau de His. Par opposition, les arythmies ventriculaires peuvent engager le pronostic à court terme du patient et être à l'origine du décès du patient par mort subite (Figure 25). Sur l'ECG, les complexes ventriculaires sont déformés et élargis car l'impulsion provient d'un foyer ectopique ventriculaire et se propage de manière lente et anarchique dans les ventricules.

Les extrasystoles sont les anomalies rythmiques les plus fréquentes. Elles correspondent à une contraction cardiaque prématurée. Les extrasystoles ventriculaires sont généralement bénignes mais lorsqu'elles sont fréquentes, en salves, prématurées, et polymorphes, elles peuvent faire craindre une évolution vers des troubles du rythme ventriculaire graves à type de tachycardie ventriculaire (TV) voire de fibrillation ventriculaire (FV).

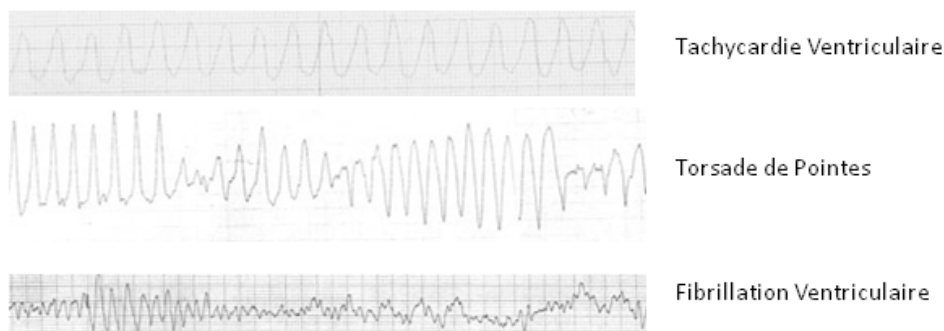
La tachycardie ventriculaire se manifeste souvent par une syncope. Si elle se prolonge, le

pronostic vital du patient est engagé et le décès peut survenir par l'installation d'un état de choc hémodynamique ou par le passage de la TV en FV. Le caractère polymorphe de la TV constitue un facteur de mauvais pronostic car la TV peut à tout moment dégénérer en FV.

La torsade de pointes est une variante de TV qui se traduit par un aspect électrocardiographique particulier avec des complexes ventriculaires élargis déformés et rapides, dessinant des fuseaux, avec leur sommet pointu tantôt dirigé vers haut, tantôt vers le bas. Il s'agit habituellement d'épisodes brefs mais s'ils se prolongent, la torsade de pointes peut entraîner des syncopes voire dégénérer en FV.

La fibrillation ventriculaire se caractérise par une dissociation électromécanique de l'activité cardiaque, les fibres cardiaques se contractant de manière anarchique avec une perte de synchronisme, retirant toute efficacité mécanique à l'activité des ventricules, se manifestant par un arrêt circulatoire conduisant à la mort subite du patient en l'absence de réanimation.

Figure 25. Aspects des arythmies ventriculaires sévères.



3. Les mécanismes des arythmies

Toute modification fonctionnelle ou structurale d'un ou plusieurs événement(s) participant à la genèse et/ou la propagation de l'excitation cardiaque peut conduire à l'émergence d'un trouble du rythme cardiaque. Les mécanismes à l'origine des arythmies sont groupés en plusieurs catégories, nous présenterons brièvement les ré-entrées et les activités déclenchées par les post-dépolarisations tardives ou précoces.

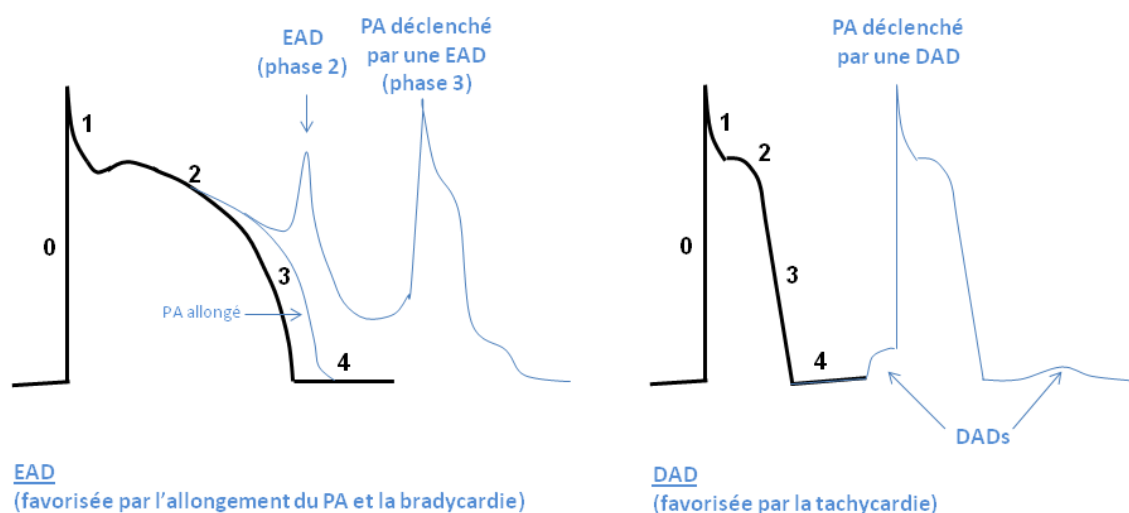
Le mécanisme de ré-entrée est très fréquemment en cause. Il correspond à une ré-excitation par l'impulsion électrique d'une région qui a été activée auparavant. Grossièrement, le front d'excitation suit un trajet circulaire en boucle fermée et se déplace en tournant à grande vitesse dans cette boucle et en envoyant vers le myocarde une impulsion à chaque tour de boucle. Les troubles du rythme par ré-entrée sont à début et fin brusque, et de déclenchement

spontané.

Les activités déclenchées sont liées à la présence de post-dépolarisations qui sont des oscillations du potentiel membranaire au-delà de la phase de dépolarisation de la cellule (phase 0 du PA). Leur présence nécessite toujours une dépolarisation cellulaire préalable. On distingue deux types de dépolarisation : les post-dépolarisations tardives (delayed afterdepolarization, DADs) et les post-dépolarisations précoces (early afterdepolarization, EADs, Figure 26).

Les EADs surviennent avant la fin de la repolarisation, à la fin du plateau (phase 2) ou en phase 3 et surviennent préférentiellement à une fréquence cardiaque basse. Les EADs sont portées soit par une baisse des courants potassiques sortants ou une stimulation des courants sodiques ou calciques entrants. Si l'amplitude de la post-dépolarisation est suffisante, elle génère un nouveau PA alors même que la repolarisation de la cellule cardiaque n'est pas terminée. Les EADs sont favorisées par l'allongement du PA et une fréquence cardiaque basse. La dispersion transmurale de la repolarisation de la paroi myocardique et le développement d'EADs sont le substrat pour les torsades de pointes rencontrées dans le syndrome du QT long (LQTS). L'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque prédisposent également à l'apparition des post-dépolarisations précoces.

Figure 26. Représentation de post-dépolarisations précoce et tardive, pouvant induire un PA (Burashnikov and Antzelevitch, 2006).



De manière opposée, les DADs surviennent après la fin de la phase de repolarisation du PA. Toute condition expérimentale ou pathologique associée à une surcharge calcique peut s'accompagner de DADs (intoxication digitalique, ischémie/reperfusion, hypertrophie, insuffisance cardiaque). Cette surcharge calcique va pouvoir entraîner une libération

inadaptée de calcium par le RS et induire un courant transitoire entrant de dépolarisation. La nature du courant entrant n'est pas certaine, il s'agit le plus vraisemblablement d'un courant de nature sodique généré par l'échangeur NCX. Si l'amplitude de DAD résultant est suffisante, un PA pourra être provoqué. Les activités déclenchées par les DADs sont favorisées par une fréquence cardiaque relativement élevée et sont associées à des concentrations calciques intracellulaires hautes. Les DADs sont particulièrement sensibles à la stimulation adrénergique et leur survenue est classiquement diminuée par les agents pharmacologiques β -bloquants. Ce sont les mécanismes cellulaires considérés comme étant à l'origine des troubles du rythme observés dans la TVPC.

4. Principaux troubles du rythme ventriculaire héréditaires

➤ Le syndrome du QT long congénital (LQTS)

La prévalence de ce syndrome est estimée à 1/2000 (Bokil et al., 2010; Schimpf et al., 2009). Le syndrome du QT long est caractérisé par un allongement variable de la durée de l'intervalle QT fréquemment associé à des anomalies de l'onde T. L'intervalle QT est classiquement considéré comme prolongé lorsque le QT corrigé (QTc) supérieur à 440 millisecondes chez l'homme et 460 millisecondes chez la femme (Merri et al., 1989). Ce trouble de la repolarisation peut entraîner des torsades de pointes et une tachycardie ventriculaire, qui vont se traduire par des syncopes avec un risque élevé de mort subite.

L'allongement de l'intervalle QT et le risque de trouble du rythme sont la conséquence de dysfonctions de canaux ioniques avec un prolongement de la repolarisation, principalement par une diminution du courant potassique sortant à composante lente I_{Ks} ou du courant potassique sortant à composante rapide I_{Kr} ou par l'augmentation du courant sodique entrant I_{Na} .

Deux formes de LQTS sont classiquement décrites : le syndrome de Romano-Ward, de transmission autosomique dominante, représentant plus de 90% des cas, et le syndrome de Jerwell-Lange-Nielsen, très rare, de transmission autosomique récessive et associé à une surdité. En 2010, 13 gènes avaient été impliqués dans cette pathologie, définissant autant de syndromes (LQT1 à 13). La majorité de ces gènes codent pour des sous-unités des canaux ioniques participant au PA (Tableau 3, (Bokil et al., 2010; Lehnart et al., 2007; Yang et al., 2010)). Des mutations sont identifiées dans environ 60 à 70% des patients porteurs d'un LQTS. Plus de 300 mutations sur l'ensemble de ces gènes ont été décrites et environ 80%

d'entre elles concernent les gènes *KCNQ1* (LQT1), *HERG* (LQT2) et *SCN5A* (LQT3). Une partie des individus porteurs de mutations (10 à 36%) peuvent avoir un intervalle QT dans les limites de la normale, et présenter un risque de troubles du rythme. Des cas de digénismes sont rapportés dans environ 10% des cas (Tester et al., 2005).

Les mutations identifiées entraînent le plus souvent la perte de fonction des canaux potassiques qui se traduit par une diminution du courant de repolarisation (LQT1, 2, 5, 6, 7, 11 et 13). Pour le LQT3, les mutations du gène *SCN5A* entraînent un gain de fonction du canal sodique responsable du courant de dépolarisation. Le même mécanisme moléculaire serait à l'origine des LQT9, 10 et 12. Enfin, certains gènes comme *ANK2*, *CAV3*, *AKAP9* ou *SNTA1* ne codent pas pour des sous-unités de canaux ioniques. Des mutations de ces gènes entraînent des anomalies des canaux par des mécanismes qui ne sont pas toujours bien compris.

Tableau 3. Caractéristiques génétiques du syndrome du QT long congénital (d'après (Bokil et al., 2010; Lehnart et al., 2007).

Syndrome	Gene	Protéine (ou sous-unité)	Effet fonctionnel	Fréquence (%)
LQTS1 (RWS, JLNS)	<i>KCNQ1</i>	K _v 7.1α	↓ I _{Ks}	30-35
LQTS2 (RWS)	<i>KCNH2</i>	K _v 11.1α	↓ I _{Kr}	25-30
LQTS3 (RWS, BrS)	<i>SCN5A</i>	Na _v 1.5α	↑ I _{Na}	5-10
LQTS4 (atypique)	<i>ANK2</i>	Ankyrin B	↓ I _{Na+K} ↑ I _{NCX}	1-2
LQTS5 (RWS, JLNS)	<i>KCNE1</i>	minKβ	↓ I _{Ks}	1
LQTS6 (RWS)	<i>KCNE2</i>	MIRP1β	↓ I _{Kr}	rare
LQTS7 (Andersen Sd)	<i>KCNJ2</i>	Kir2.1α	↓ I _{K1}	rare
LQTS8 (Timothy Sd)	<i>CACNA1C</i>	Cav1.2α1c	↑ I _{CaL}	rare
LQTS9 *	<i>CAV3</i>	Cavéoline 3	↑ I _{Na}	rare
LQTS10 (RWS)	<i>SCN4B</i>	Na _v 1.5β4	↑ I _{Na}	rare
LQTS11	<i>AKAP9</i>	Yotiao	↓ I _{Ks}	rare
LQTS12	<i>SNTA1</i>	SNTA1	↑ I _{Na}	rare
LQTS13	<i>KCNJ5</i>	Kir3.4	↓ I _K *	rare

RWS : Syndrome de Romano-Ward / JLNS : Syndrome de Jervell et Lange-Nielsen, Andersen Sd : syndrome d'Andersen (paralysie périodique, LQTS, dysmorphie) / Timothy Sd : syndrome de Timothy (atteinte multisystémique avec LQTS) / LQTS4 ou Ankyrin B syndrome : autres signes possibles tels que bradycardie, troubles de conduction, FV idiopathique / *CAV3* est impliqué également dans des CMH, CMD et des atteintes musculaires squelettiques (cavéolinopathies) / BrS : syndrome de Brugada (mutations différentes). Les gènes impliqués dans les morts inattendues du nourrisson ne sont pas précisés. * Expérience réalisée dans cellules HEK-293 avec coexpression de Kir3.1 et 3.4.

La description de caractères phénotypiques variables en fonction du génotype permet l'orientation diagnostique, voire pronostique et thérapeutique de ce syndrome.

Le traitement de ces syndromes repose sur les β-bloquants pour réduire la stimulation adrénergique, très efficaces dans la majorité des cas, la dénervation cardiaque sympathique

gauche et l'implantation d'un défibrillateur. La stratification du risque arythmique repose sur l'âge, le sexe, l'anamnèse et la durée de l'intervalle QT (Priori et al., 2003). La réponse au traitement β -bloquants est significativement influencée par le génotype. Le génotype pourrait être un argument pour un traitement plus agressif comme l'implantation d'un défibrillateur. Il faut aussi proscrire tout traitement médicamenteux pouvant allonger l'espace QT et une liste de médicaments contre-indiqués doit être remise au patient.

➤ Le syndrome du QT court

Le syndrome du QT court (SQTS) est une pathologie rare, décrite en 2000, et définie par un QTc inférieur à 300 millisecondes (Gussak et al., 2000; Thomas et al., 2006). Sur le plan clinique, on retrouve souvent une histoire familiale de mort subite, avec parfois des morts subites du nourrisson, et la présence d'évènements rythmiques survenant surtout à l'effort, tels que des palpitations, des malaises ou syncopes. Trois gènes ont été associés à ce syndrome : les gènes *HERG* (SQTS1), *KCNQ1* (SQTS2) et *KCNJ2* (SQTS3) codant pour des sous-unités de canaux potassiques déjà impliqués dans le QT long congénital. Dans le SQTS, les mutations entraîneraient, à l'inverse de ce qui est observé pour le LQTS, un gain de fonction de ces canaux et donc un raccourcissement de la repolarisation. Le traitement de ce syndrome n'est pas encore établi. La prise en charge des patients est basée sur la mise en place d'un défibrillateur implantable. Seule la quinidine, grâce à ses propriétés inhibitrices du courant I_{to} (principal courant de repolarisation pendant le plateau du PA), serait capable de normaliser l'espace QT et de réduire la survenue d'arythmies mais cette notion doit être confirmée (Crotti et al., 2010).

➤ Le syndrome de Brugada

Décrit pour la première fois en 1992, le syndrome de Brugada est caractérisé par une élévation du segment ST dans les dérivations précordiales droites à l'électrocardiogramme, associée à un risque élevé de mort subite par tachycardie ventriculaire, fibrillation ventriculaire (Brugada and Brugada, 1992; Thomas et al., 2006). Ce syndrome serait responsable de plus de 20% des morts subites sans cardiopathie sous-jacente. La prévalence varie selon l'origine géographique, avec une prédominance de la maladie en Asie où elle est évaluée à 1 / 1000. La maladie est plus fréquente chez les hommes que chez les femmes (sexe ratio 8:1). L'âge moyen de survenue des symptômes est de 41 +/- 15 ans, les symptômes survenant le plus souvent dans un contexte de repos. Les manifestations électrocardiographiques sont souvent intermittentes et peuvent être révélées par des bloqueurs sodiques (test de provocation à l'ajmaline ou flécaïnide), mais aussi par un état fébrile,

l'alcool, ou divers agents pharmacologique, les β -bloquants, les agonistes α -adrénergiques... Un gène principal a été lié au syndrome de Brugada, le gène *SCN5A* qui code pour la sous-unité α du canal sodique cardiaque. Des mutations sont retrouvées dans 18 à 30% des cas seulement. Contrairement à ce qui est observé dans le SQT, ces mutations entraînent une perte de fonction du canal sodique. Sur le plan du traitement, l'efficacité de la quinidine ou l'hydroquinidine est en cours de validation. Le seul traitement ayant fait ces preuves est la mise en place d'un défibrillateur implantable. Cependant, l'une des difficultés majeures lors de la prise de décision thérapeutique reste l'identification des sujets à haut risque qui devraient bénéficier d'un défibrillateur.

➤ La Tachycardie Ventriculaire Polymorphe Catécholaminergique

Cette maladie est le sujet de cette thèse et est traité dans le chapitre qui suit.

VII. La Tachycardie Ventriculaire Polymorphe Catécholaminergique

La tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique (TVPC) est une pathologie héréditaire du rythme cardiaque responsable de forme familiale de morts subites chez l'enfant et l'adulte jeune. Les arythmies se traduisent par des syncopes récurrentes survenant dans un contexte émotionnel ou lors d'un effort, sur un cœur structurellement sain et sans anomalie décelable à l'ECG de repos (l'intervalle QT notamment est normal). Il s'agit d'une maladie rare dont la prévalence exacte est inconnue mais estimée à 1 /10 000 (Liu et al., 2008a).

La première publication date de 1975 où Reid et *al.* ont décrit une tachycardie ventriculaire bidirectionnelle déclenchée par l'effort et le stress chez une enfant de 6 ans, compliquée par un arrêt cardiaque récupéré (Reid et al., 1975). Le bilan réalisé n'avait pas permis de mettre en évidence d'anomalie structurale cardiaque sous-jacente. En 1978 puis en 1995, Coumel et *al.*, puis Leenhardt et *al.* ont ensuite rapporté une série de cas familiaux et sporadiques et introduit le terme de tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique (Coumel et al., 1978; Leenhardt et al., 1995).

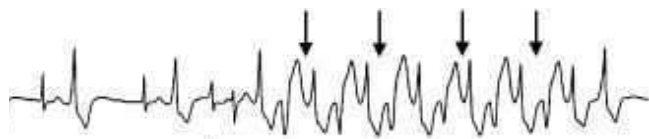
1. Aspects cliniques

La pathologie se manifeste par des syncopes récurrentes, des convulsions voire un arrêt cardiaque déclenché par l'exercice physique ou un stress chez le grand enfant ou l'adulte jeune. Dans certains cas, les patients pourront rapporter des symptômes mineurs comme des palpitations, des vertiges ou des malaises dans un contexte évocateur d'effort (particulièrement à la piscine), ou de stress. Les premiers signes surviennent habituellement pendant l'enfance ou l'adolescence. L'âge moyen de survenue des symptômes est de 8 +/- 4 ans. Environ un tiers des patients vont présenter des symptômes avant l'âge de 10 ans et 60% un épisode de syncope avant l'âge de 40 ans (Ackerman et al., 2011). Environ un tiers des patients présentent une histoire familiale de syncopes dans un cadre émotionnel ou lors d'un effort, de convulsions ou de morts subites. L'ECG de repos est souvent normal et la TVPC peut rester non diagnostiquée si une épreuve d'effort ou un enregistrement Holter du rythme

cardiaque n'est pas réalisé. Le diagnostic est souvent établi avec un délai d'environ deux ans après la survenue de la première syncope car les symptômes sont souvent attribués à une origine vaso-vagale ou à une cause neurologique, les convulsions pouvant en particulier orienter le diagnostic à tort vers une épilepsie. D'après les données de l'équipe de Priori, environ $\frac{3}{4}$ des patients viennent en consultation pour un bilan de syncope ou de signes évocateurs d'arythmies, et un quart après un arrêt cardiaque survenu dans un contexte de stress adrénérgique (Liu et al., 2008a). Deux tiers des morts subites correspondaient aux premières manifestations de la maladie.

L'électrocardiogramme de repos ne montre habituellement pas d'anomalie. L'intervalle QT est normal, aucun trouble de la conduction n'est noté et le segment ST est normal (George et al., 2007). L'imagerie cardiaque est normale. Une bradycardie sinusale et des ondes U proéminentes peuvent cependant être observées. Les tachycardies ventriculaires observées à l'effort sont typiques de la TVPC lorsqu'elles sont bidirectionnelles, caractérisées par une rotation de l'axe de 180° de la morphologie QRS un battement sur deux (Figure 27). Cet aspect est retrouvé dans environ un tiers des cas (Liu et al., 2008a). Les aspects moins typiques montrent une tachycardie ventriculaire polymorphe voire une fibrillation ventriculaire. L'autre caractéristique importante qui peut aider au diagnostic est l'aggravation progressive de l'arythmie avec l'augmentation de l'intensité de l'effort. Les arythmies ventriculaires apparaissent généralement lorsque la fréquence cardiaque atteint 120 battements par minute : des extrasystoles ventriculaires apparaissent d'abord isolées et monomorphes, puis au fur et à mesure que le rythme cardiaque s'accélère, les extrasystoles sont en salves et polymorphes, parfois bidirectionnelles. L'arythmie est très reproductible (lors de l'épreuve d'effort ou lors de la perfusion de petites doses d'isoprotérénol), notamment le seuil d'apparition des ESV, et peut dégénérer à tout moment en TV et en fibrillation ventriculaire. Quand l'effort est arrêté, les arythmies disparaissent progressivement.

Figure 27. Tracé de tachycardie ventriculaire bidirectionnelle (Mok et al., 2006).



Environ $\frac{3}{4}$ des patients présentent également des arythmies supraventriculaires qui surviennent à des fréquences cardiaques inférieures à celles des arythmies ventriculaires (Liu et al., 2008a).

La prise en charge est basée sur un traitement médical, associé à des mesures de contre-indications sportives. Le traitement repose sur les β -bloquants puissants d'action retardé comme le nadolol, la dose étant adaptée jusqu'à permettre une efficacité anti-arythmique. Récemment, l'efficacité d'un analogue du carvedilol (VK-II-86), étudiée sur un modèle murin de TVPC, a fourni des résultats prometteurs (Zhou et al., 2011). Le flécaïnide, inhibe directement RyR2 et semble être une approche prometteuse chez les patients pour lesquels les β -bloquants ne permettent pas une suppression complète des arythmies (Watanabe et al., 2009). La mise en place d'un défibrillateur implantable ou la dénervation sympathique cardiaque gauche peuvent être envisagées dans certaines circonstances (Wilde et al., 2008). Il est à noter que l'administration concomitante du vérapamil, un inhibiteur calcique et des β -bloquants semble efficace mais les données restent à être démontrées de manière plus établie. Le pronostic de la TVPC en l'absence de traitement est péjoratif, la mortalité atteignant 50% avant 40 ans. L'absence de traitement β -bloquants, le jeune âge au moment du diagnostic constituent des facteurs de risque de survenue de troubles du rythme et l'antécédent d'arrêt cardiaque, un facteur de risque de récurrence et de mort subite (Hayashi et al., 2009a). L'épreuve d'effort fournit un outil intéressant pour la surveillance de l'efficacité des β -bloquants mais sa sensibilité et sa spécificité sont toutefois relativement basse pour prédire un risque de survenue de trouble du rythme. La survenue de troubles du rythme grave n'est pas différente entre les probands porteurs de mutations ou non, et les probands et les apparentés (Hayashi et al., 2009a).

Le bilan familial comprend une exploration de tous les apparentés du premier degré avec un ECG, un enregistrement Holter et une épreuve d'effort. Une échographie peut être utile dans les cas où le diagnostic est incertain. Dans le cadre d'un bilan clinique (épreuve d'effort incluse) normal, le traitement préventif par β -bloquants des individus porteurs de mutation semble bénéfique. Pour cette raison, la recherche de la mutation familiale est indiquée chez les apparentés afin de dépister les porteurs silencieux de la mutation.

2. Physiopathologie

Dans la TVPC, les dysfonctions du CRC seraient à l'origine de libérations inadéquates de calcium du RS, en l'absence de dépolarisation cellulaire. Ces libérations de calcium pourraient altérer le potentiel membranaire et être responsables d'arythmies.

Il est connu depuis longtemps que la libération de calcium du RS peut survenir en l'absence

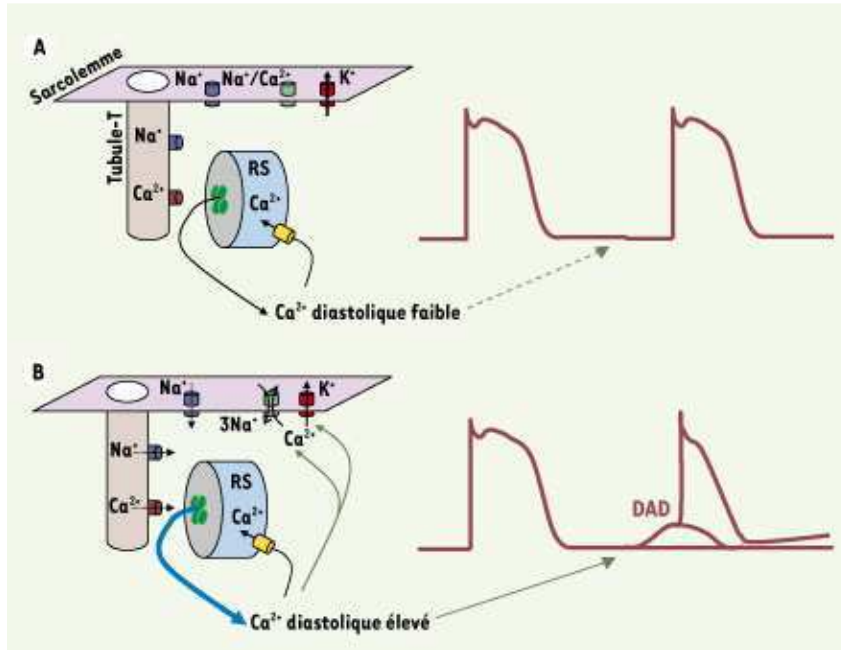
de dépolarisation cellulaire par un mécanisme désigné sous le terme de libération spontanée de calcium (Priori and Chen, 2011). Ce phénomène, favorisé par la surcharge en Ca^{2+} du RS, est alors nommé libération de calcium induite par une surcharge du stock calcique (SOICR, Store Overload Induced Ca^{2+} Release).

La stimulation β -adrénergique va favoriser la surcharge calcique du RS et le SOICR. La production d'AMPc va déclencher la phosphorylation par la PKA de partenaires du couplage excitation-contraction : le DHPR, RyR2, l'inhibiteur de la PP1 et le phospholambane. Ce jeu de phosphorylation aboutit à une augmentation de l'amplitude et de la rapidité de la contraction des cardiomyocytes. Une augmentation de la stimulation adrénergique va favoriser la surcharge calcique cytosolique par une augmentation de l'entrée de calcium par le DHPR, et du RS par une augmentation de l'activité de la SERCA consécutive à la levée de l'inhibition du phospholambane phosphorylé. La surcharge du RS en ions Ca^{2+} va activer la libération de calcium par le RyR en l'absence de dépolarisation cellulaire (SOICR) et entraîner une augmentation de la concentration de calcium cytosolique qui pourra activer l'échangeur membranaire $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) générant un courant transitoire entrant. Ce courant entrant est susceptible de dépolariser la surface de la membrane cellulaire après la fin du potentiel d'action, produisant une post-dépolarisation tardive ou DAD. Lorsque les DADs atteignent le seuil d'activation du canal sodique, ils peuvent déclencher un PA. L'impulsion anormale résultante peut produire une activité arythmique déclenchée, si l'onde de dépolarisation se propage aux cellules voisines donnant naissance à une extrasystole, voire une arythmie.

Il est estimé que la libération de calcium du RS doit représenter 50 à 60 $\mu\text{mol/L}$ de cytosol, soit 50 à 70% de la charge du RS, pour produire un DAD d'une amplitude suffisante pour déclencher un PA. L'augmentation de l'amplitude des DADs va être favorisée par l'augmentation de la fréquence cardiaque et de la charge intracellulaire calcique.

Les DADs constituent le mécanisme électrophysiologique admis à l'origine de la TVPC (Figure 28). Les mutations de RyR2 ou Casq2 associées à la TVPC favoriseraient le SOICR et les DADs selon plusieurs mécanismes : ces mutations pourraient par exemple être responsables d'un abaissement du seuil de déclenchement du SOICR ou d'une augmentation du Ca^{2+} libre lors de l'augmentation du rythme cardiaque.

Figure 28. Mécanisme de survenue des DADs dans la TVPC (d'après (Lacampagne et al., 2008).



En situation normale (A), l'activité des RyR2 en diastole est au repos. Le potentiel de repos diastolique est essentiellement contrôlé et maintenu à une valeur de l'ordre de -80 mV par l'activité des canaux potassiques à rectification entrante (I_{K1}). En cas d'anomalie de fonctionnement des RyR2 (B), on observe des libérations inadaptées de calcium du RS pendant la diastole (canal « fuyant » en diastole) conduisant à une surcharge calcique cytosolique. L'augmentation du contenu calcique cytosolique peut activer le courant entrant dépolarisant de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et inhiber le courant I_{K1} . Cela se traduit par une dépolarisation membranaire spontanée (DAD) pouvant atteindre le seuil d'excitation des canaux sodiques, et déclencher d'un PA.

Pour rappel, la libération élémentaire de calcium à partir d'un CRC est désignée sous le terme d'étincelles calciques ou sparks (Cheng and Lederer, 2008). Le lien entre les étincelles calciques et la libération de calcium du RS est complexe et reste encore à éclaircir (Cheng and Lederer, 2008). Il ne sera pas détaillé ici. En physiopathologie, différentes caractéristiques des étincelles calciques comme leur fréquence ou leur amplitude peuvent varier (Fernandez-Velasco et al., 2011). Il semble probable que des étincelles calciques spontanées interviennent individuellement en physiopathologie mais ces libérations de Ca^{2+} sont probablement insuffisantes en tant que telles pour aboutir à un DAD et un PA, le SOICR étant considéré comme la source principale de libération de calcium du RS capable de produire des arythmies sur des DADs.

3. Bases Génétiques

En 1999, un locus lié à une forme dominante de CPVT est identifié en 1q42-43 (Swan et al., 1999). Deux ans plus tard, deux équipes publient simultanément l'implication du gène *RYR2* associé à une transmission autosomique dominante de la maladie (Laitinen et al., 2001; Priori et al., 2001). La même année, une forme autosomique récessive de TVPC est publiée associée au gène *CASQ2*, également situé sur le chromosome 1 en 1p13.3-p11 (Tableau 4, (Lahat et al., 2001)).

Tableau 4. Caractéristiques génétiques de la TVPC.

	Gene	Protéine (ou sous-unité)	Effet fonctionnel	Fréquence (%)
CPVT1	<i>RYR2</i>	RyR2	↑ Ca ²⁺	60
CPVT2	<i>CASQ2</i>	Casq2	↑ Ca ²⁺	3-5
“Phénocopie”	<i>KCNJ2</i>	Kir2.1α	↓ I _{K1} *	rare
“Phénocopie”	<i>ANK2</i>	Ankyrin B	↓ I _{Na+K} ↑ I _{NCX} *	rare

* Mécanisme mis en évidence dans des mutations de ces gènes dans le QT long.

L'intérêt de l'analyse moléculaire est double dans la TVPC :

- elle participe principalement au diagnostic présymptomatique chez les apparentés lorsque la mutation familiale est connue
- elle a aussi parfois un rôle diagnostique chez le proband, surtout lorsque le diagnostic n'est pas certain.

Les dernières recommandations concernant l'analyse moléculaire de la TVPC préconisent l'analyse génétique des gènes *RYR2* et *CASQ2* chez tout proband pour lequel une suspicion de TVPC a été posée après un bilan clinique et paraclinique ayant compris une épreuve d'effort ou un test pharmacologique (perfusion catécholamines, (Ackerman et al., 2011)). Lorsqu'une mutation a été identifiée chez le cas index, la recherche de la mutation familiale associée à un bilan clinique et paraclinique (comprenant si possible une épreuve d'effort) est recommandée chez les apparentés du premier et du second degré. L'analyse génétique est recommandée chez les apparentés du premier degré même dans le cadre d'un bilan clinique et paraclinique négatif. L'analyse peut se faire dès la naissance. La mise en place d'un traitement préventif par β-bloquants est en effet envisageable de manière précoce chez les patients porteurs de la mutation, compte-tenu de la survenue de symptômes dès le plus jeune âge, du risque de mort subite et de l'association possible de la TVPC avec la mort subite du nourrisson (Tester et al.,

2007). En raison de la révélation possible de la TVPC par un arrêt cardiaque inaugural dans environ un tiers de cas, l'analyse du gène *RYR2* peut être envisagée dans le cadre des fibrillations ventriculaires idiopathiques mais l'identification de mutations est beaucoup plus rare.

Compte-tenu de la complexité du gène *RYR2* (105 exons), une stratégie de recherche ciblée de mutations n'explorant qu'une partie des régions codantes a été proposée. Cependant, les données actuelles rapportant des mutations à l'extérieur des domaines inclus dans cette stratégie ciblée, montrent qu'une partie des mutations peut rester non détectée.

Plus récemment, il a été proposé que des mutations de deux autres gènes soient responsables de phénotypes arythmogènes très proches de la TVPC (phénocopies) : *KCNJ2* qui code pour le canal potassique Kir2.1 et *ANK2* qui code pour l'ankyrine B, une protéine du cytosquelette. L'existence de nombreuses ectopies sur l'enregistrement Holter ainsi que l'identification d'une onde U proéminente sont en faveur de *KCNJ2* (Postma et al., 2006). Il n'y a pas d'indication d'analyse systématique de ces gènes lors de l'analyse moléculaire de la TVPC.

Un nouveau locus associé à une forme récessive sévère de TVPC a été identifié récemment en 7p14-p22 mais le gène reste à définir (Bhuiyan et al., 2007a). Des études se poursuivent dans le but d'identifier d'autres gènes. Ainsi, des mutations des gènes *NCX1*, *SERCA2a*, *PLN*, *FKBP1B* et *HRC*, codant pour des protéines impliquées dans l'homéostasie calcique cardiaque, ont été recherchées sans succès chez des patients ayant présenté une TVPC. Il est toutefois à noter que les études ont porté sur un petit nombre de patients (Marjamaa et al., 2009; Postma et al., 2002).

➤ Mutations du gène *RYR2*

Plus de 100 mutations *RYR2* ont été publiées en association avec des formes autosomiques dominantes ou des cas sporadiques de TVPC (CPVT1, <http://www.fsm.it/cardmoc/>).

Le phénotype de TVPC lié aux mutations RyR2 (CPVT1) est associé à une mortalité de 30 à 50% à 35 ans (George et al., 2007). Le risque de syncope est plus élevé chez les hommes que chez les femmes et les morts subites surviennent plus tôt chez les hommes que chez les femmes (19,2+/-10,6 vs 23,6+/-11,3).

La pénétrance de la maladie associée aux mutations RyR2 est de l'ordre de 80%. L'expression phénotypique de la maladie est cependant très hétérogène et la pénétrance apparaît varier en fonction de la mutation impliquée. Il existe quelques rares cas de double hétérozygotie publiés. Pour certains, la maladie s'exprime chez les apparentés simple hétérozygotes tandis que d'autres cas s'apparentent plus à une récessivité, les patients doubles hétérozygotes étant

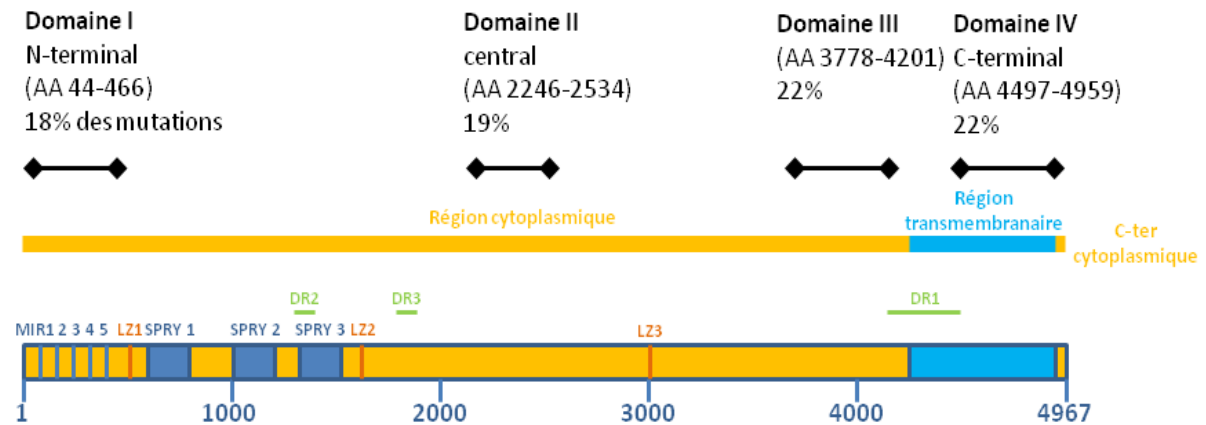
symptomatiques, et les simples hétérozygotes, asymptomatiques. Aucun cas d'homozygotie n'a été publié à ce jour dans le gène *RYR2*. Une partie des mutations dans *RyR2* sont récurrentes, qu'elles soient familiales ou survenues *de novo*. Cependant, aucune cause pouvant expliquer cette récurrence, comme l'existence d'îlots CpG, n'a été mise en évidence. Le taux de mutations *de novo* a été estimé à 19% lors d'une revue réalisée en 2007 par George et al. L'âge de survenue est en moyenne plus précoce dans les mutations *de novo* (8 +/- 4 ans) que dans les autres cas (20.2 +/- 15.7 ans), en accord avec la notion que les mutations *de novo* seraient potentiellement plus sévères et donc plus rarement transmises. Un seul cas de mosaïque asymptomatique a été rapporté (Medeiros-Domingo et al., 2009).

La majeure partie des mutations (≈90%) se répartit au niveau de 4 domaines préférentiels de la protéine, représentant un peu moins d'un tiers de la protéine : I) AA 77-466 (18% des mutations identifiées), II) AA 2246-2534 (19%), III) AA 3778-4201 (22%), IV) AA 4497-4959 (22%) (Figure 29). Ces domaines correspondent à des régions du *RyR* conservées entre isoformes et entre espèces, représentant des régions fonctionnellement importantes de la protéine. A l'exception du domaine III, ces domaines sont inclus dans les domaines de mutations préférentiels de l'isoforme musculaire squelettique *RyR1* responsables d'hyperthermie maligne ou de myopathies à cores centraux. Cependant, des études exhaustives de la région codante ont permis de montrer que des mutations existent en dehors de ces quatre domaines dans 10 à 25% des cas (Medeiros-Domingo et al., 2009; Priori and Chen, 2011). Aucune mutation de *RyR2* n'a été rapportée à ce jour dans les régions divergentes DR1, DR2 et DR3, à l'exception de la variation c.E4431K, qui n'est pas associée à un phénotype particulier. Ces régions sont riches en polymorphismes, comprenant 5 polymorphismes de *RyR2* parmi 13 répertoriés dans la base de données cardmoc (c.G1885E, c.G1886S, c.A4282V, c.R4307C et c.G4315E, <http://www.fsm.it/cardmoc/>). Il est intéressant de noter cependant que les polymorphismes c.G1885E et c.G1886S ont été identifiés à l'état hétérozygote composite chez des patients porteurs d'une cardiomyopathie ventriculaire droite arythmogène (Koop et al., 2008; Milting et al., 2006). La caractérisation fonctionnelle *in vitro* de ces deux variations associées au sein d'un tétramère entraîne une abolition quasi-complète de SOICR lors de la surcharge calcique du RS, montrant que ces polymorphismes ont un impact fonctionnel. Les variations identifiées comme polymorphismes bénins pourraient donc avoir un rôle modulateur ou un effet récessif.

Aucune mutation n'a non plus été trouvée dans région du pore (P-loop) connue pour être critique pour la fonction du canal. Une hypothèse simple serait que des mutations dans cette région à l'origine d'une perte, partielle ou totale, de la fonction du canal, seraient associées à

une létalité précoce ou à un phénotype cardiaque différent de la TVPC.

Figure 29. Répartition des mutations RyR2 sur la protéine (Hamilton and Serysheva, 2009; Priori and Chen, 2011).



Les traits noirs représentent les domaines I, II, III et IV de mutations sur RyR2. Les chiffres en bleu correspondent à la numérotation en acides aminés (AA) de RyR2. Régions divergentes DR1 (AA 4209-4560), DR2 (1353-1397), DR3 (1852-1890) ; Motifs Leucine-zipper LZ1 (565-594), LZ2 (1604-1632), LZ3 (3004-3035), MIR 1 (110-165), 2 (172-217), 3 (225-280), 4 (286-343), 5 (351-408) ; SPRY 1 (599-809), 2 (1025-1222), 3 (1337-1562).

La très grande majorité des mutations identifiées dans *RYR2* sont des mutations faux-sens. Par opposition, si les gènes des autres canaux impliqués dans les troubles du rythme cardiaque ou le gène *RYR1* présentent fréquemment des mutations faux-sens, ils comportent également des mutations non-sens, des insertions ou délétions entraînant un décalage du cadre de lecture. Il a été évoqué que des mutations tronquantes avec une « perte » de fonction du canal RyR2 pourraient exister mais être impliquées dans d'autres pathologies que la TVPC. De rares duplications ou insertions de petite taille n'entraînant pas de décalage du cadre de lecture ont été identifiées dans le cadre de TVPC laissant supposer que leur effet serait similaire à celui des mutations faux-sens délétères. Plus récemment, de larges délétions génomiques comprenant l'exon 3 mais conservant le cadre de lecture ont été rapportées (Bhuiyan et al., 2007b; Marjamaa et al., 2009; Marjamaa et al., 2011). La richesse en séquences répétées *Alu* de la région pourrait favoriser les réarrangements génomiques de grande taille. Le phénotype, incluant des troubles de la conduction et une cardiomyopathie dilatée, semble peut-être différent de celui rapporté lors des mutations faux-sens.

En dehors de la TVPC où *RYR2* apparaît être le gène majeur associé à la pathologie, des mutations de ce gène sont rapportées dans d'autres pathologies arythmogènes dont la plus étudiée est la dysplasie ventriculaire droite arythmogène (Tiso et al., 2001). Une mutation a également été rapportée dans une cardiomyopathie hypertrophique (Lorenzon and Beam,

2008). Des mutations du gène *RYR2* ont aussi été décrites dans des formes de QT long « atypiques », où il peut être intéressant d'analyser le gène *RYR2* en seconde intention (syncopes d'effort et QTc<480ms, (Medeiros-Domingo et al., 2009). Il semble enfin que ce gène puisse également être impliqué dans la mort subite du nourrisson (Tester et al., 2007). Enfin, des travaux recherchent des haplotypes à risque de troubles du rythme, constitués d'une association de polymorphismes du gène *RYR2*, qui permettraient d'identifier ou d'écarter, selon l'haplotype des individus, le risque de fibrillation ventriculaire post-infarctus, par exemple (Ran et al., 2010). Plus récemment, l'implication de *RYR2* dans l'épilepsie a été évoquée (Johnson et al., 2010; Lehnart et al., 2008; Nagrani et al., 2011).

Aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre les domaines mutés de RyR2 et la sévérité de la TVPC. La mise en évidence d'une corrélation phénotype-génotype pourrait aider dans le choix de thérapeutiques invasives ou non (mise en place d'un défibrillateur implantable par exemple).

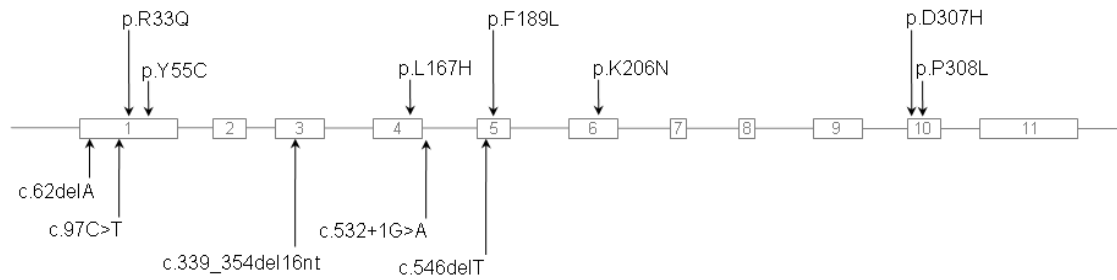
➤ Mutations du gène *CASQ2*

Les mutations du gène *CASQ2* sont identifiées beaucoup plus rarement que les mutations du gène *RYR2* avec moins de 20 mutations publiées à ce jour. Il existe un site internet regroupant les mutations Casq2 publiées (<http://www.fsm.it/cardmoc/>). La majorité des TVPC associées à des mutations Casq2 suivent un mode de transmission autosomique récessive avec des mutations homozygotes, ou des cas de double hétérozygotie. Cependant, certaines formes familiales font évoquer soit la possibilité de transmission autosomique dominante, soit celle de forme modérée associée à une seule mutation hétérozygote (de la Fuente et al., 2008; Kirchhefer et al., 2010; Postma et al., 2002).

Au niveau clinique, la publication initiale rapporte un phénotype sévère avec un âge précoce de survenu (7 +/- 4 ans), une pénétrance complète avant 10 ans et une mortalité élevée en l'absence de traitement (Lahat et al., 2001).

Les mutations publiées sont réparties sur l'ensemble du gène comprenant des mutations faux-sens, des non-sens, des microdélétions et des mutations sur les sites consensus d'épissage. Une mutation *de novo* a été rapportée (Figure 30). Aucune mutation n'est rapportée dans la séquence du peptide signal (AA 1-19), ni dans la queue C-terminale de la protéine (AA 371-399).

Figure 30. Mutations du gène CASQ2 publiées (<http://www.fsm.it/cardmoc/>)



Le gène est représenté de manière schématique avec les exons représentés par les rectangles et le numéro de l'exon figuré dans le rectangle. Les mutations faux-sens sont indiquées au-dessus des exons en indiquant le changement en acides aminés selon un code à 1 lettre. Les mutations de type non-sens, délétions, altération de l'épissage sont marquées en-dessous des exons, en indiquant le changement en nucléotides sur le cDNA.

La numérotation nucléotidique utilisée correspond à la numérotation sur le cDNA avec le nucléotide +1 correspondant au A du codon ATG initiateur de la traduction dans la séquence de référence (NM_0001232.3). Pour désigner des variations introniques dans la séquence intronique flanquante en amont d'un exon, la numérotation intronique est indiquée de manière négative, et située en référence par rapport au premier nucléotide de l'exon le plus proche. Pour désigner des variations introniques dans la séquence intronique flanquante en aval d'un exon, la numérotation intronique est indiquée de manière positive, et située en référence par rapport au dernier nucléotide de l'exon le plus proche. La numérotation protéique commence avec le premier acide aminé au niveau de la méthionine, premier codon traduit.

4. Bases moléculaires de la TVPC

➤ Hypothèses physiopathologiques associées aux mutations de RyR2

Trois mécanismes principaux ont été particulièrement étudiés.

- a) Une diminution du seuil d'activation du canal par le calcium luminal +/- cytoplasmique

Les travaux de Jiang et al. (2004, 2005) ont analysé l'impact d'une dizaine de mutations de RyR2 sur la sensibilité du canal au calcium sur ses versants luminal et cytosolique (Jiang et al., 2005; Jiang et al., 2004). Les mutations considérées sont réparties sur différents domaines de mutations : R176Q (T2504M), L433P, S2246L, R2474S, Q4201R, N4104K, R4496C, I4867M, et N4895D. L'ensemble des mutations étudiées montre une augmentation de la réponse du canal lors de son activation par le Ca²⁺ luminal. La réponse au calcium cytosolique est en revanche peu modifiée à l'exception des mutations N4104K, R4496C et V4653F, toutes les trois situées dans la partie C-terminale de la protéine. L'expression ectopique de canaux RyR2 mutés dans des cellules HEK-293 montre que ces mutations induisent une diminution du seuil de Ca²⁺ intraluminal, responsable de la libération de calcium du RS. Des résultats concordants sont observés à partir d'expériences effectuées sur des cardiomyocytes de souris knock-in reproduisant les mutations R176Q, R2474S et R4496C. Le déclenchement de SOICR dans des cellules HEK-293 et dans des cardiomyocytes suggère que la sensibilité au

calcium luminal du RyR peut être indépendante de Casq2, qui n'est pas exprimée les cellules HEK-293 (Priori and Chen, 2011).

Il est à noter que l'altération de la sensibilité du canal au calcium liée aux mutations RyR2 n'entraîne pas d'anomalies en conditions basales. Les anomalies observées sont provoquées lors de stimulation adrénérgique où l'augmentation du rythme et de la contractilité entraîne une surcharge du RS en Ca^{2+} et le déclenchement de libérations de calcium aberrantes proarythmogènes.

b) Une altération de l'interaction RyR2-FKBP12.6

Une autre hypothèse est que les mutations de RyR2 altèrent l'interaction du canal avec ses partenaires protéiques. L'interaction du canal avec la protéine FKBP12.6 a été en particulier très étudiée. Pour rappel, FKBP12.6 se lie au canal RyR2 et stabilise le canal en position fermée pendant la diastole, prévenant la libération inadaptée de calcium par le canal. A l'effort, FKBP12.6 se dissocie partiellement du récepteur entraînant une augmentation de la libération de calcium et de la contractilité. Wehrens et *al.* se sont posés la question de savoir si les mutations de RyR2 entraînaient une diminution de l'affinité de liaison de FKBP12.6 sur le canal, qui favoriserait la libération inadaptée de calcium du RS (Wehrens et al., 2003). Ils ont en effet pu mettre en évidence une diminution de l'affinité de liaison par diverses approches pour différentes mutations étudiées situées dans les domaines de mutations II, III et IV (S2246L, P2328S, Q4201R, R4496C, V4653F, (Priori and Chen, 2011; Wehrens et al., 2003). Cependant des données contradictoires ont été obtenues par d'autres équipes pour les mutations R2474S et R4496C (Tiso et al., 2002).

Actuellement, il semble admis que si ce mécanisme peut être retrouvé pour certaines mutations, ce n'est probablement pas le seul mécanisme associé aux mutations de RyR2.

c) Des interactions intramoléculaires défectueuses entraînant une déstabilisation de RyR2 Ikemoto et Yamamoto (2000) ont proposé que le domaine N-terminal et le domaine central de la protéine interagissent entre eux et interviennent dans la stabilisation du canal à l'état fermé (Ikemoto and Yamamoto, 2000). Les mutations de RyR2 au niveau de ces deux régions clés sont nombreuses et pourraient déstabiliser la configuration fermée du canal, rendant le canal plus sensible aux stimuli calciques. Ce mécanisme est désigné en anglais sous le terme « domain unzipping » (Uchinoumi et al., 2010).

L'impact des mutations sur la conformation du canal se pose plus largement. La résolution récente en cristallographie de la séquence N-terminale de RyR2 (AA 1-217) et l'étude des deux mutations ponctuelles A77V et V186M montrent que ces deux mutations sont situées en

surface des domaines et pourraient donc perturber les interactions interdomaines. L'étude structurale de la séquence N-terminale délétée de la séquence correspondant à l'exon 3 de RyR2 montre que cette délétion induit des modifications importantes de la stabilité de cette partie protéique (Lobo and Van Petegem, 2009).

➤ Hypothèses physiopathologiques associées aux mutations de Casq2

Les mutations de Casq2 semblent être associées à une diminution du pouvoir tampon du Ca^{2+} dans le RS et à des anomalies d'interactions protéiques au sein du CRC. Ceci favoriserait la survenue de SOICR par plusieurs mécanismes possibles :

- la surcharge en ions Ca^{2+} libre du RS
- une instabilité structurale du CRC
- des anomalies de régulation de RyR2 qui pourrait présenter une sensibilité plus importante au calcium intraluminal.

L'implication de la protéine Casq2 dans la physiopathologie de la TVPC a été étudiée à l'aide de modèles de souris knock-in porteuses de mutations identifiées chez l'homme en association avec une TVPC ou par l'analyse des propriétés de protéines mutées dans des modèles cellulaires ou *in vitro* (Rizzi et al., 2008; Song et al., 2007). Initialement, la première mutation identifiée était une mutation faux-sens en position 307 affectant un acide aminé du troisième domaine thioredoxine-like, D307H. Deux autres mutations faux-sens, R33Q et L167H, ont été identifiées assez rapidement et l'effet de ces trois mutations a été étudié de manière importante.

La mutation R33Q se situe dans le premier domaine thioredoxine-like. Cette mutation induit une réduction importante de la capacité de Casq2 à lier le calcium. La protéine mutée présente des anomalies de polymérisation, apparaissant incapable de dimériser correctement (Kim et al., 2007). Dans des modèles cellulaires, la protéine mutée entraîne une diminution du seuil d'activation de RyR2 par le calcium luminal et la survenue de libération spontanée de Ca^{2+} du RS. Les auteurs proposent que les conséquences de la mutation sur l'activation de RyR2 soient secondaires à une altération de l'interaction de Casq2 avec ses partenaires au sein du CRC (Terentyev et al., 2006). La souris KI R33Q présente un phénotype proche de la TVPC chez l'homme (Rizzi et al., 2008). Dans cette souris, le niveau protéique de Casq2 est diminué d'environ 50% alors que le transcrit est présent en quantité équivalente à la souris sauvage. Des anomalies ultrastructurales ont été observées dans les cardiomyocytes, le matériel dense aux électrons détectable dans le RS jonctionnel attribué aux polymères de Casq2 n'était pas retrouvé ou bien dispersé dans la lumière du RS et non groupé aux jonctions RS-tubules T.

La mutation L167H a été étudiée *in vitro* et par surexpression dans des cardiomyocytes de rat. Les expériences de calcium-binding overlay montrent que la mutation ne modifie pas la capacité de Casq2 à lier le calcium mais qu'elle induit des anomalies de repliement de la protéine (Bal et al., 2011; Kim et al., 2007). La surexpression de la protéine mutée dans des cardiomyocytes est associée à une diminution de la capacité de stockage du calcium par le RS et à une diminution de l'amplitude du transitoire calcique (di Barletta et al., 2006).

La mutation D307H située dans le domaine III de Casq2 a également été largement étudiée. *In vitro*, la protéine mutée présente une diminution de la capacité de liaison du calcium dans le RS. Au niveau cellulaire, l'amplitude du transitoire calcique est diminuée et l'isoprotérénol provoque la survenue de DADs (Viatchenko-Karpinski et al., 2004). La souris knock-in D307H présente une réduction drastique du taux protéique de Casq2 et les auteurs proposent que le mécanisme pathogène associé à cette mutation faux-sens soit celui d'un allèle nul (Song et al., 2007). De manière intéressante une augmentation du taux protéique de calréticuline a été observée par les auteurs, comme pour la souris délétée de l'exon 9. La caractérisation de la souris a permis de montrer des arythmies proches de celles identifiées dans la souris KO *CASQ2*.

Des mutations tronquantes ont également été identifiées comme la mutation c.339_354del16nt ; p.G112+5X. La caractérisation *in vitro* par calcium-binding overlay de cette mutation a montré que la protéine perd sa capacité de lier le calcium. Son étude par expression dans des cardiomyocytes de rat a permis de montrer une diminution de la capacité de stockage du calcium par le RS et une diminution de l'amplitude du transitoire calcique (di Barletta et al., 2006). L'exposition à l'isoprotérénol entraîne des DADs au niveau cellulaire. Ces résultats sont comparables à ceux observés dans les souris KO *CASQ2*, peut-être par une absence de la protéine par dégradation de la protéine tronquée ou de l'ARNm.

L'ensemble des études réalisées sur Casq2 a permis d'identifier plusieurs mécanismes à l'origine des effets pathogènes des mutations :

1. Une dégradation accrue de la protéine mutée
2. Une altération fonctionnelle de la protéine : diminution de sa capacité de lier le calcium, perte ou diminution de la capacité de dimérisation-polymérisation, anomalie d'interaction avec RyR2 ou un autre partenaire (triadine, junctine).

Les mutations tronquantes sont probablement associées à une absence de protéine tandis que les mutations faux-sens présentent des anomalies fonctionnelles pouvant être associées à une diminution du taux d'expression protéique.

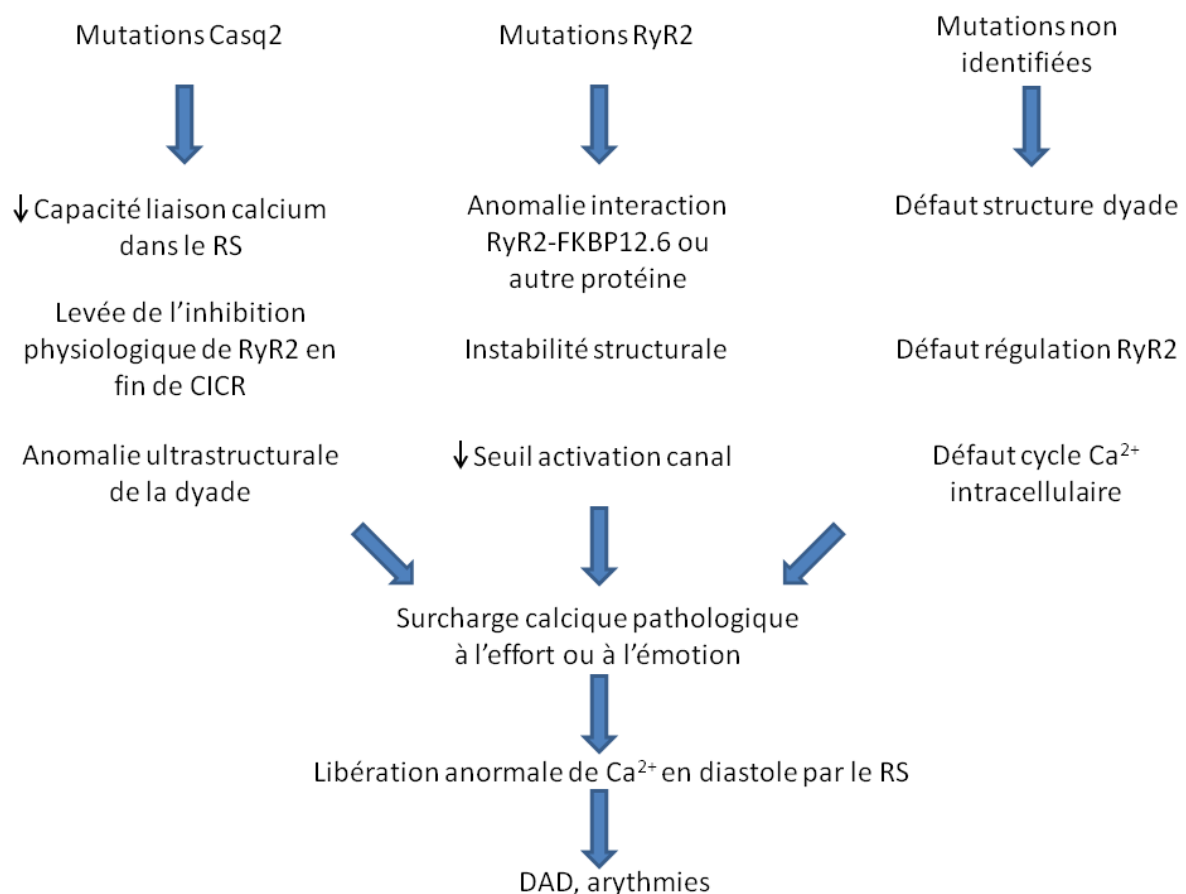
Ces défauts pourraient entraîner des anomalies dans la libération et la séquestration du

calcium dans le RS, des troubles de la régulation de RyR2 par Casq2 susceptible de modifier sa sensibilité au calcium luminal. Enfin, la présence de mutations de Casq2 a été associée à des anomalies ultrastructurales qui peuvent faire évoquer la possibilité d'altération de l'intégrité anatomique des dyades et du CRC, pouvant aboutir à des anomalies de l'homéostasie calcique potentiellement arythmogènes.

En conclusion, ces hypothèses convergent vers une altération du fonctionnement de RyR2 liée à des mutations de la protéine ou de protéines accessoires au sein du complexe macromoléculaire (dérégulation du canal, déstabilisation du complexe).

Le schéma ci-dessous résume les hypothèses physiopathologiques à l'origine de la TVPC (Figure 31).

Figure 31. Hypothèses de dysfonction de RyR2 dans la TVPC



Une meilleure compréhension des bases physiopathologiques des arythmies pourra permettre l'identification de nouveaux gènes candidats dans la TVPC et de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement des arythmies.

Ainsi depuis plusieurs années, des travaux portent sur l'étude de l'interaction FKBP12.6-RyR2 dans une perspective thérapeutique (Lompre et al., 2010). Des efforts importants ont concerné un dérivé benzothiazépine *JTV-519*, qui *via* une meilleure fixation de FKBP12.6, stabilise l'état fermé de RyR2 en diastole et diminue la fuite spontanée de Ca^{2+} du RS. Par cette action, cette molécule améliorerait la fonction systolique et présenterait un potentiel anti-arythmique important dans les TVPC mais dans des indications plus larges, comme les arythmies secondaires à l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque qui sont liées à un mécanisme similaire (Lehnart et al., 2006). Plus récemment, la molécule S107, qui appartient à une nouvelle classe de drogues, appelée « rycals », a été largement étudiée. Cette molécule stabilise le complexe RyR2-FKBP12.6 et inhibe la fuite de calcium du RS et prévient la survenue des arythmies chez la souris mutée RyR2-R2474S.

Ces résultats ouvrent la porte de nouvelles perspectives dans les traitements antiarythmiques centrés sur RyR2, qui sembleraient donc particulièrement indiqués dans la prise en charge de la TVPC.

VIII. Objectifs de la thèse

L'objectif de mon travail de thèse a été d'étudier différents aspects de la génétique moléculaire de la tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique. Lorsque ce travail a commencé, les deux gènes impliqués dans cette pathologie étaient les gènes *RYR2* et *CASQ2*.

Dans une première partie, nous avons analysé les gènes *RYR2* et *CASQ2* au sein d'une cohorte d'individus ayant présenté une TVPC afin d'identifier les différentes mutations et de préciser leurs caractéristiques : mode de transmission, nature des mutations, effet fonctionnel, caractéristique génotype-phénotype.

Compte-tenu de l'absence de mutation identifiée dans environ un tiers des cas de TVPC, nos travaux de recherche se sont orientés dans une seconde partie vers la recherche de nouveaux gènes impliqués dans cette pathologie. Les objectifs étaient d'élargir le diagnostic génétique de la TVPC, mais aussi, dans un cadre plus fondamental, d'apporter de nouveaux éléments pour progresser dans la compréhension de la physiopathologie de la TVPC et des arythmies. En nous basant sur une stratégie gène candidat pour identifier de nouveaux gènes et en partant de l'hypothèse que la TVPC était une pathologie de la libération du calcium par RyR2, nous avons décidé de rechercher des mutations dans trois protéines associées à RyR2 dont l'inactivation chez la souris était associée à un phénotype cardiaque proche de la TPVC : la triadine, la junctine et FKBP12.6. La caractérisation fonctionnelle des nouvelles mutations identifiées a ensuite été entreprise.

MATERIELS et METHODES

I. Population et patients

La population cible est constituée 214 probands (100 individus de sexe féminin et 114 de sexe masculin). Chez 195 patients, le diagnostic de TVPC est évoqué ou retenu sur les données cliniques et paracliniques. Dix-neuf patients décédés dans un contexte évocateur de mort subite (MS) ou des complications d'un arrêt cardio-respiratoire (ACR) ont également été inclus. Ces patients sont ensuite désignés par l'abréviation MS (mort subite), même si cette désignation est inexacte, une partie de ces patients ayant présenté un ACR et sont décédés parfois après une période de plusieurs jours de réanimation après l'ACR.

Le recrutement des sujets inclus est principalement national, mais parfois international. Les prélèvements reçus proviennent majoritairement de patients qui ont été pris en charge dans les centres de Références Nationaux des troubles du rythme cardiaque d'origine héréditaire (Paris, Nantes, Lyon).

La moyenne d'âge des patients au moment de l'analyse est de 27 ans (+/- 17 ans), le patient le plus jeune étant âgé de 2 ans et le plus âgé de 77 ans. L'âge moyen au moment du premier symptôme est 12 ans (+/- 8 ans).

Des antécédents familiaux sont rapportés chez 59 probands (28%). Dans 41 cas, les antécédents familiaux montrent des individus atteints sur plusieurs générations correspondant à une transmission autosomique dominante de la pathologie. Dans 19 cas, les individus atteints sont restreints à une fratrie pouvant correspondre soit à une transmission autosomique récessive, soit à une transmission autosomique dominante à pénétrance réduite. Dans trois cas, une notion de consanguinité existe chez les parents du proband.

Parmi les 195 patients vivants, le motif de consultation initial était un ACR récupéré (n=33), un bilan de syncope(s) survenue(s) le plus souvent dans un contexte évocateur (effort, émotion, n=54) ou plus rarement un signe d'appel moins spécifique (convulsions, palpitations, malaises, douleurs thoraciques, n=16). Le motif de consultation initial n'est pas précisé pour 88 probands. Le bilan paraclinique a compris pour la majorité des patients, un électrocardiogramme de repos, un enregistrement sur 24 heures et une épreuve d'effort dont les données ne seront pas détaillées dans cette thèse.

Dans le cadre de l'enquête familiale, lorsqu'une mutation a été identifiée chez le proband, la recherche de la mutation familiale a été réalisée chez 367 apparentés symptomatiques ou non (diagnostic présymptomatique) en complément des investigations rythmologiques.

II. Aspects réglementaires

Le diagnostic génétique des pathologies cardiaques est organisé nationalement dans le cadre d'un réseau DHOS (Direction de l'Hospitalisation et de l'Offre de Soins, Ministère de la Santé). Dans ce cadre, le laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire du CHU de Grenoble est le seul laboratoire français référent pour l'analyse moléculaire à visée diagnostique des gènes *RYR2* et *CASQ2*. Le laboratoire est autorisé par l'Agence de Biomédecine pour la réalisation des Diagnostics Prénataux et Post-nataux pour l'ensemble des maladies héréditaires (AG08-0600DPN et 1A04440829047).

Les prélèvements biologiques réalisés chez les patients en vue d'une étude des caractéristiques génétiques sont obtenus après avoir recueilli le consentement écrit des patients ou de leur responsable légal (voir consentement en annexe 1). Dans le cas de patients décédés, l'accord des ayants-droits est demandé.

Les ADN ou ARN sont enregistrés dans la collection d'échantillons biologiques du laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire du CHU de Grenoble, déclarée au ministère sous le n° DC-2008-742 et la base de données de la collection dispose d'une autorisation de la Commission Nationale Informatique et Liberté (déclaration et accord CNIL : 25/07/2001 n°754304).

La recherche et la caractérisation de nouveaux gènes sont réalisées dans le cadre d'un protocole de recherche ayant obtenu l'avis favorable du Comité de Protection des Personnes (C.P.P) Sud-Est I (17/01/2011-n°A00995-34). Ce protocole bénéficie d'une assurance responsabilité civile souscrite par le promoteur auprès de la Société Hospitalière d'Assurances Mutuelles (SHAM- 18, rue Edouard Rochet - 69 372 LYON cedex08).

III. Stratégie d'identification des mutations

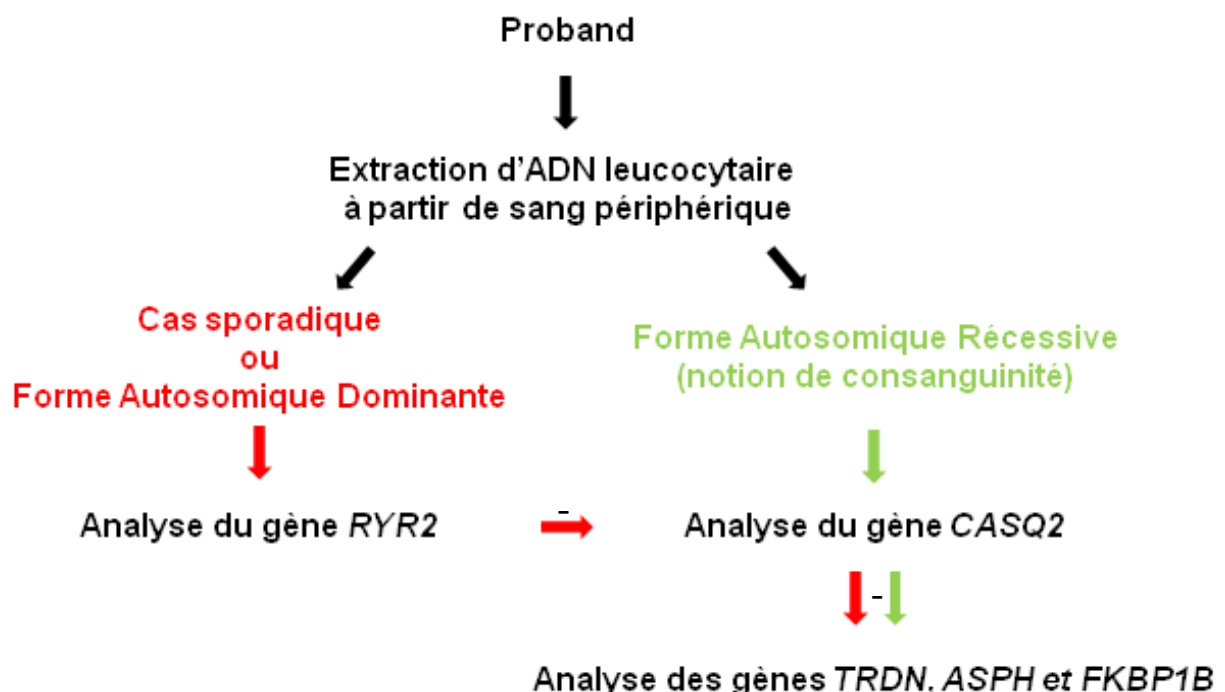
1. Stratégie d'analyse

Dans les cas de transmission dominante ou dans les cas sporadiques, une analyse du gène *RYR2* est réalisée en première intention chez les individus de l'étude. Chez les patients sans aucune mutation identifiée sur le gène *RYR2*, le gène *CASQ2* est ensuite analysé. Lorsqu'une transmission récessive de la pathologie est suspectée, le gène *CASQ2* est analysé en première intention, sans analyse préalable du gène *RYR2*.

Lorsque l'analyse des gènes *RYR2* et *CASQ2* est négative, une analyse des gènes candidats *TRDN*, *ASPH* et *FKBP1B* est effectuée à la recherche de mutation. L'arbre décisionnel joint résume l'attitude suivie (Figure 32).

Lorsqu'une mutation est identifiée chez un patient, la recherche de la mutation est proposé chez les apparentés du premier degré dans le cadre de l'enquête familiale.

Figure 32. Arbre décisionnel suivi lors de l'étude.



2. Définition des régions génomiques analysées

Les références des séquences des gènes, des transcrits et des protéines nommés sont présentées dans le tableau 5. L'organisation des gènes *RYR2*, *CASQ2*, *TRDN*, *ASPH* et *FKBP1B* est présentée sur la figure 33.

➤ Gène *RYR2*

L'analyse moléculaire du gène *RYR2* consiste en une analyse ciblée de 48 exons parmi les 105 exons du gène, couvrant les régions fonctionnellement importantes ou les domaines riches en mutations sur le paralogue *RYR1* (Monnier et al., 2005). Les 48 exons analysés sont les exons 3, 8-10, 12-15, 17-19, 21, 26, 37, 40-50, 72-73, 83, 86-105. Pour les prélèvements analysés de 2003 à 2009, la recherche de mutations du gène *RYR2* comprend une méthode de criblage des variations nucléotidiques dans un premier temps par PCR-dHPLC (denaturing High Performance Liquid Chromatography), les variations nucléotidiques détectées étant ensuite caractérisées par séquençage. Pour les prélèvements analysés de 2009 à 2011, les ADN sont analysés directement par PCR-séquençage sans criblage préalable par dHPLC.

➤ Gènes *CASQ2*, *ASPH* et *FKBP1B*

La recherche de mutations est réalisée par PCR-séquençage des exons et des bornes introniques de chaque exon intervenant dans les régions codantes pour les isoformes cardiaques de chaque gène. Pour le gène *CASQ2*, les 11 exons sont analysés. Lorsqu'une seule mutation hétérozygote est identifiée chez un proband, la région 3'UTR de *CASQ2* est analysée à la recherche d'une seconde mutation. Les exons 2 à 7 du gène *ASPH* comprenant les régions codantes pour les deux isoformes de la junctine ainsi que l'ensemble des régions codantes du gène *FKBP1B* (exons 1 à 4) sont analysés.

Tableau 5. Références des gènes, transcrits et protéines analysées.

Gène		Référence MIM	Taille	Transcrit / mRNA			Protéine		
Nom	Locus			Nom	Référence	Taille bp	Nom	Référence	Taille AA
<i>RYR2</i>	1q43	180902	105 exons 791,6 kb	RyR2	NM_001035.2	16365	Isoforme 1	NP_001026.2	4967
						16389	Isoforme 2	AA 3715 E → EVTGSQRSK	4975
<i>CASQ2</i>	1p13.3-p11	114251	11 exons 68,8 kb		NM_001232.3	2716	Casq2	NP_001223.2	399
<i>TRDN</i>	6q22.31	603283	41 exons 420,7 kb	Isoforme 1	NM_006073.3	4782	Trisk 95	NP_006064.2	729
				2	NM_001251987.1	4763	Trisk 51	NP_001238916.1	461
				3	NM_001256020.1	1864		NP_001242949.1	297
				4	NM_001256021.1	3002	CT1 ou Trisk32	NP_001242950.1	286
				5	NM_001256022.1	1413		NP_001242951.1	167
<i>ASPH</i>	8q12.1	600582	30 exons 214,0 kb	Junctine isoforme 1	NM_020164.4	3287	Junctine isoforme 1	NP_064549.1	225
				Junctine	NM_032467.3	3242	Junctine	NP_11586.1	210
<i>FKBP1B</i>	2p23.3	600620	5 exons 13,9 kb	Variant 1	NM_004116.3	971	Isoforme a	NP_004107.1	108
				Variant 2	NM_054033.2	1016	Isoforme b	NP_473374.1	80

➤ Gène *TRDN*

L'analyse moléculaire du gène *TRDN* consiste en une analyse ciblée, couvrant la région codante de l'isoforme cardiaque CT1 de la triadine, correspondant aux exons 1 à 8 et 8bis du gène. La recherche de mutations est réalisée par PCR-séquençage des exons et des bornes introniques de chaque exon étudié.

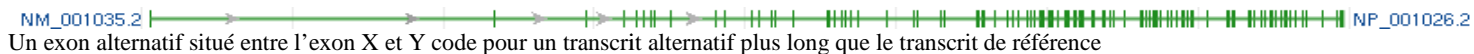
Afin de définir les exons à analyser au niveau du gène *TRDN*, nous avons au préalable identifié la séquence du transcrit de CT1 chez l'homme, car celle-ci n'était ni référencée, ni publiée au début de ce travail. Par homologie avec le cDNA de CT1 chez le rat et la souris constitué de la succession des exons 1 à 8 et 8b du gène *TRDN*, nous avons identifié un cadre ouvert de lecture de 861 nucléotides chez l'homme. Les 793 premiers nucléotides correspondent à la séquence codante des exons 1 à 8, commune aux isoformes Trisk 51 et 95. Les 68 derniers nucléotides correspondent à l'exon 8 bis, constitué de la séquence génomique située immédiatement en aval de l'exon 8, et sont spécifiques de CT1. La traduction du transcrit résulte en une protéine de 286 acides aminés avec une masse moléculaire de 31.5 kDa, concordante avec la masse moléculaire apparente observée pour CT1. Après extraction de l'ARN cardiaque humain témoin et reverse transcription à l'aide d'oligoDT (détails de la technique en IV.1), l'amplification de l'ADN complémentaire correspondant à la succession des exons 1 à 8 bis est réalisée par PCR à l'aide des amorces TRDN_1i5 et TRDN_1R situées respectivement 178 pb en amont du A de l'ATG et 191 pb en aval du A du TGA de l'exon 8 bis. La séquence du produit PCR est déterminée par séquençage unidirectionnel en utilisant les mêmes amorces.

A partir d'homogénats de tissu cardiaque humain témoin, nous avons vérifié la présence de la protéine correspondante en immunoblot, en utilisant des anticorps dirigés contre la partie N-terminale (TEITAEGNASTTTTVIY) de la triadine, commune à l'ensemble des isoformes d'une part, et contre la partie C-terminale (GSKRILGKKHMQ), spécifique cette isoforme d'autre part (Marty et al., 2000).

Figure 33. L'organisation des gènes *RYR2*, *CASQ2*, *TRDN*, *ASPH* et *FKBP1B*.

Le trait horizontal vert figure la séquence génomique, les traits verticaux les exons et les flèches le sens 5'-3' de la séquence codante. D'après <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>

➤ Gène *RYR2*



➤ Gène *CASQ2*

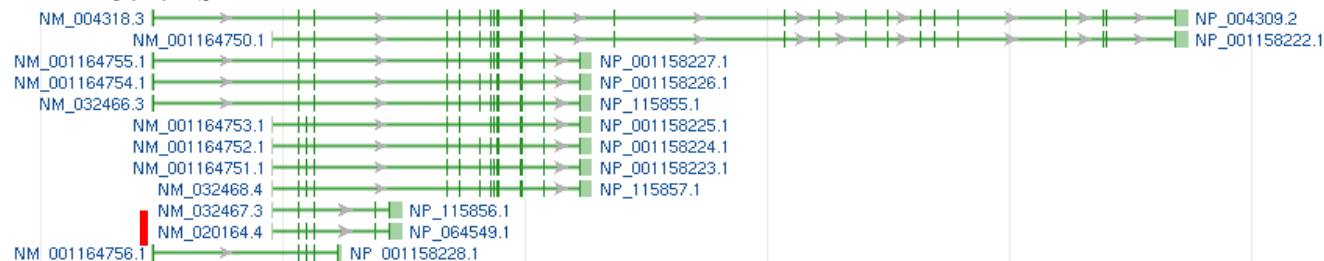


➤ Gène *TRDN*



Le transcrit CT1 correspond au transcrit le plus court figuré sur la figure

➤ Gène *ASPH*



Les deux isoformes de la junctine sont indiquées par le trait rouge

➤ Gène *FKBP1B*



IV. Méthodes de génétique moléculaire

1. Extraction des acides nucléiques

➤ Extraction de l'ADN

Différentes méthodes d'extraction sont utilisées selon la nature du prélèvement biologique de départ : l'extraction au phénol-chloroforme constitue la méthode de référence mais nécessite une manipulation sous hotte, la méthode au chlorure de guanidine constitue une alternative excellente sans toxicité tandis que la méthode utilisant la résine Chelex-100® (BioRad, Hercules, CA, Etats-Unis) est simple, rapide, particulièrement adaptée pour les faibles quantités mais avec une faible quantité d'ADN extraite et non purifiée.

- Extraction de l'ADN leucocytaire au chlorure de guanidine

Un culot de leucocytes est obtenu à partir de sang périphérique par lyse hypotonique des globules rouges. L'ADN leucocytaire est extrait selon la méthode au chlorure de guanidine (Jeanpierre, 1987). Brièvement, les leucocytes sont lysés par du chlorure de guanidine en présence de protéinase K puis l'ADN est précipité en présence d'éthanol et dissous dans du tampon Tris EDTA (Tris-HCl 10mM pH 7.4 ; EDTA 1 mM pH 8).

- Extraction d'ADN à partir d'un culot de cellules urinaires en phénol-chloroforme

Les cellules contenues dans l'urine proviennent de l'élimination des cellules du tractus urinaires. Un culot cellulaire est obtenu par centrifugation des urines à 3900 g 10 min à 4°C. Le culot est ensuite repris dans 10 ml de sérum physiologique, à nouveau centrifugé. L'extraction de l'ADN est effectuée en phénol chloroforme (Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York, 1989).

- Extraction d'ADN à partir d'écouvillonnage buccal à l'aide d'une résine Chelex-100® (BioRad, Hercules, CA, Etats-Unis)

L'extraction d'ADN à partir des cellules buccales repose sur la lyse des cellules dans de l'eau conjuguant l'action d'un choc thermique et l'action de la protéinase K et la dénaturation des protéines à 100°C tandis que la résine Chelex (chélatrice de cations divalents) permet d'inhiber l'action des nucléases. L'ADN est récupéré dans le surnageant de centrifugation, les

protéines étant éliminées dans le culot.

➤ Quantification et évaluation de la pureté des acides nucléiques

La quantification des acides nucléiques est réalisée par la mesure de l'absorbance à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop 1000, ThermoFisher Scientific, De, Etats-Unis) et la pureté par un spectre d'absorption de 220 à 300 nm. La contamination protéique est évaluée par le rapport DO 260 / DO 280.

La quantification et la pureté ne sont pas évaluées après extraction de l'ADN selon la méthode Chelex en raison d'une contamination protéique trop importante qui fausse la quantification.

➤ Extraction d'ARN à partir de tissu cardiaque témoin et obtention d'ADNc par reverse transcription

Les échantillons cardiaques humains témoins ont été obtenus auprès de la Banque de Tissus (Paris, S. Vasseur) et sont conservés à -80°C. Le début du protocole : découpe, broyage et homogénéisation, est réalisé sur la carboglace afin de limiter la dégradation de l'ARN. Un fragment tissulaire de quelques milligrammes est utilisé pour l'extraction d'ARN. Le fragment est broyé à l'aide d'un potter puis repris dans 500 µl de TRIzol ® (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Un volume de 150 µl de chloroforme : alcool isoamylique 49 :1 (v/v) est ajouté au mélange, qui est ensuite homogénéisé par agitation manuelle vigoureuse puis incubé 10 minutes dans la glace et centrifugé 15 min à 12000 g, 4°C. L'ARN solubilisé dans la phase supérieure aqueuse est précipité par 250 µl d'isopropanol, incubé 1 h à -20°C puis centrifugé 20 min à 12000 g, 4°C. Après élimination de l'isopropanol, le culot est lavé par 500 µl d'éthanol 80% (v/v H₂O DEPC). Le surnageant est éliminé et le culot est rincé avec de l'éthanol absolu à nouveau centrifugé 15 min à 12000 g, 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot mis séché à l'air libre 5-10 min. L'ARN est solubilisé par 50 µl d'H₂O DEPC et 0,5 µl de RNase Inhibitor ® (40 U/µl, Roche, France). L'ARN total extrait est quantifié et sa qualité évaluée par la mesure de l'absorbance de la solution de 220 à 300 nm (Nanodrop 1000, ThermoFisher Scientific, De, Etats-Unis). L'ADN complémentaire (ADNc) est obtenu par reverse transcription (RT) à partir d'1 µg d'ARN total et 1 µg d'oligodT 10 min à 65°C puis ajout dans le mélange de 10 unités de Reverse Transcriptase Transcriptor® (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, Etats-Unis), 20 U de RNase Inhibitor, 0.8µl de dNTP 25 mM dans un volume final de 20 µl pendant 30 min à 55°C.

2. Amplification PCR à partir d'ADN génomique

Pour chaque gène analysé, les régions codantes exoniques et leurs régions introniques flanquantes sont amplifiées en utilisant des amorces spécifiques. En fonction de la technique d'analyse moléculaire utilisée après amplification, les amorces varient pour un même exon. Les conditions d'amplification et les séquences des amorces utilisées pour analyser les différents gènes sont indiquées dans les annexes 2 et 3.

3. Méthodes de criblage

Les méthodes de criblage permettent la détection rapide semi-automatisée des substitutions mononucléotidiques, microinsertions et microdélétions de petite taille. Les variations hétérozygotes sont détectées directement tandis que la détection des variations homozygotes nécessitent le passage de l'échantillon analyse mélangé à un témoin homozygote connu.

Les deux méthodes utilisées, dHPLC et HRM (voir ci-dessous), reposent sur la détection d'hétéroduplex après amplification PCR préalable de la région d'intérêt.

- Chromatographie liquide haute performance en conditions partiellement dénaturante (dHPLC, denaturing high performance liquid chromatography)

Après amplification PCR, les fragments d'ADN sont dénaturés puis renaturés lentement pour la formation de duplex. Ceci est réalisé dans un thermocycleur programmé selon le schéma suivant : 5 min à 95°C puis diminution de 1°C toutes les 40 sec jusqu'à 50°C, puis baisse rapide de la température à 15°C. Les échantillons sont ensuite directement analysés par dHPLC. Chaque type de fragment analysé par dHPLC nécessite la mise au point d'une méthode spécifique reposant sur le choix de deux paramètres : la température d'analyse définie en fonction de la T_m du fragment d'ADN et le gradient d'acétonitrile. Dans un premier temps, la séquence nucléotidique est analysée par le logiciel informatique Wavemaker® (Transgenomic, Cambridge, MA, Etats-Unis) afin de déterminer le profil de fusion. La méthode d'analyse est ensuite mise au point en fonction des données obtenues par ce logiciel. Plusieurs températures et gradients d'analyse sont nécessaires si le fragment comporte plusieurs domaines de compositions nucléotidiques différentes (richesse en A/T ou G/C).

Les conditions utilisées pour le criblage exonique de *RYR2* sont détaillées dans l'annexe 2.

➤ Courbe de fusion haute resolution (HRM, high resolution melting)

La technique de criblage par HRM comporte trois étapes principales :

1. Une PCR réalisée en présence d'un agent intercalant. L'enregistrement de la fluorescence est réalisé à la fin de chaque étape d'élongation.
2. Une réaction de dénaturation suivie d'une renaturation lente pour la formation de duplex (hétéroduplex et homoduplex pour les individus hétérozygotes / homoduplex pour les individus homozygotes sains ou mutés), selon le même principe que pour la dHPLC.
3. Une étape d'enregistrement de la courbe de fusion des duplex. La dénaturation progressive des duplex avec l'augmentation de la température va être associée à la chute de la fluorescence. Chaque séquence d'ADN comporte une courbe de fusion unique. Lorsque la séquence d'ADN à analyser comporte des variations, la courbe de fusion sera donc modifiée. En cas de variations hétérozygotes, l'existence d'hétéroduplex présentant un mésappariement entraîne une modification de la courbe de fusion alors que cette technique reste peu sensible pour la détection de variations homozygotes.

Le criblage de mutations par technique HRM est réalisé en utilisant un Light Cycler ® 480 (Roche, France). La recherche de la variation p.T59R de l'exon 2 du gène *TRDN* est réalisée par amplification de la région d'intérêt et analyse de la courbe de courbe haute résolution (HRM) sur 400 chromosomes témoins à l'aide des amorces TRDN 2i5 / 2i3 et en utilisant le réactif ready-to-use hot star PCR reaction mix® (Roche, France) selon les recommandations du fabricant (contenant la polymérase, le tampon, le MgCl₂, les dNTPs et l'agent intercalent Sybr Green I dye).

Le programme utilisé est le suivant :

- Dénaturation initiale : 95°C 10 min
- Amplification : 50 cycles de 95°C 10 sec, 60°C 10 sec, 72°C 15 sec avec acquisition de la fluorescence à la fin de chaque cycle
- High Resolution Melting : 95°C 1 min puis diminution de 2.2°C/sec jusqu'à 40°C et augmentation jusqu'à 95°C avec une augmentation de 1°C/sec et une acquisition continue du signal d'émission de fluorescence de 65°C à 95°C.

4. Identification de mutation par séquençage

La procédure se divise en 5 étapes successives :

➤ Purification des produits d'amplification

Cette étape a pour objectif l'élimination des amorces et des dNTPs en excès dans les produits d'amplification avant séquençage par l'action d'une phosphatase alcaline et d'une exonucléase. Un volume de 1 µl d'ExoSAP-IT (Affymetrix, Paris, France) est ajouté à 5 µl d'amplifiat et le mélange est ensuite incubé 15 min à 37°C puis 15 min à 80°C.

➤ Réaction de séquence

A l'amplifiat purifié, seront ajoutés l'amorce de séquençage et le réactif BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit contenant les dNTPs, les ddNTPs* marqués par un fluorophore et une polymérase (Applied Biosystem, Foster City, Etats-Unis). Un volume de 0.5 à 6 µl d'amplifiat purifié est utilisé pour la réaction de séquence, en fonction de l'intensité de l'amplification, avec 2,25 µl de le réactif BigDye Terminator dilué, 1,6 µl d'amorce de séquençage à 2 pmol/µl, complété par de l'eau à 10 µl. Le programme permettant la réaction de séquence comprend une dénaturation initiale à 96°C 1 min suivie de 25 cycles de réaction de séquence (96°C 10 sec, 50°C 5 sec, 60°C 4 min). La conservation est réalisée à 4°C.

➤ Purification du produit de réaction de séquence

La purification du produit de réaction de séquence permet d'éliminer les réactifs en excès et de reprendre le produit final dans une solution adaptée à la migration électrophorétique.

Le protocole repose sur une purification EDTA éthanol. Brièvement, un mélange contenant le produit de réaction de séquence plus 1 µl d'EDTA 125 mM, 1 µl d'acétate de sodium 3 M, 50 µl d'Ethanol 100% est incubé à température ambiante (TA) 15 minutes puis centrifugé 45 minutes à 2000g à 4°C. Le surnageant est éliminé par retournement et centrifugation brève à 180 g. Le culot est ensuite repris par 65 µl d'éthanol 70%, homogénéisé par vortex et centrifugé à 1650 g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant est à nouveau éliminé par retournement et centrifugation brève à 180 g. Le culot séché à TA 15 min est repris par 15 µl de Hi-Di formamide (Applied Biosystem, Foster City, Etats-Unis).

➤ Electrophorèse capillaire

Les différents échantillons préparés ci-dessus sont introduits dans une plaque 96 puits et chargés sur un séquenceur ABI Prism 3130XL pour réaliser l'électrophorèse capillaire (Applied Biosystem, Foster City, Etats-Unis).

➤ Analyse bioinformatique

La recherche de variations à partir de l'électrophérogramme est effectuée à l'aide du logiciel d'analyse de séquence Seqscape V2.5 (Applied Biosystem, Foster City, Etats-Unis).

5. Haplotypage

➤ Vérification de paternité à l'aide du kit AmpfSTR Identifiler®

Lorsqu'une variation est identifiée chez un proband, la recherche de la mutation identifiée est réalisée chez le père et la mère du proband par dHPLC ou séquençage. Si la variation n'est pas retrouvée chez les parents, il s'agit le plus probablement d'une néomutation ou d'un défaut de paternité. La paternité est alors vérifiée par l'étude de 15 marqueurs génomiques de type microsatellites et un marqueur de sexe (Amelogenin, CSF1PO, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S359, D18S51, D19S433, D21S11, FGA, TH01, TPOX et vWA). L'étude de ces marqueurs chez le proband, son père et sa mère permet d'identifier pour chaque marqueur l'origine possible paternelle d'un allèle et maternelle de l'autre allèle. Une discordance de transmission au niveau de l'allèle paternel fera évoquer une erreur de paternité.

Cette étude est réalisée en utilisant le kit AmpfSTR Identifiler® (Applied Biosystem, Foster City, Etats-Unis) selon les recommandations du fabricant. Le principe repose sur une PCR multiplex avec pour chaque couple une amorce marquée en fluorescence. Quatre fluorophores différents sont utilisés pour éviter le chevauchement de fragment de même taille pour différents marqueurs sur un même canal. La taille des fragments amplifiés par PCR est déterminée par migration en électrophorèse capillaire après ajout préalable d'un marqueur de taille fluorescent (séquenceur ABI Prism 3130 XL, Applied Biosystem, Foster City, Etats-Unis). Les résultats sont interprétés à l'aide du logiciel d'analyse bioinformatique GeneMapper® (Applied Biosystem, Foster City, Etats-Unis).

➤ Etude de ségrégation par marqueurs microsatellites juxtagéniques du gène *TRDN*

L'ADN des différents membres de la famille est analysé par cinq marqueurs microsatellites juxtagéniques du gène *TRDN* : D6S1712, D6S979, D6S988, D6S1639 et D6S408. Le principe est identique à celui du kit AmpfSTR Identifier® mais en uniplex. Il repose sur l'analyse de la taille des fragments fluorescents amplifiés par électrophorèse capillaire. A un volume final de 25 µl d'un mélange pour PCR contenant 50 ng d'ADN génomique, 200 µM de chaque dNTP, 0,25 unité de Taq polymérase, sont ajoutés 20 pmoles de chaque amorce 5' et 3', l'amorce sens étant marquée par un fluorochrome (FAM). Le programme d'amplification est le suivant : dénaturation initiale à 95°C pendant 10min suivie de 28 cycles d'amplification (94°C 1 min, 59°C 1 min, 72°C 1 min) et une élongation finale à 60°C pendant 1 heure. Un volume de 0.5 µl de l'amplifiat et de 0.5 µl du marqueur de taille GS 500 (-250) LIZ (Applied Biosystem, Foster City, Etats-Unis), est ajusté à 10 µl avec de la formamide (HI-DI formamide, Applied Biosystem, Foster City, Etats - Unis). Le mélange est dénaturé pendant 2 minutes à 95°, mis dans la glace pendant 2 min avant d'être analysé par électrophorèse capillaire (séquenceur ABI Prism 3100, Applied Biosystem, Foster City, Etats - Unis). Les résultats sont analysés avec le logiciel GeneMapper ® (Applied Biosystem, Foster City, Etats-Unis).

6. Mise en évidence d'une mosaïque somatique

➤ PCR allèle spécifique (PCR-ARMS Amplification Refractory Mutation System)

L'existence d'une mosaïque germinale et somatique pour la mutation c.7202G>A dans l'exon 47 du gène *RYR2* a été évoquée chez l'individu I:2 de la famille 33. La méthode de PCR-ARMS est utilisée pour mettre en évidence la présence de l'allèle muté au niveau de l'ADN leucocytaire chez cette patiente. Trois amorces différentes ont été conçues : une amorce sens commune localisée à la fin de la partie 5' de l'exon 47 (5'-GT TCC TCC TTT TCC CCT CA-3'), et deux amorces antisens spécifiques, l'une de l'allèle sauvage et l'autre de l'allèle muté, divergeant par le nucléotide c.7202 en 3' : respectivement 5'-ATG CAT CTC AGG AGC GC-3' et 5'-ATG CAT CTC AGG AGC GT-3'. Deux PCR sont réalisées : une avec l'amorce commune et l'amorce spécifique de l'allèle sauvage et une avec l'amorce commune et celle spécifique de l'allèle mutée. L'amplification de l'ADN dans les deux conditions démontre l'existence de l'allèle muté et de l'allèle sauvage chez l'individu analysé. Un témoin

homozygote sain est utilisé comme contrôle pour valider la spécificité de la PCR utilisant l'amorce spécifique de l'allèle muté.

➤ Détermination semi-quantitative du taux de mosaïcisme somatique par HRM

Le taux de mosaïcisme pour l'allèle muté dans l'ADN de l'individu I:2 de la famille 33 est estimé de manière semi-quantitative par HRM. L'amplification PCR et l'analyse HRM sont réalisées comme décrit dans le paragraphe précédent (Light Cycler ® 480, Roche, France). L'ADN (hétérozygote G/A) du proband est mélangé avec un ADN contrôle (homozygote G) à des dilutions de 10, 25, 50, 75 et 90 %. L'ADN du proband, les dilutions réalisées et l'ADN contrôle permettent d'obtenir une gamme semi-quantitative d'ADN muté. Des ADN extraits à partir de cellules buccales, urinaires et leucocytaires maternelles sont analysés par HRM.

➤ Estimation du taux de mosaïcisme leucocytaire par séquençage des clones obtenus par Topo TA cloning à partir du produit PCR de l'ADN leucocytaire du patient.

L'existence d'une mosaïque germinale et somatique pour la mutation c.11836G>A ; p.G3946S dans l'exon 88 du gène *RYR2* a été évoquée chez l'individu I:1 de la famille 46. La présence de l'allèle muté à l'état de mosaïque est recherchée par séquençage des clones obtenus à partir du produit d'amplification PCR de l'ADN leucocytaire maternel. L'exon 88 et ses bornes introniques sont amplifiés par PCR à partir de l'ADN leucocytaire. Les produits PCR obtenus sont clonés dans le plasmide pCR2.1 en utilisant le kit de clonage TopoTA selon les recommandations du fabricant (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Les ADN de soixante-douze clones sont extraits et séquencés sur un séquenceur ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer. Le taux de mosaïcisme est estimé en déterminant le taux de clones porteurs de la séquence mutée (% de mosaïcisme = % de clones mutés x 2).

V. Critères de pathogénicité des variations nucléotidiques

La nature de la variation est fondamentale pour évaluer son caractère pathogène. Les mutations non-sens, les microdélétions, les microinsertions et les mutations d'épissage entraînent une modification importante de la séquence protéique ou un décalage du cadre de lecture responsable de l'apparition d'un codon stop prématuré. La présence d'un codon stop prématuré entraîne soit la synthèse d'une protéine tronquée non fonctionnelle ou instable, soit la dégradation de l'ARNm via le mécanisme nonsense mediated mRNA decay (NMD, (Khajavi et al., 2006)). Le caractère causal ou pathogène de ces mutations est admis. Par contre, les variations faux-sens, les variations synonymes ou les changements affectant les séquences introniques peuvent être plus sujettes à discussion.

Nous avons utilisé différents critères pour définir le caractère pathogène d'une variation faux-sens (Cotton and Scriver, 1998; Richards et al., 2008) :

1. Degré de conservation de l'acide aminé
2. Nature du changement physico-chimique de l'acide aminé
3. Prévalence de la mutation
4. Ségrégation de la mutation avec la pathologie dans la famille
5. Analyse fonctionnelle de la mutation.

Les études directes prouvant la causalité fonctionnelle des mutations faux-sens ne sont pas toujours réalisables et seuls les 4 premiers critères sont alors retenus.

Une variation est considérée comme polymorphe (non pathogène) lorsqu'elle est retrouvée dans une population contrôle à une fréquence supérieure à 1% ou lorsqu'elle est répertoriée comme polymorphisme dans les bases de données de variants (NCBI SNP database, 1000 genomes project, Genome Variation Server, Exome Variation Server). On notera toutefois que la prévalence des mutations récessives dans une population témoin n'est pas nulle.

Dans notre étude, une variation faux-sens est retenue comme probablement pathogène si :

- elle modifie un acide aminé conservé,
- elle est non-conservative sur le plan physico-chimique,

- elle est absente d'une population contrôle de 200 individus (400 chromosomes) pour une variation dominante ou si elle est absente ou existe isolée à l'état hétérozygote pour une variation récessive,
- elle ségrége avec la pathologie dans la famille
- elle est survenue chez le proband (mutation *de novo*)
- elle est déjà décrite dans la pathologie
- elle a été validée fonctionnellement.

La probabilité du caractère pathogène de la variation a également été évaluée à l'aide de logiciels de prédiction (SIFT, Polyphen, SNPs3D, Pmut, SNPsandGO, SNAP, adresses des sites informatiques dans le chapitre spécifique en fin de document).

Le caractère pathogène des variations synonymes ou des changements affectant les séquences introniques, en dehors des sites consensus d'épissage donneur GT et accepteur AG, est évalué sur des critères proches :

- la prévalence de la variation dans la population estimée en recherchant la mutation dans une population contrôle de 200 individus
- la conservation du nucléotide affecté
- sa position dans la séquence (inhibition ou abolition des sites d'épissage existants, création ou activation de sites cryptiques)
- la ségrégation du variant avec la pathologie dans la famille
- l'analyse des transcrits.

L'impact sur l'épissage d'une variation synonyme ou intronique est prédit à l'aide de logiciels de prédiction (NetGene2, Gene Splicer et Automated Splice Site Analyses). La validation fonctionnelle de la variation est réalisée à l'aide d'un minigène d'épissage.

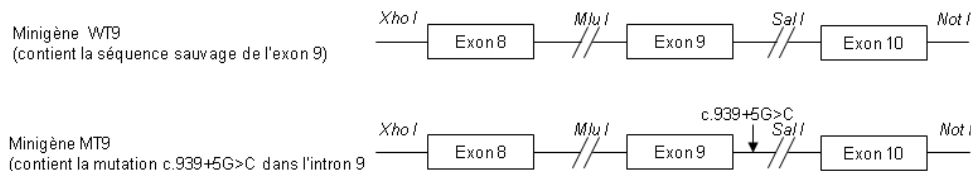
VI. Etude par minigène des mutations c.381C>T et c.939+5G>C du gène *CASQ2*

1. Synthèse des minigènes et clonage

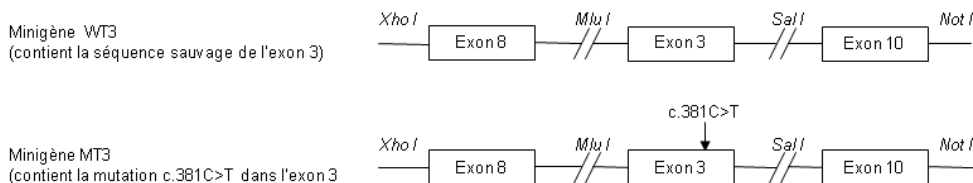
Chaque minigène est dessiné de manière à inclure l'exon concerné par la variation étudiée et 2 exons flanquants de part et d'autre (Figure 34). Pour inclure la majorité des éléments régulateurs d'épissage, le minigène contient plus de 200 nucléotides des séquences introniques en amont et en aval de chaque exon inclus dans le minigène. Le minigène est donc constitué de la succession de trois exons avec leurs bornes introniques pour chacun. La taille de la séquence constituée des trois exons et de leur séquence intronique flanquante est inférieure à 1500 pb. Des sites de restriction sont inclus dans la séquence à chaque extrémité des séquences introniques pour faciliter le clonage.

Figure 34. Représentation schématique des minigènes WT9, MT9, WT3 et MT3.

A. Constructions utilisées pour l'étude de la mutation c.939+5G>C du gène *CASQ2*



B. Constructions utilisées pour l'étude de la mutation c.381C>T du gène *CASQ2*



Pour l'étude de la mutation c.939+5G>C, un minigène sauvage WT9 est synthétisé, contenant dans le sens 5'-3', la succession des séquences des exons 8, 9 et 10 du gène *CASQ2* avec environ 200 pb introniques de part et d'autre de chaque exon. La mutation c.939+5G>C est introduite par mutagenèse dirigée dans le minigène sauvage permettant d'obtenir un minigène muté MT9. Les deux minigènes sont synthétisés et clonés dans le plasmide pUC57 par la société Genscript (Piscataway, Etats-Unis). Chaque minigène est sous-cloné dans un plasmide d'expression pCI_neo.

Pour l'étude de la mutation c.381C>T; p.=, un minigène sauvage contient l'exon 3 avec ses bornes introniques en lieu et place de l'exon 9 à partir du minigène WT9. En pratique, l'exon 3 avec les bornes introniques est amplifié à partir de l'ADN du patient porteur de la mutation c.381C>T à l'hétérozygote à l'aide d'amorces sens et antisens comprenant dans leur partie 5' les sites de restriction des enzymes MluI et SalI respectivement. Le produit d'amplification est ensuite cloné dans le plasmide pCR@2.1 à l'aide du kit de clonage TOPO@TA selon les recommandations du fabricant (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Après purification et séquençage, le plasmide pCR@2.1 contenant la séquence sauvage de l'exon 3 ou la séquence mutée en position c.381C>T et le plasmide pCIneo contenant le minigène WT9 sont digérés par MluI et SalI. Après purification des produits de digestion, la séquence de l'exon 3 sauvage ou mutée est insérée en lieu et place de l'exon 9 dans le plasmide pCIneo par ligation (Rapid DNA ligation kit, Roche, France). Nous avons ainsi obtenu un minigène sauvage contenant la succession des séquences des exons 8, 3 et 10 avec 200 pb introniques de part et d'autre de chaque exon, WT3 et un minigène équivalent porteur de la mutation c.381C>T, MT3 insérés dans pCI_neo.

Les différentes constructions sont séquençées pour vérifier les séquences des minigènes WT9, MT9, WT3 et MT3.

2. Culture cellulaire et transfection

Les cellules HEK-293 sont cultivées en milieu DMEM, 10% SVF et 1% pénicilline-streptomycine, à 37°C, 5% CO₂ (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France).

Trois µg d'ADN plasmidique de chaque construction est utilisé pour une transfection avec 10 µl de réactif Exgen 500 pour 350 000 cellules HEK 293 par P35 selon les recommandations du fabricant (Euromedex, Souffelweyersheim, France).

3. Extraction de l'ARN total cellulaire, RT-PCR et analyse des produits d'amplification

Quarante-huit heures après transfection, les cellules sont récoltées par trypsination et centrifugation 5 min à 1600 g. Les culots cellulaires sont solubilisés par ajout de 100 µl de réactif TRIzol (Invitrogen, Cergy-Pontoise, Etats-Unis) puis l'ARN total est extrait en

utilisant le kit Pure linkRNA minikit en suivant les recommandations du fabricant (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France).

L'ADN complémentaire est synthétisé à partir de 500 ng à 1 µg d'ARN à l'aide d'oligoDT. Le cDNA spécifique complémentaire de l'ARN issu de l'épissage du minigène est amplifié à l'aide d'amorces pCIneo_F et T3R situées dans la séquence du plasmide pCIneo de part et d'autre de la séquence du minigène (annexe 3, (Gamez-Pozo et al., 2007)).

L'analyse de la taille des produits d'amplification est réalisée par migration électrophorétique et séparation des fragments amplifiés sur gel d'agarose 0.8%. Après extraction du gel et purification (kit Qiaquick gel extraction, Qiagen, Venlo, Pays-Bas), l'analyse de la séquence des produits amplifiés est réalisée par séquençage.

VII. Caractérisation fonctionnelle de la mutation p.T59R du gène *TRDN*

1. Anticorps

Les anticorps primaires et secondaires utilisés au cours de cette étude sont listés dans les tableaux 6 et 7, ainsi que les dilutions utilisées en immunofluorescence (IF) et en immunoblot (IB).

Tableau 6. Anticorps primaires utilisés.

Cible	Séquence peptidique	Espèce	Dilutions		Origine
			IF	Immunoblot	
Triadine (partie N-terminale)	TEITAEGNASTTTTVIY	Lapin	1/1000	1/10 000	Maison
CT1 rat (partie C-terminale)	YGGPKRILDKKQI	Lapin, Cobaye	1/1000	1/10 000	Maison
CT1 souris (partie C-terminale)	RRQQEVQRE	Lapin	1/500	1/10 000	Maison
RyR		Lapin		1/10 000	Maison
RyR (partie C-terminale)	CFRKQYEDQLS	Cobaye	1/200		Maison
Calnexine		Lapin	1/500		Stressgen
Alpha-tubuline		Souris	1/500	1/5000	Sigma
Climp 63		Souris	1/500	1/1000	Alexis Biochem
Na ⁺ /K ⁺ ATPase		Souris		1/2000	Millipore

La séquence peptidique est celle qui a été utilisée pour l'immunisation (Neosystem®, Strasbourg, France).

Tableau 7. Anticorps secondaires utilisés.

Espèce cible	Couplage	Dilutions	Origine
Immunofluorescence			
Lapin	HRP	1/10 000	Jackson Immunoresearch
Souris	HRP	1/10 000	Jackson Immunoresearch
Immunoblot			
Souris	Cyanine 3	1/500	Invitrogen
Cobaye	Alexa 488	1/500	Invitrogen
Lapin	Alexa 488, Cyanine3	1/500	Invitrogen

2. Mutagenèse du cDNA de CT1 de rat

L'ADNc de CT1 de rat avait été cloné au laboratoire avant le début de ce travail et inséré dans le plasmide d'expression de cellules de mammifères, pcDNA3.1 (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France, (Vassilopoulos et al., 2005)). Le codon correspondant au résidu thréonine en position

59 est changé en arginine par mutagenèse dirigée en utilisant le kit Quik Change® II XL Site Directed Mutagenesis (Stratagene, Etats-Unis). L'introduction de la mutation est ensuite vérifiée par séquençage de l'intégralité de la région codante pour CT1.

3. Etudes de surexpression de CT1 de rat dans une lignée cellulaire non myogénique, les cellules COS-7.

➤ Culture de lignée cellulaire COS-7

Les cellules COS-7 sont une lignée de cellules rénales de singe vert n'exprimant ni la protéine CT1, ni aucune autre isoforme de triadine. La lignée est cultivée en milieu DMEM, 10% SVF et 1% pénicilline-streptomycine, à 37°C, 5% CO₂ (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France).

➤ Transfection

La surexpression de CT1 sauvage ou mutée p.T59R est réalisée par transfection du plasmide pcDNA3.1 contenant les séquences codantes de CT1 sauvage ou mutée. Les cellules COS-7 sont transfectées en utilisant le réactif Exgen 500 (Euromedex, Mudolsheim, France) selon les recommandations du fabricant (Tableau 8).

Tableau 8. Conditions de transfection

Boîte de pétri (diamètre en mm)	Quantité d'ADN (µg)	Volume de réactif Exgen	Nombre de cellules par boîte
P35	3	10	200 000
P60	5	15	600 000

➤ Immunofluorescence indirecte

Vingt-neuf heures après transfection, les cellules ayant poussé sur lamelle de verre sont fixées au méthanol pur pendant 6 minutes à -20°C. Après deux lavages au PBS, la membrane plasmique est perméabilisée au PBS-T (PBS-Tween 20 0.1% v/v). Les cellules ainsi fixées et perméabilisées sont ensuite mises à incuber en présence des anticorps primaires anti-CT1 de rat (partie C-terminale) et anti-calnexine ou anti-alpha tubuline dilués dans du PBS-T pendant 60 min TA. Après 3 rinçages de 5 minutes au PBS-T, les cellules sont mises en présence des anticorps secondaires fluorescents adaptés pendant 30 min TA à l'obscurité. Après trois rinçages de 5 min au PBS-T et un rinçage au PBS, les cellules montées entre lame et lamelle à l'aide de Fluorsave® (Calbiochem, Etats-Unis) et observées en microscopie confocale (Leica SPE, Wetzlar, Allemagne). Cinq cents cellules présentant un marquage de la triadine ont été

comptées à partir de trois expériences de transfection indépendantes pour la quantification des différents phénotypes.

Pour les études de marquage des protéines membranaires, les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde dilué à 4% dans du PBS (PFA 4%) pendant 10 min TA. Les cellules sont incubées en présence d'un anticorps de cobaye dirigé contre la partie C-terminale de la triadine CT1 de rat. Les cellules sont ensuite perméabilisées avec de la saponine dilué à 0,05% dans du PBS, puis incubées en présence d'un anticorps de lapin dirigé contre la partie N-terminale de la triadine de rat. Les cellules sont ensuite mises en incubation en présence d'anticorps secondaires dirigés contre les IgG de lapin conjugués à la cyanine 3 et de cobaye conjugué à l'Alexa 488.

Les dilutions utilisées pour les anticorps sont indiqués dans les tableaux 6 et 7.

➤ Etudes d'expression protéique

La concentration des anticorps est indiquée dans les tableaux 6 et 7, le pourcentage de Tween 20 dépend des Anticorps utilisés : 0,1% pour les anticorps purifiés, 0,5 ou 0,3% pour les sérums non purifiés.

- Lyse cellulaire, immunoblot

Après une transfection de 16 à 24 h, les cellules en culture sont rincées deux fois par du PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} puis incubées 5 min à 4°C en présence de RIPA (25 mM Tris pH=7,6, 150 mM NaCl, 1 % NP40, 1% sodium déoxycholate, 0,1% SDS) et d'inhibiteurs de protéases (PMSF 0,2 μM , DFP 1 mM). Le lysat cellulaire est récupéré par grattage puis centrifugé 15 min à 20 000 g 4°C pour éliminer l'ADN et les débris cellulaires. Le surnageant contenant les protéines est transféré dans un autre tube. Les protéines sont ensuite dosées dans le surnageant selon la méthode de Folin. Dix-huit microgrammes de protéines sont déposées sur gel pour électrophorèse et transfert. Les électrophorèses sont réalisées sur gel à 15% de polyacrylamide avec une migration à 150V suivi d'un transfert sur une membrane Immobilon P (Millipore) pendant 2 heures à 0,5 A dans du tampon de transfert (20% méthanol, Tris 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,025%). Les membranes sont saturées 30 minutes dans du tampon de saturation PBS-T, 4% lait. Les membranes sont ensuite incubées sur la nuit à 4°C avec un anticorps primaire de lapin anti triadine de rat (partie N-terminale) dilué dans du tampon de saturation. Après 5 lavages de 5 min par du PBS-T, les membranes sont incubées 3h TA avec les anticorps secondaires anti IgG de lapin couplés à la peroxydase (HRP). Les membranes sont lavées 3 fois 10 min dans du PBS-T puis la révélation est faite avec un substrat chémiluminescent de la peroxydase (Picoluminol, Thermoscientific, Rockford, Etats-Unis).

Dans un deuxième temps, une détection du taux d'alpha tubuline est réalisée pour évaluer le taux de protéines sur la membrane.

- Etude de biotinylation des protéines de surface

Vingt-neuf heures après transfection, les cellules COS-7 sont lavées avec du PBS et les protéines de surface membranaire sont biotinylées en utilisant le réactif sulfo-NHS-SS-biotine (Thermoscientific, Rockford, Etats-Unis) selon les recommandations du fabricant. Après biotinylation, les cellules sont lysées avec du tampon RIPA. Le lysat cellulaire est récupéré par grattage puis centrifugé 15 min à 14 000 rpm 4°C. Le surnageant contenant les protéines est incubé avec des billes d'agarose-streptavidine afin de lier les protéines de la membrane cellulaire biotinylées. Après centrifugation, le culot cellulaire contenant les billes, donc les protéines membranaires, est lavé. Les protéines du surnageant correspondant à la fraction protéique sont précipitées au méthanol-chloroforme (Folch et al., 1951). Chaque fraction protéique est déposée sur gel pour électrophorèse et immunoblot. Dans chacune des fractions, la présence de CT1 (protéine d'intérêt), de la Na⁺/K⁺ ATPase (marqueur de la fraction membranaire), et de CLIMP63 (marqueur de la fraction intracellulaire) est étudiée à l'aide d'anticorps spécifiques. L'expérience de biotinylation a été réalisée deux fois pour contrôler la répétabilité du résultat obtenu.

- Etude de la stabilité de CT1 par réalisation d'une cinétique au cycloheximide.

Le cycloheximide (CHX) est un agent pharmacologique inhibiteur de la synthèse protéique chez les eucaryotes. Vingt heures après transfection, les cellules transfectées ont été rincées avec du PBS sans calcium ni magnésium puis mises dans du milieu sans sérum et traitées avec 50 µg/ml de CHX pendant 0, 30, 60, 90, 180, 360 min. Ensuite, pour chaque temps d'incubation, une détection de la quantité de triadine présente a été réalisée en immunoblot. Brièvement, un traitement au RIPA a permis d'obtenir un lysat cellulaire qui a été centrifugé. Après centrifugation, les protéines du surnageant ont été précipitées au méthanol-chloroforme et l'intégralité du précipitat a été déposé sur gel pour électrophorèse, transfert et révélation des protéines d'intérêt. L'intensité du signal de révélation a été quantifiée à l'aide d'un imageur munie d'une caméra CCD, Chemidoc XRS et d'un logiciel d'analyse d'image Quantity One (Biorad, Hercules, CA, Etats-Unis). Chaque expérience a été réalisée trois fois afin d'obtenir des données suffisantes pour la réalisation d'études statistiques.

- Etude de la dégradation de la protéine CT1 par la voie protéasomale (traitement au MG132)

Le MG132 est une drogue pharmacologique inhibant le protéasome, voie majoritaire de dégradation des protéines cellulaires. Vingt heures après transfection, les cellules transfectées sont traitées pendant 6h avec du MG132 50µM pour inhiber la voie protéasomale ou avec du DMSO 0,2% pour le contrôle. Une analyse ultérieure quantitative en Western blot est réalisée selon la même procédure que pour la cinétique au cycloheximide. Chaque expérience est réalisée trois fois afin d'obtenir des données suffisantes pour la réalisation d'études statistiques.

4. Transduction *in vivo* de CT1 dans des cardiomyocytes de souris KO *TRDN* à l'aide d'AAV2/9 recombinants

L'ensemble des procédures utilisant des animaux a été approuvé par le comité d'éthique institutionnel de l'Institut des Neurosciences de Grenoble et suit les recommandations du guide du conseil national de la recherche pour l'utilisation et la prise en charge des animaux de laboratoire.

➤ Production de virus AAV2/9 recombinant

Dans un premier temps, les cDNA de CT1 de rat sauvage ou mutée p.Thr59Arg sont sous-clonés dans le plasmide pZac2.1. A partir de ce plasmide, les virus AAV2/9 contenant le cDNA de CT1 de rat sauvage, AAV9-CT1^{WT} ou muté Thr59Arg, AAV9-CT1^{T59R} sont produits par la société Penn Vector Core (Philiadelphia, USA). L'ensemble des transgènes utilisés sont sous le contrôle d'un promoteur CMV. Le choix du virus AAV2/9 a été fait en raison du tropisme cardiaque de ce sérotype.

➤ Transduction *in vivo*

Des souris KO *TRDN* préalablement obtenues au laboratoire sur un fond C57B16 ont été utilisées pour les expériences de transduction (Oddoux et al., 2009).

Chaque souris a été anesthésiée avec de la Xylazine (10 µg/g) et de la Ketamine (100 µg/g) afin de réaliser une injection unique dans la veine de la queue contenant $2 \cdot 10^{11}$ copies de génome viral diluées dans 100 µl de 150 mM NaCl. Six souris mâles de deux mois (19-24 g) ont subi une injection de virus AAV2/9 contenant l'ADNc de CT1 de rat sauvage (AAV9-

CT1^{WT}) et six autres souris similaires une injection de virus AAV2/9 contenant le cDNA de T32 de rat muté p.T59R (AAV9-CT1^{T59R}).

Un mois après l'injection de virus AAV9-CT1^{WT} ou AAV9-CT1^{T59R} dans les souris KO *TRDN*, les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale. Le cœur est rapidement prélevé et perfusé de manière rétrograde à 37°C pendant 6 à 8 min avec une solution de Tyrode modifiée (NaCl 113 mM, KCl 4,7 mM, KH₂PO₄ 0,6 mM, Na₂HPO₄ 0,6 mM, MgSO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 12 mM, KHCO₃ 10 mM, HEPES 10 mM, Taurine 30 mM, pH=7,4) contenant de la liberase à 0,1 mg/ml (Roche, France). Les cardiomyocytes isolés ont été ensuite transférés dans la même solution, mais sans enzyme, en présence de 1 mM CaCl₂.

➤ Etude d'expression des transcrits obtenus à partir de cardiomyocytes transduits

Le taux d'ARNm dans les cardiomyocytes des souris transduites avec le virus AAV9-CT1^{WT} ou AAV9-CT1^{T59R} est déterminé par RT-PCR semi-quantitative. Brièvement, l'ARN total est extrait à partir de la préparation de cardiomyocytes isolés en utilisant le réactif TRIzol et le kit PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Le brin complémentaire d'ADNc est synthétisé à partir de 500 ng d'ARN total en utilisant une amorce oligo dT. Une amplification du transcrit CT1 de rat est réalisée à l'aide d'un couple d'amorces spécifiques T32ratF et R, à partir de 5µl d'ADNc pur, ou dilué au 1/10 ou au 1/100. Une amplification PCR du transcrit GAPDH est réalisée comme gène de contrôle à partir de 1µl de cDNA pur, ou dilué au 1/10, ou au 1/100, en utilisant les amorces sens et antisens GAPDHF2 et R2 respectivement. Les produits d'amplification ont ensuite été déposés sur gel d'agarose 2% contenant du Gel Red® (Roche, France) au 1/10 000 (v/v), et visualisé sous ultraviolets. Les amorces du transcrit GAPDH ont été choisies de telle sorte qu'une amplification éventuelle par une contamination d'ADN aurait été vue en produisant un produit PCR de 220 pb, visualisable sur gel le cas échéant. L'analyse a été réalisée à partir de l'ARN extrait de deux souris transduites AAV9-CT1^{WT} et trois souris transduites AAV9-CT1^{T59R}.

➤ Immunofluorescence indirecte

Les cellules sont déposées sur des lamelles recouvertes de laminine, fixées 15 minutes avec de la PFA 4%, perméabilisées 30 minutes dans du PBS-0,5% Triton X100, puis saturées 1h dans du PBS-0,1% Triton X100, 0,5% BSA, 2% sérum de chèvre puis incubées avec les anticorps primaires dirigés contre la partie C-terminale de CT1 de rat et de souris et contre la partie C-terminale du RyR puis secondaires, selon une procédure identique à celle utilisée pour les marquages sur les cellules COS-7.

➤ Immunoblot

Les cardiomyocytes ont été homogénéisés par sonication à 4°C pendant 15 secondes en présence d'inhibiteurs de protéases (1 mM DFP, 200 µM PMSF). Cent microgrammes d'homogénats de cardiomyocytes ont été analysés en western blot quantitatif comme décrit précédemment. Les anticorps secondaires utilisés en western blot étaient marqués avec l'HRP.

5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques réalisées utilisent le test de Student pour l'étude au MG132 et le test de Fisher pour les comptes en IF et l'étude au cycloheximide, en utilisant le logiciel Prism 4.0 (GraphPad, San Diego, Etats-Unis).

Les analyses génétiques couvrant la recherche de mutations chez les patients ont été réalisées au laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire du CHU de Grenoble, à l'exception des mutations citées ci-après. Les mutations p.A2394G, p.F4020L, p.E4076K, p.N4104I, p.G4662S, p.H4762P et p.P4902L du gène *RYR2* ont été identifiées dans l'équipe Inserm U582 de l'Institut de Myologie (Postma et al., 2005), ainsi que les mutations p.R33*, c.546delT du gène *CASQ2* tandis que la mutation c.737+1G>A du gène *CASQ2* a été identifiée dans le département de biologie de l'université de Padova, Italie (Hayashi et al., 2009a; Postma et al., 2002; Roux-Buisson et al., 2011b). Les résultats de *RYR2* ont été inclus dans les résultats présentés pour disposer d'une cohorte homogène de patients, même s'ils ont été réalisés à l'extérieur. Les analyses de *CASQ2* citées ci-dessus ont été poursuivies par la recherche d'une éventuelle seconde mutation au laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire du CHU de Grenoble.

La caractérisation fonctionnelle des mutations d'épissage du gène *CASQ2* et de la mutation p.T59R du gène *TRDN* ont été réalisées au sein de l'équipe 4 de l'unité Inserm U836 de Grenoble. La préparation des cardiomyocytes primaires a été réalisée en collaboration avec l'unité Inserm U1046 de Montpellier. Les études d'immunofluorescence et d'immunoblot à partir des cardiomyocytes primaires ont été réalisées par Marine Cacheux dans le cadre de son doctorat au sein de l'équipe 4 de l'Unité Inserm U836 de Grenoble.

RESULTATS et DISCUSSION

Partie 1. Gènes *RYR2* et *CASQ2*

I. Mutations du gène *RYR2*

1. Taux de mutations identifiées

L'analyse du gène *RYR2* a été réalisée chez 211 probands. Un peu plus de la moitié de la séquence codante du gène *RYR2* a été analysée pour chaque proband (exons 3, 8 à 10, 12 à 15, 17 à 19, 21, 26, 37, 40 à 50, 72, 73, 83, 86 à 105, voir matériels et méthodes). Des mutations du gène *RYR2* sont identifiées chez 75 probands, soit 36 % des individus testés (Tableau 9). Quarante patients étaient de sexe féminin et 35 de sexe masculin. L'âge moyen de survenue des premiers symptômes est de 11 ans (+/- 8 ans). Dans 7 cas, le diagnostic a été évoqué suite au décès du proband dans un contexte évocateur (7/18 cas de MS/ACR). Parmi les 67 patients survivants, le motif de consultation initial était un arrêt cardio-respiratoire récupéré (n=14), un bilan de syncope(s) survenue le plus souvent dans un contexte évocateur (n=33, 5 en nageant), plus rarement à cause de palpitations ou de malaises (n=3). Dans 18 cas, les symptômes n'étaient pas précisés.

Il est à noter que sur les 98 probands adressés par le centre de référence de Paris après un diagnostic établi ou une suspicion forte de TVPC, 50 étaient porteurs de mutations *RYR2*, soit un taux d'identification de mutations *RYR2* de 51%.

Tableau 9. Présentation des mutations de RYR2 identifiées.

Famille	Mutation ADNc	Mutation Protéine	Exon	Réurrence	Domaines I à IV	Néomutation	Transmission	Sexe	Age premiers symptômes	Motif(s)	Circonstances déclenchantes	Examens paracliniques (ECG repos normal)
1	c.494C>A	p.A165D	8	Non	I	Oui	NP	F	NP	MS	NP	NP
2	c.506 G>A	p.R169Q	8	Oui	I	Oui	Sporadique	F	6	Syncope	Effort (natation)	NP
3	c.527G>A	p.R176Q	8	Oui	I		Sporadique	F	16	ACR	NP	NP
4	c.527G>A	p.R176Q	8	Oui	I		AD ou AR	M	NP	Autres	NP	ESV bigémées (Holter / EE)
5	c.570G>T	p.R190S	8	Non	I		AD	M	NP	ACR	NP	NP
6	c.689G>A	p.G230D	10	Non	I		AD	F	NP	NP	NP	NP
7	c.717_719dupACA	p.239_240insQ	10	Non	I	Oui	Sporadique	F	NP	NP	NP	NP
8	c.725A>T	p.D242V	10	Oui (non publié)	I	Oui	NP	M	8	Syncope	effort	NP
9	c.727G>A	p.E243K	10	Oui	I		AD	F	10	Syncope	Effort (natation)	NP
10	c.1237T>A	p.S413T	14	Non	I		AD	M	6	Syncope	Effort (natation)	NP
11	c.1259G>A	p.R420Q	14	Oui	I	Oui	NP	F	NP	ACR	NP	NP
12	c.1258C>T	p.R420W	14	Oui	I		AD	F	NP	ACR	NP	NP
13	c.1258C>T	p.R420W	14	Oui	I		NP	M	NP	ACR	Effort	NP
14	c.1258C>T	p.R420W	14	Oui	I		AD	F	31	MS	NP	NP
15	c.1259G>A	p.R420Q	14	Oui	I		AD	F	NP	NP	NP	NP
16	c.1259G>A	p.R420Q	14	Oui	I		NP	M	NP	NP	NP	NP
17	c.1258C>T	p.R420W	14	Oui	I		AD	M	9	Syncope	Effort	NP
18	c.1258C>T	p.R420W	14	Oui	I		AD	F	NP	Syncope	Emotion	NP
19	c.1258C>T	p.R420W	14	Oui	I		NP	F	NP	Syncope	Effort	Troubles du rythme à l'EE (NP)
20	c.1655C>T	p.S552F	17	Non	HD		NP	M	NP	NP	NP	NP
21	c.5172G>C	p.E1724D	37	E1724K	HD		NP	M	NP	NP	NP	NP
22	c.6649C>T	p.H2217Y	43	Non	HD	Oui	Sporadique	F	6	ACR	Effort (natation)	ESV polymorphes (EE)
23	c.6737C>T	p.S2246L	47	Oui	II	Oui	Sporadique	M	5	Syncope	Effort	NP
24	c.6737C>T	p.S2246L	44	Oui	II	Oui	Sporadique	F	5	Syncope	Effort	NP
25	c.6737C>T	p.S2246L	44	Oui	II		AD	F	NP	ACR	NP	TV bidirectionnelle + FV
26	c.6737 C>T	p.S2246L	44	Oui	II		NP	F	4	MS	NP	NP
27	c.6952A>G	p.N2318H	46	Non	II		AD	F	NP	NP	NP	NP
28	c.7159G>A	p.A2387T	47	Oui	II	Oui	Sporadique	F	7	Syncope	Effort (natation)	NP
29	c.7159G>A	p.A2387T	47	Oui	II	Oui	Sporadique	M	9	Syncope	Effort	NP
30	c.7159G>A	p.A2387T	47	Oui	II		AD	F	NP	ACR	NP	NP
31		p.A2394G	47	Non	II		AD	M	8	ACR	NP	NP
32	c.7202G>A	p.R2401H	47	Oui	II	Oui	Sporadique	M	9	Syncope	Effort (natation)	TV polymorphes (EE)
33	c.7202G>A	p.R2401H	47	Oui	II	Oui*	AD ou AR	F	6	Syncope	Effort	Troubles du rythme à l'EE (NP)
34	c.7205G>A	p.C2402Y	47	Non	II	Oui	Sporadique	M	12	ACR	Effort / Emotion	ESV dimorphes fréquentes (Holter)
35	c.7208C>T	p.A2403V	47	A2403T	II	Oui	Sporadique	M	6	ACR	Effort	NP
36	c.7234G>A	p.G2412R	48	Non	II		NP	M	NP	NP	NP	NP
37	c.7426T>A	p.Y2476N	49	Non	II		AD	M	NP	NP	NP	NP
38	c.7426 T>G	p.Y2476D	49	Non	II		NP	F	NP	NP	NP	NP
39	c.7493C>T	p.A2498V	49	Non	II		Sporadique	M	12	MS	NP	NP

Famille	Mutation ADNc	Mutation Protéine	Exon	Réurrence	Domaines I à IV	Néomutation	Transmission	Sexe	Age premiers symptômes	Motif cs	Circonstances déclenchantes	Examens paracliniques (ECG repos normal)
40	c.11332C>T	p.L3778F	83	Oui	III		AD	F	10	Syncope	Emotion	NP
41	c.11360T>K	p.V3787G	83	Non	III		AD ou AR	F	NP	Syncope	Emotion	ESV dimorphes fréquentes (Holter, EE)
42	c.11395T>C	p.S3799P	83	Non	III	Oui	Sporadique	M	8	Syncope	Effort	NP
43	c.11422T>C	p.F3808L	84	Non	III		AD	F	12	MS	NP	NP
44	c.11836G>A	p.G3946S	88	Oui	III	Oui	Sporadique	F	10	ACR	Effort	NP
45	c.11837G>A	p.G3946D	88	Oui	G3946S, G3946A	Oui	Sporadique	M	3	Syncope	Effort	NP
46	c.11836G>A	p.G3946S	88	Oui	III	Oui*	AD ou AR	M	NP	Syncope	Effort	Troubles du rythme à l'EE (NP)
47	c.11836G>A	p.G3946S	88	Oui	III		Sporadique	F	6	Syncope	Effort / Emotion	NP
48	c.11929G>T	p.D3977Y	89	Non	III		AD	F	14	Syncope	NP	NP
49	c.11969T>A	p.V3990D	90	Non	III		AD ou AR	M	16	NP	NP	NP
50	c.12058T>C	p.F4020L	90	Oui	III	Oui	Sporadique	F	4	MS	Effort	NP
51	c.12060C>G	p.F4020L	90	Oui	III	Oui	AD	M	6	Syncope	Emotion	NP
52	c.12226G>A	p.E4076K	90	Non	III		AD	M	51	Syncope	Effort	NP
53	c.12272C>T	p.A4091V	90	Non	III	Oui	NP	F	8	Syncope	Effort	NP
54	c.12272C>T	p.A4091V	90	Non	III		AD	F	9	ACR	NP	NP
55	c.12272G>T	p.A4091V	90	Non	III		NP	F	NP	NP	NP	NP
56	c.12271G>A	p.A4091T	90	Non	III		Sporadique	M	3	Syncope	Effort / Emotion	NP
57		p.N4104I	90	N4104K	III		AD	M	7	Syncope	Effort	NP
58	c.12372C>G	p.S4124R	90	S4124G, S4124T	III	Oui	Sporadique	M	20	Syncope	NP	NP
59	c.12371G>A	p.S4124N	90	S4124G, S4124T	III		NP	M	NP	NP	NP	NP
60	c.12404G>T	p.R4135L	90	Non	III		AD	M	NP	NP	NP	NP
61	c.12532A>T	p.N4178Y	90	N4178S	III		AD	F	27	Autres	NP	NP
62	c.12901G>A	p.V4301I	90	Non	HD		NP	M	NP	Syncope	NP	NP
63	c.13033G>C	p.D4345H	90	Non	HD		Sporadique	M	14	MS	Effort	NP
64	c.13737 C>A	p.H4579Q	94	Non	IV		NP	M	NP	NP	NP	NP
65		p.G4662S / p.H4762P	99	Non	IV		AD ou AR	M	16	Syncope	Effort	NP
66	c.14174A>G	p.Y4725C	99	Non	IV	Oui	Sporadique	F	7	NP	NP	NP
67	c.14284C>T	p.H4762Y	99	H4762P	IV	Oui	NP	F	4	MS	NP	NP
68	c.14311G>A	p.V4771I	100	Oui	IV	Oui	Sporadique	F	12	ACR	Effort	NP
69	c.14311G>A	p.V4771I	100	Oui	IV	Oui	Sporadique	M	8	Syncope	Effort	NP
70	c.14311G>A	p.V4771I	100	Oui	IV		NP	M	NP	NP	NP	Troubles du rythme à l'EE (NP)
71	c.14311G>A	p.V4771I	100	Oui	IV		AD ou AR	F	12	Syncope	Effort	NP
72	c.14553C>A	p.F4851L	101	F4851C	IV	Oui	Sporadique	F	15	Autres	NP	NP
73	c.14666T>C	p.F4889S	103	Non	IV	Oui	NP	F	NP	NP	NP	NP
74	c.14705C>T	p.P4902L	103	Oui	IV	Oui	Sporadique	F	15	Syncope	Effort	ESV polymorphes isolées puis doublets (EE)
75		p.P4902L	103	Oui	IV		AD	F	12	Syncope	Effort	

Abbreviations : NP pour non précisé / Domaines correspondant aux points chauds de mutations : I, II, III, IV et HD pour hors domaine / Transmission : AD pour Autosomique Dominant et AR pour Autosomique Récessif. Il est indiqué AD ou AR lorsque plusieurs membres d'une fratrie sont atteints mais aucun parent, ce qui peut être lié à une transmission AR, ou une transmission AD à pénétrance réduite, ou une mosaïque. / Motif cs pour motif de consultation / ACR pour arrêt cardio-respiratoire / MS pour mort subite-décès post-ACR / Examen paraclinique : EE pour épreuve d'effort, ESV pour Extrasystoles ventriculaires.

2. Nature et topologie des mutations

Au total, soixante-trois mutations différentes de *RYR2* ont été identifiées (Figure 35 et tableau 8).

La très grande majorité est constituée de mutations faux-sens (62/63). Une duplication de trois nucléotides, c.717_719dupACA, a été retrouvée chez une patiente (proband, fam 7*). Un patient s'est révélé porteur de deux mutations faux-sens à l'état hétérozygote composite (proband, fam 65, (Postma et al., 2005)).

La grande majorité des mutations sont des mutations privées. Cependant, 15 mutations ont été retrouvées de manière récurrente. Parmi ces 15 mutations, 11 sont survenues *de novo*, indiquant qu'il ne s'agit pas d'un allèle fondateur mais d'une mutation survenant de manière préférentielle.

Les mutations sont retrouvées principalement (93%) dans les 4 domaines de points chauds de mutations analysés avec une répartition relativement homogène entre les domaines :

- 25 % dans le domaine I (19/76)
- 22 % dans le domaine II (17/76)
- 29 % dans le domaine III (22/76)
- 17 % dans le domaine IV (13/76)

Cinq mutations sont situées en dehors de ces domaines. Trois mutations, p.S552F, p.E1724K et p.H2217Y, sont situées dans des régions conservées. La mutation p.H2217Y est survenue chez le proband étudié, ce qui est très en faveur de son implication probable dans la pathologie (mutation *de novo*, proband, fam 22). La mutation p.E1724K a déjà été publiée (Postma et al., 2005), observation en faveur de l'importance de l'acide glutamique à cette place. Toutefois, la pénétrance de la mutation p.E1724D est incomplète puisque la mère du proband est porteuse asymptomatique de la variation (fam 21). Aucune étude familiale n'a pu être réalisée pour le variant p.S552F. Les mutations p.V4301I et p.D4345H sont situées dans la région de divergence DR1. En l'absence d'étude familiale, la nature causale des variants p.S552F, p.V4301I et p.D4345H ne paraît pas évidente.

Enfin, la variation p.A2498V (fam 39), identifiée en 2005 a été retenue initialement comme potentiellement pathogène car elle était située dans un domaine connu de mutations (domaine II) et que l'alanine en position 2498 était conservée dans l'évolution (RyR1 et RyR3 humains, RyR2 des mammifères). Il semble maintenant qu'il puisse s'agir d'un polymorphisme rare

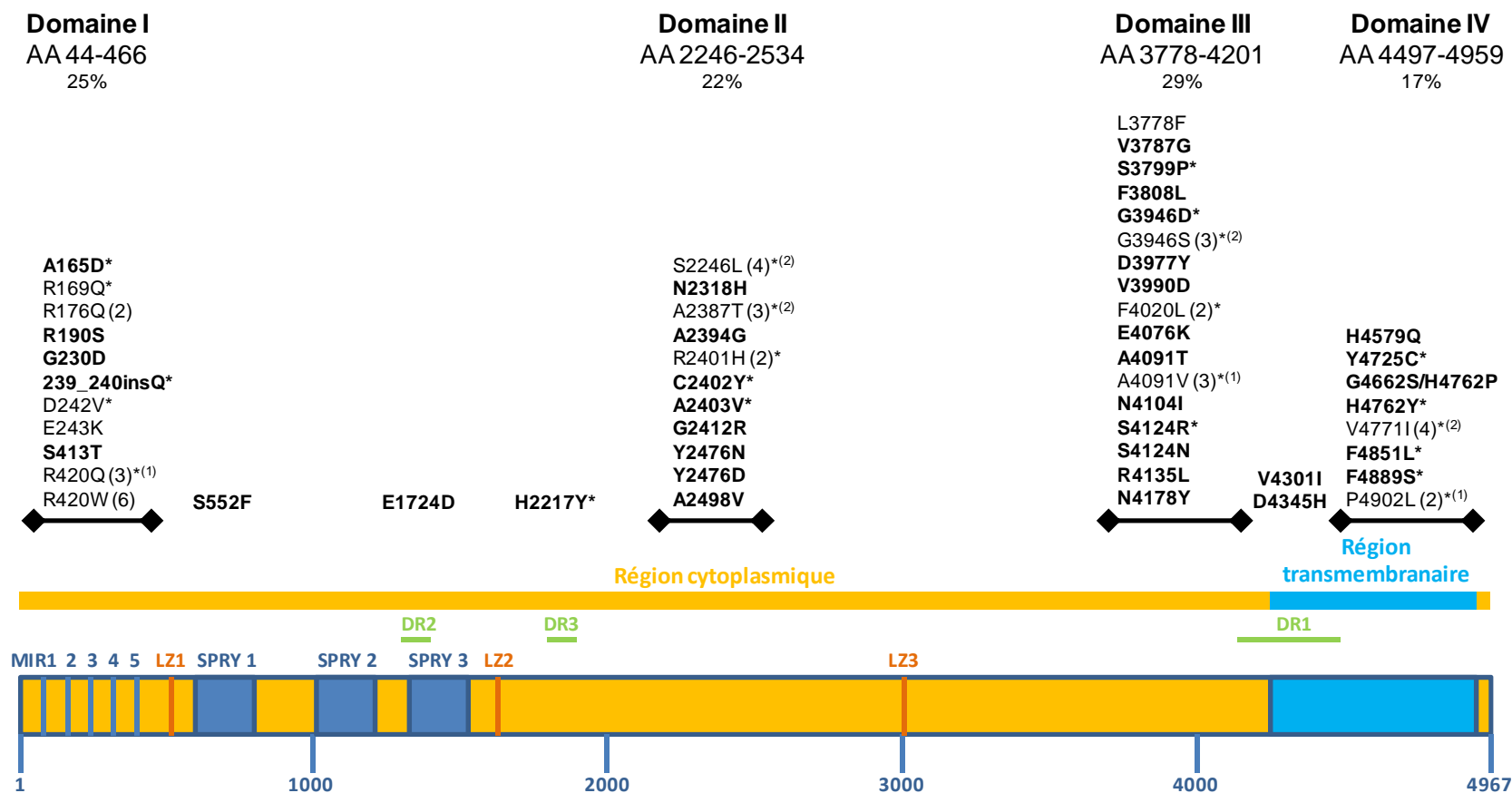
* Fam est utilisée comme abréviation de famille.

puisque la variation a été retrouvée deux fois sur 9738 allèles dans la base Exome Variant Server. De plus, la variation a été retrouvée chez le frère et la mère du proband qui sont asymptomatiques.

Aucune autre variation identifiée présentée ici n'a été retrouvée parmi les bases de données de variants récentes.

Parmi les 76 mutations identifiées, 27 sont survenues *de novo* chez le proband et 2 cas de mosaïcisme maternel ont été mis en évidence (fam 33 et 46), ce qui constitue un taux de néomutations de 38 %.

Figure 35. Répartition des mutations sur la protéine.



La grande barre horizontale jaune et bleue constitue une représentation linéaire de la séquence primaire de RyR2 avec les AA figurés en bas en bleu (1 à 4967). Au dessus sont marqués les domaines répétés MIR 1 à 5, LZ 1 à 3 et SPRY 1 à 3 ainsi que les régions de divergence DR1 à 3. Les mutations identifiées sont groupées par domaines de points chauds de mutations I, II, III et IV. Les mutations en gras sont des mutations privées, celles écrites en police fine sont récurrentes (le nombre qui suit indique le nombre de fois où elles ont été identifiées dans les résultats présentés ici). Les mutations identifiées *de novo* sont figurées par un astérisque (le nombre de fois où elles sont identifiées *de novo* est indiqué en exposant). Les mutations p.A2394G, p.F4020L, p.E4076K, p.N4104I, p.G4662S, p.H4762P et p.P4902L du gène *RYR2* ont été identifiées indépendamment de ce travail dans l'équipe Inserm U582 de l'Institut de Myologie et publiées (Postma et al., 2005). Les mutations p.D242V, p.E243K, p.S413T, p.R420W, p.H2217Y, p.S2246L, p.A2387T, p.A2394G, p.R2401H, p.C2402Y, p.A2498V, p.L3778F, p.S3799P, p.G3946D, p.G3946S, p.D3977Y, p.V3990D, p.F4020L, p.E4076K, p.A4091T, p.A4091V, p.N4104I, p.N4178Y, p.V4771I, p.F4851L et p.P4902S présentées ici ont également déjà été publiées (Hayashi et al., 2009a). Les mutations p.A165D, p.R190S, p.G230D, p.239_240insQ*, p.S552F, p.E1724D, p.N2318H, p.A2403V, p.G2412R, p.Y2476N, p.Y2476D, p.V3787G, p.F3808L, p.S4124R, p.S4124N, p.R4135L, p.V4301I, p.D4345H, p.H4576Q, p.Y4725C, p.H4762Y et p.F4889S ne sont pas publiées.

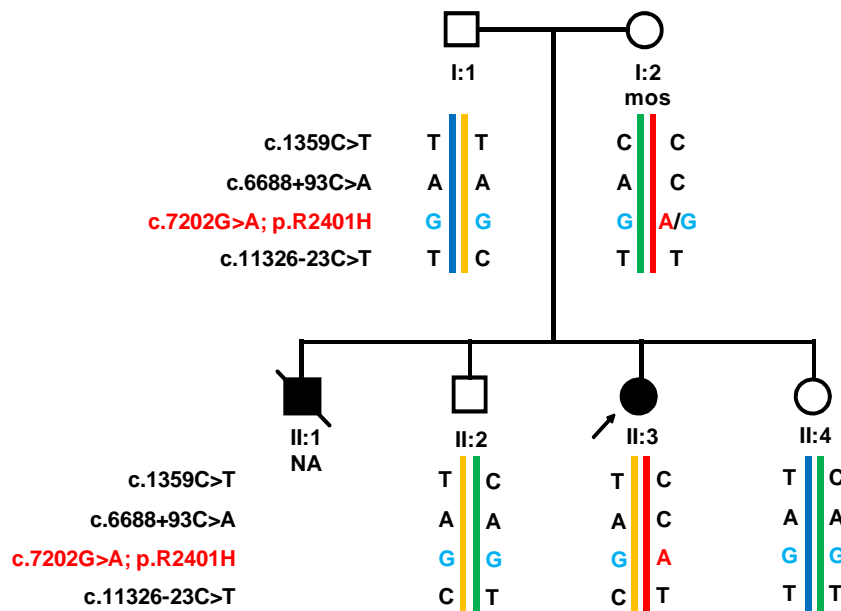
3. Mosaïques germinales

L'existence d'une mosaïque germinale et somatique a été mise en évidence dans deux familles.

➤ Mosaïque c.7202G>A; p.R2401H

Dans la première famille (fam 33), le proband était une jeune fille (ind II:3^{*}), chez laquelle le diagnostic de TVPC a été retenu suite à des syncopes récurrentes depuis l'âge de 7 ans, et la mise en évidence de troubles du rythme ventriculaire à l'épreuve d'effort. Les salves de tachycardies ventriculaires, initialement supprimées par le nadolol, ont récidivé à 13 ans malgré l'augmentation de la posologie. Un défibrillateur implantable a alors été mis en place. Une TVPC était également fortement suspectée chez son frère cadet (ind II:1) ayant présenté une mort subite à l'effort à l'âge de 10 ans. Tous les autres membres de la famille étaient asymptomatiques, sans anomalie du rythme cardiaque décelée à l'ECG de repos, ni à l'épreuve d'effort (Figure 36).

Figure 36. Arbre généalogique de la famille 33.

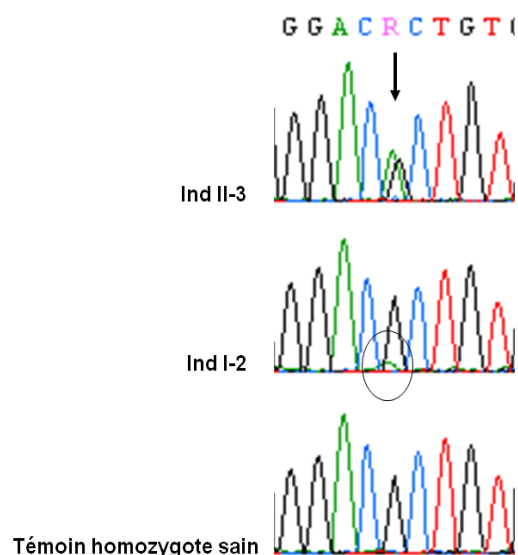


Les symboles plein noirs représentent les individus atteints, la flèche le proband, la barre un individu décédé, les symboles blancs les individus asymptomatiques. Les SNPs c.1359C>T, c.6688+93C>A et c.11326-23C>T ont été analysés pour l'haplotypage. La mutation est figurée en rouge. mos désigne la mosaïque.

* Ind est utilisé comme abréviation d'individu.

L'analyse du gène *RYR2* réalisée chez le proband a mis en évidence une mutation hétérozygote c.7202G>A; p.R2401H (Figure 36). Il s'agit d'une mutation récurrente observée 2 fois dans notre étude et déjà publiée (Aizawa et al., 2005). La mutation n'a pas été retrouvée chez le père et la fratrie survivante du proband (ind I:1, II:2 et II:4). Au niveau de l'ADN leucocytaire maternel (ind I:2), le séquençage de la région d'intérêt suggérait la présence d'une mosaïque somatique, car il existait un signal correspondant à la présence d'une adénine en position c.7202, en plus de la guanine de référence. L'intensité du signal était cependant si faible que la possibilité d'un signal lié à un artefact technique ne pouvait être éliminée (Figure 37).

Figure 37. Séquençage de la position c.7202 du gène *RYR2* chez le proband, sa mère et un individu homozygote sain.

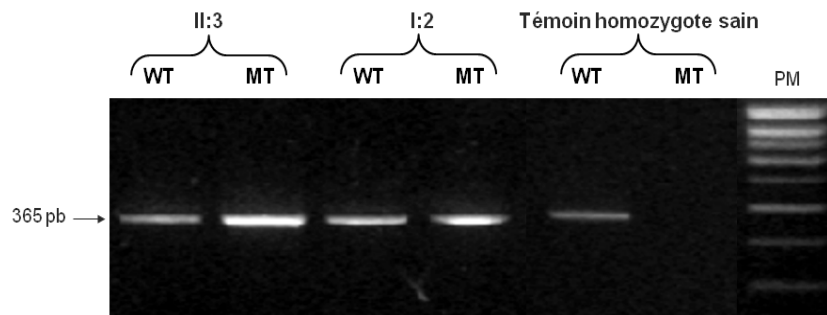


La flèche indique la mutation G>A en position c.7202 au niveau de l'ADN du proband (II:3) et de sa mère (I:2). Le cercle entoure l'adénine, correspondant à la mosaïque dans l'ADN maternel.

Nous avons mis en évidence l'existence de l'allèle muté c.7202G>A dans l'ADN maternel à l'aide d'une amplification PCR allèle spécifique (Figure 38, panneau a). Nous avons ensuite estimé le niveau de mosaïcisme entre 10 et 25 % dans différents tissus de la patiente (leucocytes, cellules buccales, cellules urinaires) par HRM semi-quantitative (Figure 38, panneau b). Un haplotypage à l'aide de SNPs intragéniques n'a pas permis de démontrer la mosaïque germinale (Figure 36, SNPs : c.1359C>T, c.6688+93C>A, c.11326-23C>T).

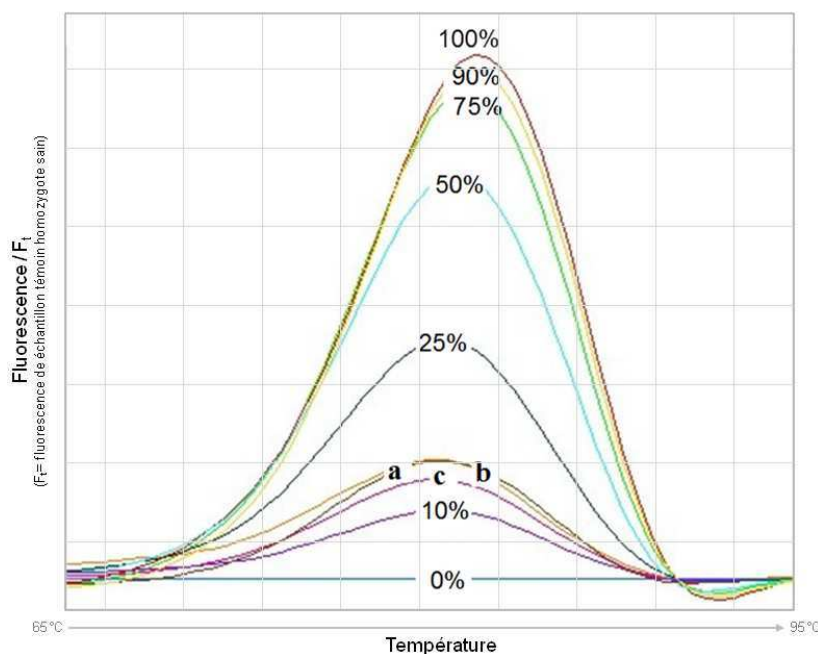
Figure 38. Mise en évidence de la présence de l'allèle muté c.7202A dans l'ADN leucocytaire maternel.

a. PCR allèle spécifique



La PCR allèle spécifique (ARMS-PCR) à l'aide d'amorces anti-sens spécifiques de l'allèle sain (WT) ou muté (MT) confirme la mosaïque somatique dans l'ADN leucocytaire maternel (I:2). Les amorces ont été conçues pour amplifier un produit PCR de 365 pb (flèche). Les lignes WT correspondent au dépôt réalisé après amplification en utilisant l'amorce anti-sens spécifique de la séquence sauvage, et les lignes MT l'amorce anti-sens spécifique de la séquence mutée. Pour le proband hétérozygote pour la mutation (ind II:3), les deux réactions ont permis une amplification d'un produit de 365 pb, témoignant de l'existence de l'allèle muté et de l'allèle sain dans l'ADN. Pour la mère du proband, le même résultat est observé. Pour le témoin homozygote sain, seule la PCR réalisée en utilisant l'amorce spécifique de l'allèle sain a permis une amplification de l'ADN, témoignant de la spécificité de la réaction d'amplification utilisant l'amorce spécifique de l'allèle mutée.

b. Estimation du taux de mosaïcisme de la mutation c.7202G>A chez l'individu I:2 par HRM semi-quantitative.



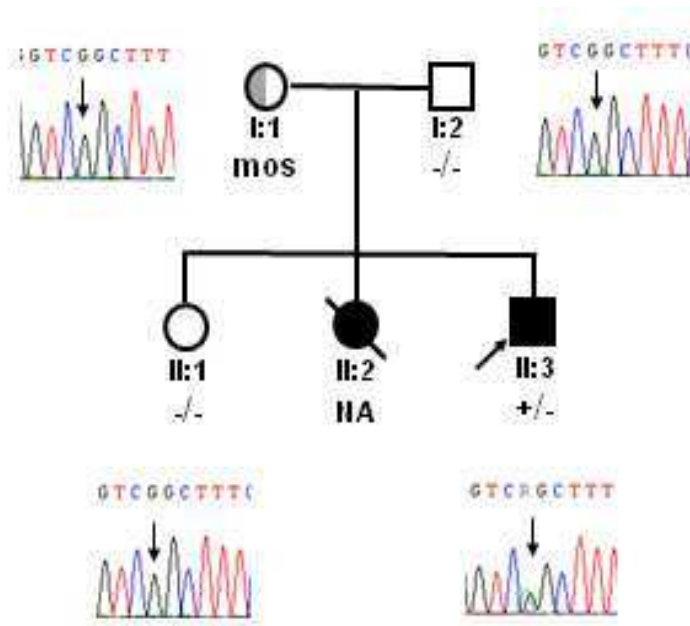
Le taux de mosaïcisme en courbe de fusion haute résolution (HRM) a été évaluée entre 10 et 25% dans les leucocytes (a), les cellules buccales (b) et urinaires (c) de l'individu I:2. Les profils HRM à partir de l'ADN de l'ind I:2 sont comparés aux profils obtenus à partir des dilutions indiquées d'ADN muté (proband) afin de réaliser une estimation semi-quantitative du taux de mosaïque. Les dilutions ont été réalisées à partir de l'ADN muté c.7202G>A (proband hétérozygote pour la mutation) et d'un ADN homozygote sain servant de 0.0% correspond à l'ADN témoin pur, 100% à l'ADN du proband pur (soit 100% de cellules hétérozygotes pour la mutation étudiée), 90% à 90% d'ADN du proband mélangé à 10% d'ADN témoin et ainsi de suite.

Au final, l'existence d'une mosaïque somatique associée à l'existence de deux enfants présentant un phénotype de TVPC ont permis de retenir l'existence d'une mosaïque germinale hautement probable chez la mère du proband.

➤ Mosaïque c.11836G>A; p.G3946S

Dans la deuxième famille (fam 46), le proband (ind II:3) était un enfant de 9 ans présentant une histoire proche de celle qui vient d'être présentée (Figure 39). Le diagnostic de TVPC a été retenu suite à des syncopes récurrentes à l'effort, et la mise en évidence de troubles du rythme ventriculaire à l'épreuve d'effort. La mise en place d'un traitement par le nadolol a permis de prévenir efficacement la survenue des syncopes. Une TVPC était également suspectée chez la plus jeune de ses sœurs, décédée subitement à 10 ans (ind II:2). Par ailleurs, l'enquête familiale avait permis de mettre en évidence des troubles du rythme évocateurs de TVPC chez la mère du proband, pour laquelle a été débutée un traitement β -bloquants (ind I:1).

Figure 39. arbre généalogique de la famille 46.

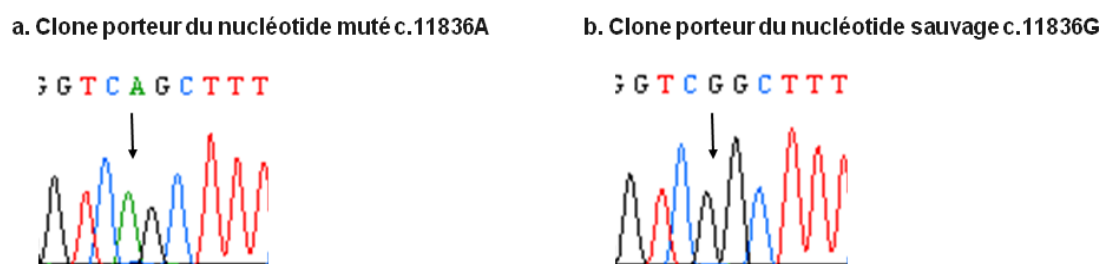


La flèche indique le proband. Les symboles pleins les individus atteints, le demi-rond gris un individu asymptomatique avec des arythmies provoquées lors de l'épreuve d'effort, les symboles blancs les individus asymptomatiques. La barre précise que le patient est décédé. Les électrophorégrammes obtenus à partir de l'ADN leucocytaire de chaque patient testé est montré avec le nucléotide c.11836 marqué par la flèche (vert = adénine).

Une variation hétérozygote, c.11836G>A; p.G3946S, située dans l'exon 88 du gène *RYR2* a été identifiée chez le proband (Figure 39). Il s'agit d'une mutation récurrente située dans une

région très conservée de la protéine (Priori et al., 2002). L'analyse familiale n'a pas permis de retrouver la mutation parmi les individus analysés par PCR-séquençage, en particulier chez la mère du proband (ind I:1). L'ADN de l'enfant décédée n'a malheureusement pas pu être obtenu (ind II:2). L'absence de mutation décelable en PCR-séquençage chez la mère du proband et la suspicion de plusieurs cas de TVPC dans la fratrie nous ont fait évoquer la possibilité d'une mosaïque maternelle. Nous avons mis en évidence l'existence de l'allèle muté c.11836G>A par clonage et séquençage des amplicons de l'exon 88 obtenus à partir de l'ADN leucocytaire de la patiente (ind I:1). Le séquençage de 72 clones a permis de mettre en évidence 2 clones porteurs de la mutation c.11836A (Figure 40). La mise en évidence d'une mosaïque somatique et l'histoire familiale étaient très en faveur de l'existence d'un mosaïcisme germlinal associé.

Figure 40. Electrophorégrammes des clones obtenus à partir du produit PCR de l'ADN leucocytaire de la patiente I:1.



Le séquençage des produits de clonage des amplicons PCR obtenus à partir de l'ADN leucocytaire maternel (ind I:1) met en évidence la mosaïque somatique. L'exon 88 de RYR2 a été amplifié à partir de l'ADN leucocytaire maternel par PCR. Les produits PCR ont ensuite été clonés dans PCR2.1 et 72 clones ont été séquencés. La séquence de gauche montre une séquence obtenue à partir d'un clone porteur de la mutation c.11836G>A et à droite une séquence sauvage.

Au total, les cas de mosaïque du gène *RYR2* restent rares. Un cas de mosaïque pour une mutation p.Y4149S a déjà été publié chez la mère d'un proband (Medeiros-Domingo et al. 2009). Dans le cas publié et celui de la famille 33, le taux de mosaïque est évalué dans les différents tissus testés entre 10 et 25% (leucocytes, cheveux, fibroblastes, cellules buccales et urinaires). Dans la famille 46, le taux de mosaïcisme n'a pas été quantifié même s'il apparaît faible (2 clones mutés sur 72). Il est intéressant de noter qu'il s'agit du seul cas où la mosaïque somatique est associée à des arythmies à l'épreuve d'effort chez la patiente.

4. Discussion

A l'heure actuelle, le taux d'identification de mutations du gène *RYR2* dans la TVPC atteint 65% parmi les patients chez lesquels a été objectivée une tachycardie ventriculaire

bidirectionnelle et descend à moins de 15% dans les tableaux moins typiques (Ackerman et al., 2011). Dans notre étude, le taux d'identification de mutations est intermédiaire à 36%.

On notera plusieurs notions :

- La pénétrance des mutations de *RYR2* dans les TVPC est incomplète. Elle est estimée à 80% dans la littérature. Ceci complique l'interprétation du caractère causal de la mutation. Ainsi l'existence d'individus asymptomatiques porteurs de la mutation familiale ne signe pas obligatoirement l'absence de pathogénicité de la variation. Dans notre étude, nous avons deux familles pour lesquelles une pénétrance incomplète de la variation identifiée chez le proband a été mise en évidence. Pour la famille 21, la mère du proband est porteuse asymptomatique de la variation p.E1724D. Pour la famille 39, la mère et le frère du proband sont porteurs asymptomatiques de la variation faux-sens p.A2498V. Pour rappel, il semble que la variation p.A2498V soit un polymorphisme rare ce qui expliquerait le défaut de ségrégation de la maladie avec la variation. Ce polymorphisme ne semble donc pas impliqué dans la pathologie. Il est cependant possible de spéculer que certains polymorphismes rares soient impliqués dans des haplotypes à risque pouvant être associés à la pathologie, ou qu'ils constituent en fait des mutations récessives qui seraient associées à la maladie selon une transmission autosomique récessive. C'est ce qui a été proposé pour l'association à l'état hétérozygote composite des SNPs p.G1885E et p.G1886S possiblement impliquée dans la CVDA (Cardiomyopathie Ventriculaire Droite Arythmogène, (Milting et al., 2006)).
- Il existe quelques cas de doubles mutations de *RYR2* décrits dans les TVPC. Pour un cas, les mutations p.G4662S et p.H4762P sont portées à l'état hétérozygote composite chez le proband et seul le proband était symptomatique (Fam 65, (Postma et al., 2005)). Pour un second cas, la position en cis ou en trans des deux mutations p.R2359Q et p.F4851C n'a pu être déterminée car seul le proband a été analysé mais l'histoire familiale témoigne d'une transmission autosomique dominante de la maladie (Aizawa et al., 2007). Enfin, il existe un cas de doubles mutations p.R176Q et p.T2504M en cis, associées à une transmission autosomique de CVDA (Tiso et al., 2001). On notera que les mutations p.R176Q, p.H4762Y et p.F4851L ont été identifiées de manière isolée dans des cas de TVPC dans notre cohorte (Fam 3, 4, 67 et 72). On ne peut écarter dans certains cas, qu'une des deux mutations

puisse être un polymorphisme rare, non causal. Ces observations justifient la réalisation d'une analyse la plus étendue possible du gène même lorsqu'une première mutation a été identifiée. On notera par ailleurs l'existence de chevauchement phénotypique avec la CVDA, même pour une mutation donnée.

- Le taux de mutations survenant *de novo* est élevé puisqu'évalué entre 19 % et 38 % (George et al., 2007), résultats de notre étude)). Ce taux peut s'expliquer par la sévérité de la maladie. En absence de traitement, près de la moitié des patients décèdent en effet avant l'âge de 40 ans. D'une part, l'identification d'une néomutation est un caractère fort en faveur du caractère délétère d'une variation faux-sens qui aide à l'interprétation du diagnostic de biologie moléculaire. D'autre part, celle-ci restreint l'étude familiale et le risque potentiel de la pathologie aux apparentés du premier degré et à leurs descendants.
- L'existence de mosaïcismes germinaux et somatiques, même rares, justifient la recherche de la mutation familiale de manière systématique dans la fratrie du proband. Lorsque la mutation identifiée chez le proband n'est pas détectée chez ses parents par des méthodes classiques de diagnostic moléculaire (PCR-séquençage, dHPLC, HRM...), le plus probable est que la mutation identifiée soit une mutation survenue *de novo* chez le proband. Toutefois, la possibilité d'une mosaïque germinale chez l'un des parents du proband, constitue un risque potentiel de TVPC dans la fratrie du proband. Si la mutation survient très tôt dans le développement de l'embryon, la mosaïque sera germinale et somatique. Dans ce cas, il existera également un risque chez le patient porteur du mosaïcisme, risque dépendant du taux de cellules porteuses de la mutation dans le tissu cardiaque.
- La nature faux-sens des mutations rend difficile l'interprétation du caractère bénin ou délétère d'une variation identifiée chez un proband pour la première fois (Wilde and Ackerman, 2010). Compte-tenu du développement des techniques de séquençage haut-débit, il va devenir possible d'analyser l'ensemble des régions codantes de *RYR2* en routine. Le nombre de variants non répertoriés va inéluctablement augmenter et la mise en place d'outils d'étude fonctionnelle apparaît nécessaire dans les perspectives de validation de leur caractère délétère. Deux approches séquentielles pourraient être

envisageables : 1) l'étude de la mutation identifiée dans un système artificiel par clonage, expression de la protéine RyR2 sauvage ou mutée et analyse de la fonction canalaire en imagerie calcique, 2) l'étude de la fonction de RyR2 dans les cellules du patient à l'aide d'IPS (Induced Pluripotent Stem Cells) différenciées en cardiomyocytes. Les études à l'aide d'IPS obtenues à partir de patients porteurs de mutations permettent d'étudier les mécanismes physiopathologiques associés à la mutation et offrent un excellent modèle pour cribler des cibles thérapeutiques potentielles (Jung et al., 2011).

Une des implications principales de l'analyse génétique de *RYR2* est la possibilité de diagnostic présymptomatique chez les apparentés du proband après que la mutation causale a été identifiée.

Il apparaît intéressant par la suite d'établir des corrélations phénotype-génotype qui constituent le premier pas vers des éléments pronostiques ou de stratification du risque d'arythmies pouvant aider à une décision thérapeutique (par exemple, arguments de mise en place d'un défibrillateur implantable ou non).

Nous avons regardé plusieurs paramètres qui ont mis en évidence l'intérêt de disposer d'un nombre important de cas bien renseignés.

Les deux questions que nous nous sommes posés étaient les suivantes :

1. Une néomutation est elle plus sévère qu'une mutation héritée ?
2. Existe-t-il une corrélation entre la sévérité du phénotype observé et la région de la mutation ?

En nous basant entre autres sur les données de la littérature, nous avons défini initialement trois arguments de sévérité :

- l'âge de survenue des premiers symptômes,
- la survenue d'un ACR ou le décès par mort subite du proband,
- la résistance des symptômes aux β -bloquants (syncopes, ACR, mort subite).

Compte-tenu du manque de données cliniques dont nous disposions, nous n'avons pas pu retenir la résistance aux β -bloquants, comme argument dans l'analyse. Cette notion était indiquée pour un seul patient sur 75 (proband, fam 33), alors que la prévalence décrite dans la littérature avoisine 30 % (Priori et al., 2002).

Nous avons donc regardé l'âge moyen de survenue des premiers symptômes et la proportion de morts subites ou ACR par rapport à d'autres symptômes selon que la mutation soit survenue *de novo* chez le proband ou non, et en fonction du domaine de la protéine (I, II, III,

IV) où se situe la mutation. Malheureusement, compte-tenu de la petite taille des sous-groupes analysés et du nombre de données manquantes, nous n'avons pu mettre en évidence aucune corrélation significative pour ces questions (Tableaux 10 et 11, pour information).

Tableau 10. Age de survenue des premiers symptômes et motif de la consultation initiale selon le caractère *de novo* ou non de la mutation.

Mutation <i>de novo</i> certaine	Age survenue symptômes	Motif consultation initiale				
		MS	ACR	Syncopes	Autre	Non précisé
Oui (n=29)	8,29 (n=24)	3	6	16	1	3
Non (n=46)	13,86 (n=21)	5	8	16	2	15

MS : mort subite / ACR : arrêt cardio-respiratoire

Tableau 11. Age de survenue des premiers symptômes et motif de la consultation initiale selon la topographie de la mutation.

Domaine	Age survenue symptômes	Motif consultation initiale				
		MS	ACR	Syncopes	Autre	Non précisé
I (n=19)	12,29 (n=7)	2	5	7	1	4
II (n=17)	7,54 (n=11)	2	5	6	0	4
III (n=22)	12,59 (n=17)	2	2	13	1	4
IV (n=12)	11,22 (n=9)	1	1	5	1	4

MS : mort subite / ACR : arrêt cardio-respiratoire

- Enfin, il est connu que l'épreuve d'effort ne permet pas la détection de l'ensemble des individus porteurs d'une mutation familiale et que sa normalité ne présage pas d'une absence du risque d'arythmies. Il serait ainsi intéressant de caractériser des mutations pour lesquelles une susceptibilité aux arythmies dans un contexte adrénurgique est plus marquée que pour d'autres. On peut ainsi se demander si les mutations localisées dans le domaine II qui comprend la région d'interaction RyR2-FKBP12.6, n'entraîneraient elles pas des troubles du rythme survenant électivement dans un contexte de stress adrénurgique (épreuve d'effort positive) alors que ce ne serait pas le cas pour celles localisées au niveau d'autres domaines (épreuve d'effort potentiellement négative).

En conclusion, l'ensemble de ce travail a permis d'identifier 23 nouvelles mutations du gène *RYR2* associées à un phénotype de TVPC (Légende figure 35, p 115) et la mise en évidence d'un taux élevé de néomutation. En l'état actuel, les études de corrélation phénotype-génotype apparaissent encore délicates compte-tenu de la taille de notre cohorte. Il apparaît donc nécessaire de poursuivre ce travail en continuant la rentrée des données cliniques, l'inclusion de nouveaux patients et la mise en place d'outils d'étude fonctionnelle des mutations.

II. Mutations du gène *CASQ2*

1. Présentation clinique

Des mutations du gène *CASQ2* ont été recherchées chez 139 individus de cette étude parmi les 214 probands inclus. L'analyse a été faite en seconde intention pour 136 patients pour lesquels aucune mutation de *RYR2* n'avait été trouvée, et en première intention chez 3 patients pour lesquels une notion de consanguinité était connue. Des mutations ont été identifiées chez onze probands (5,1%) : les trois probands avec un contexte familial de consanguinité et huit patients parmi les 136 sans mutation *RYR2* identifiée (Figure 41).

Chez ces 11 individus, l'âge de survenue des premiers symptômes se situe entre 4 et 20 ans (âge moyen : 9 ans, tableau 12). Dans un cas, le diagnostic a été évoqué après le décès proband à 4 ans dans les suites d'un ACR survenu dans un contexte de stress émotionnel (ind II:3, fam 1). Dans 3 cas, le motif de consultation initial était un arrêt cardiaque. Pour les autres patients, le diagnostic a été évoqué suite à des syncopes ou des convulsions à l'effort ou à l'émotion. Chez un patient, la présentation clinique était moins évocatrice, avec la description de malaises et de palpitations à l'effort et à l'émotion (proband, fam 86). Des antécédents familiaux de mort subite dans la fratrie sont présents dans quatre familles (Figure 41).

Une mutation homozygote est présente chez chacun des probands analysés dans un contexte familial de consanguinité (fam 76, 77 et 78). Pour les huit autres patients, cinq sont porteurs de deux mutations hétérozygotes composites, un d'une mutation homozygote et deux ne sont porteurs que d'une seule mutation hétérozygote (fam 85 et 86). Pour l'un d'eux, une variation intronique profonde hétérozygote non répertoriée a été identifiée (tableau 11, fam 85).

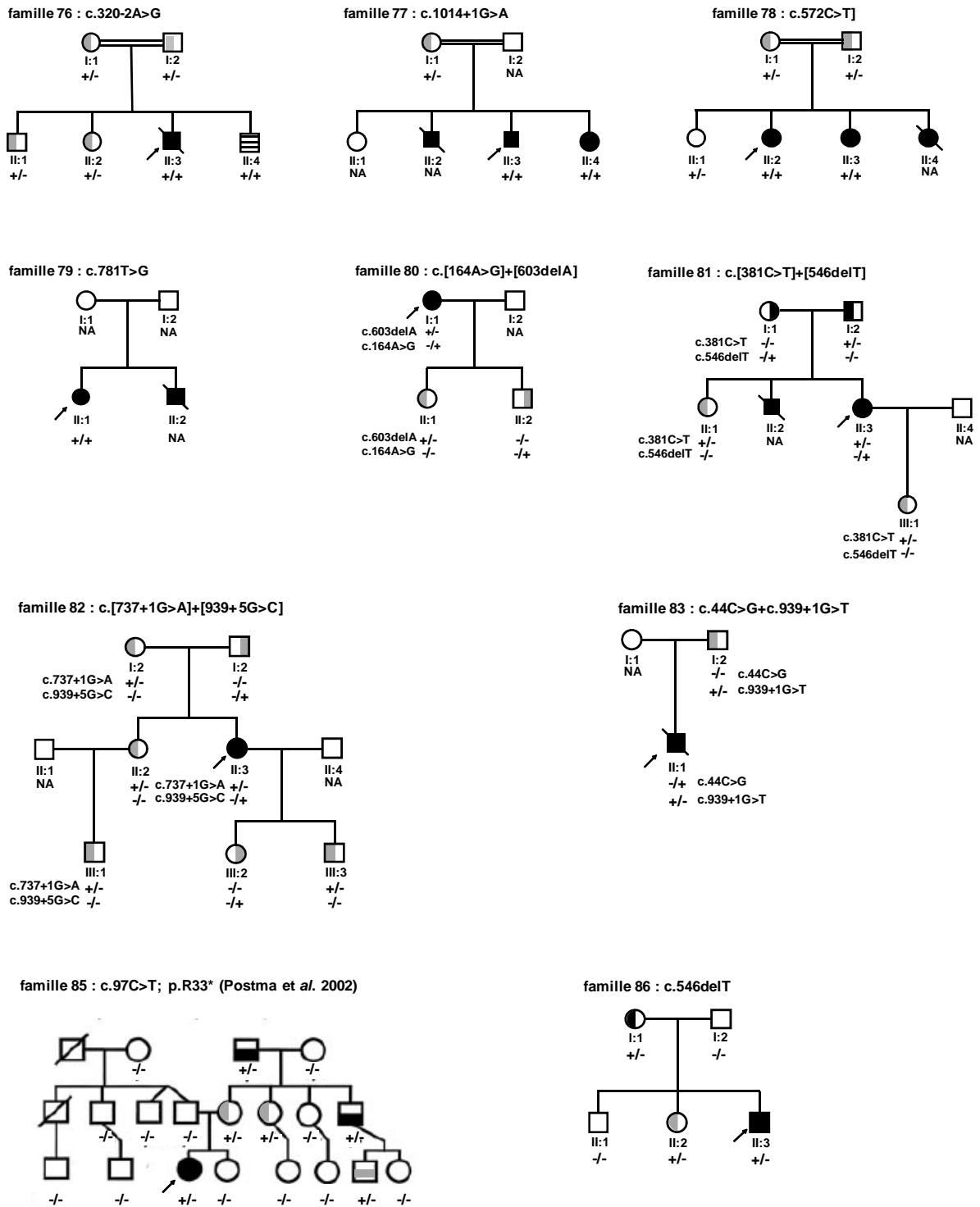
Si nous restreignons notre analyse aux familles où les probands présentent 2 allèles mutés (9/11), l'âge moyen de survenue des premiers symptômes est 8 ans, un individu est décédé des suites d'un ACR, 3 probands ont présenté un arrêt cardiaque et des antécédents familiaux de mort subite sont connus dans près de la moitié des cas (44%).

Tableau 12. Résumé des données cliniques et présentation des mutations du gène *CASQ2* identifiées chez onze probands.

Famille	Mutations identifiées cDNA	Mutations identifiées protéines	Premiers symptômes (age)	Symptômes	Traitement	Contexte familial de mort subite (MS) / Cas sporadique	Union entre apparentés	Origine géographique
76	c.320-2A>G homozygote	Altération de l'épissage	4	Décès par arrêt cardiaque à l'émotion		Cas sporadique	Oui	Turquie
77	c.1014+1G>A homozygote	Altération de l'épissage	7	Syncopes et convulsions à l'effort	Nadolol + ICD	Frère MS à 11 ans	Oui	Algérie
78	c.572C>T homozygote	p.Pro191Leu	<15	Non précisé	β-bloquants	Sœur MS à 16 ans	Oui	Tunisie
79	c.781T>G homozygote	p.Trp261Gly	9	Syncopes à l'effort Arrêt cardiaque	Métoprolol + ICD	Frère MS à 13 ans	Non	Turquie
80	[c.164A>G]+[c.603delA]	[p.Tyr55Cys]+ [p.Val203LeufsX209]	3	Syncopes et convulsions à l'effort et à l'émotion	Nadolol	Cas sporadique	Non	Europe
81	[c.381C>T]+[c.546delT]	Altération de l'épissage + p.Phe182LeufsX209	10	Syncopes à l'effort et à l'émotion	Nadolol + ICD	Frère MS à 4 ans	Non	Europe
82	[c.737+1G>A]+[c.939+5G>C]	Altération de l'épissage	7	Syncopes Arrêt cardiaque	ICD + ?	Cas sporadique	Non	Europe
83	[c.44C>G]+[c.939+1G>T]	p.Ser15Cys + altération de l'épissage	20	Syncopes à l'effort	Non précisé	Cas sporadique	Non	Australie
84	[c.381C>T]+[c.923C>A]	Altération de l'épissage + p.Pro308Gln	4	Syncope Arrêt cardiaque	Nadolol, ICD	Cas sporadique	Non	Europe
85	c.97C>T+ c.838+88T>G	p.Arg33* + ?	11	Syncopes à l'effort	Nadolol	Cas sporadique	Non	Europe
86	c.546delT	p.Phe182Leufs*209	12	Malaise et palpitations à l'effort et à l'émotion	Bétaxolol	Cas sporadique	Non	Europe

Les mutations sont indiquées en noir, la variation intronique profonde c.838+88T>G de signification inconnue est indiquée en gris. MS : mort subite.

Figure 41. Arbres généalogiques des familles avant une ou deux mutations *CASO2* identifiées.



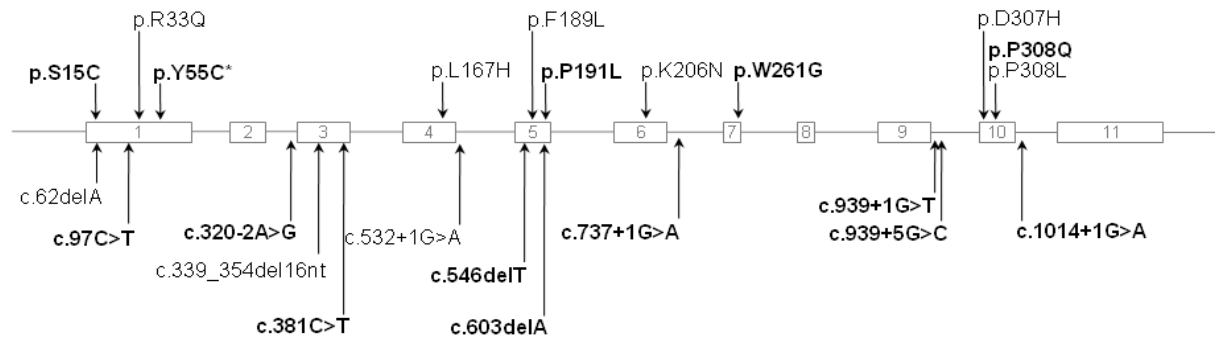
Les symboles pleins noirs représentent les individus atteints; les symboles demi-remplis en noirs les individus asymptomatiques présentant des battements ventriculaires prématurés ou des extrasystoles ventriculaires voire des courts épisodes de TV lors de l'épreuve d'effort ; les symboles demi-remplis en gris les individus hétérozygotes asymptomatiques avec une exploration paraclinique négative. Les rayures désignent un individu homozygote asymptotique (diagnostic présymptomatique chez un enfant de 1 an). Le signe + désigne un allèle muté, les – un allèle sain.

Pour la famille 84, le proband est un cas sporadique et aucun autre membre de la famille n'a pu être analysé à ce jour.

2. Nature et topologie des mutations

Au total, nous avons identifié 14 mutations différentes (Figure 42, mutations en gras). Ces mutations sont situées au niveau des exons ou bornes introniques des exons 1, 3, 5, 6, 7, 9 et 10. Les mutations retrouvées sont deux délétions mononucléotidiques (dont une retrouvée deux fois), six mutations d'épissage (dont une retrouvée deux fois), une mutation non-sens et cinq mutations faux-sens. Trois mutations sont récurrentes. Deux variations sont retrouvées à deux reprises et une mutation est déjà rapportée dans la littérature (de la Fuente et al., 2008). Au total, onze mutations rapportées dans cette étude sont donc des mutations privées.

Figure 42. Distribution des mutations du gène *CASQ2*.



Le gène est représenté de manière schématique avec les exons représentés par les rectangles et le numéro de l'exon figuré dans le rectangle. Les mutations en gras sont celles présentées dans cette étude (Postma et al., 2002; Roux-Buisson et al., 2011b). Les autres sont issues de la littérature (<http://www.fsm.it/cardmoc/>). L'astérisque indique la mutation, préalablement identifiée dans une autre étude (de la Fuente et al., 2008). Les mutations faux-sens sont indiquées au-dessus des exons en indiquant le changement en acides aminés selon un code à 1 lettre. Les mutations non-sens, les délétions, les mutations d'épissage sont marquées en-dessous des exons, en indiquant le changement en nucléotides sur le cDNA.

3. Variations faux-sens

Cinq mutations faux-sens ont été identifiées, présentées dans le tableau 13.

Quatre mutations, p.Y55C, p.P191L, p.W261G et p.P308Q, sont situées dans les domaines thiorédoxine-like de la protéine, qui interviennent dans la liaison des ions Ca^{2+} par la protéine. Les trois mutations p.P191L, p.W261G et p.P308Q concernent des aminés très conservés de la protéine (Figure 43). Aucune des variations n'a été identifiée parmi 200 chromosomes contrôlés. Les études familiales sont compatibles avec une transmission autosomique récessive de la maladie.

Tableau 13. Mutations faux-sens identifiées dans Casq2.

Patients	Variant identifié	Conservation	Changement physico-chimique	Domaines	Prédiction bioinformatique (seuil)						Témoins (chr)	Etude familiale	
					SIFT (0,05)	Polyphen	SNPs 3D (0)	Pmut (0,5)	SNPs&GO	SNAP			MutPred (0,75)
1	p.S15C	non	Conservatif	Peptide signal	Bénin 0,22	Bénin 1,376	Bénin 2,98	Bénin 0,4	Délétère	Bénin	Bénin 0,421	200	Oui
2	p.Y55C	non	Conservatif	Domaine I	Bénin 0,17	Délétère 2,28	Délétère -0,66	Bénin 0,11	Bénin	Délétère	Délétère 0,753	200	Oui
3	p.P191L	oui	Conservatif	Domaine II	Bénin 0,25	Délétère 2,879	Délétère -2,04	Bénin 0,39	Délétère	Délétère	Délétère 0,788	200	Oui
4	p.W261G	oui	Conservatif	Domaine III	Délétère 0,00	Délétère 3,544	Délétère -1,25	Délétère 0,76	Délétère	Délétère	Délétère 0,895	200	Oui
5	p.P308Q	oui	Non conservatif	Domaine III	Bénin 0,15	Délétère 2,506	Délétère -1,01	Délétère 0,74	Délétère	Délétère	Délétère 0,886	200	Non

Figure 43. Conservation des acides aminés mutés dans Casq2.

		15			
1	-----MKRT-----HLFIVGIYFLS S CR-----AEEGLNFPTYDGKDRVSVLSSEKNFKQV		45	O14958	CASQ2_HUMAN
1	-----MKRI-----YLLMVGVIYLLS L SG-----AEEGLNFPTYDGKDRVSVLSSEKNLQKM		45	O09161	CASQ2_MOUSE
1	-----MKAT-----CWILAGFCLLFCCK-----AEEGLNFPTYDGKDRVIDLNEKNYKHA		45	P19204	CASQ2_CHICK
1	MSATDRMGPRAVPGLRLALLLLLVLTGTPKSGVQGGQEGLDFFEYDGVDRVINVNAKYNKV		60	P31415	CASQ1_HUMAN
1	-----MKGP-----WLVLAALCL S LANLGPGRGEDGLDFPEYDGEDRVIHISLKNYKAA		48	P31231	CASQ1_RANES
1	-----MTWIKLASLALVVVLA S AGIS K NEDLECMFLGYPDLEYDGFDRTEVLTEKNFNRT		55	Q20203	Q20203_CAEE
	←----- Peptide signal (AA 1-19) -----> Domain I				
46	LKKYDLL C L Y HEPVSSDKVTQKQFQLKEIVLELVAQVLEHKAIGFVMVDAKKEAKLAKK	55	105	O14958	CASQ2_HUMAN
46	LKRYDLL C L Y HEPVSSDKVSRQKQFQLKEIVLELVAQVLEHKNIGFVMVDSRKEAKLAKR		105	O09161	CASQ2_MOUSE
46	LKKYDML C LLFHEPVSSDRVSRQKQFMTEMVLELAAQVLEPRSIGFGMVDSKDAKLAKK		105	P19204	CASQ2_CHICK
61	FKKYEVLAL L YHEPEPDDRASRQRFEMEELILELAAQVLEDKGVGFGLVDSEKDAAVAKK		120	P31415	CASQ1_HUMA
49	LKKYEVLAL L YHEPIGDDKASRQRFEMEELILELAAQVLEDKGVGFGLVDSDDAAVAKK		108	P31231	CASQ1_RANES
56	VFAEDTKSVVFFNDVEED---DSELDQYECFLQLSAQIM T KRGYNFYTVN T KEHRLR K Q		112	Q20203	Q20203_CAEE
	Domain I				
165	-IKLIGFFK S EDSEYYKAFEEAAEH F Q P YIKFFATFDKGAVAKLSLK-MNEVDFYEPFMD	191	222	O14958	CASQ2_HUMAN
165	-TKLLGFFK N EDSEYYKAFQEA A EH F Q P YIKFFATFDKAVAKLSLK-MNEVGFYEPFMD		222	O09161	CASQ2_MOUSE
165	-IKLIGYFKG E DSEHYKAFEEAAEH F Q P YVKKFFATFDKGAVAKLGLK-MNEVDFYEPFMD		222	P19204	CASQ2_CHICK
180	-IKLIGYFK S KDSEHYKAFEDAAEE F H P YI P FFATFDKAVAKLTLK-LNEIDFYEA F ME		237	P31415	CASQ1_HUMAN
168	-PKLIGYFK N EDSEHYKAYEDAAEE F H P YI P FFATFDKAVAKLTLK-LNEIDY E PF H D		225	P31231	CASQ1_RANES
173	CVRIIGY F FE-PGSVALKEFE E AAED F MGEIEFFAVVTSKWAR V GLKRVGEVQMR R PF E E		231	Q20203	Q20203_CAEE
	Domain II				
223	EPIAIPNKPYTEELVEFVKEHQ R PTLRR L RP E EM F ET W EDDLNG-IHIVAF A E K S D PD G	261	281	O14958	CASQ2_HUMAN
223	EPNVI P NKPYTEELVEFVKEHQ R PTLRR L RP E DM F ET W EDDLNG-IHIVAF A E K S D PD G		281	O09161	CASQ2_MOUS
223	EPVHI P DKPYTEELVEFVKEH K RATL R KL R PE D MF E T W EDDM E G-IHIVAF A E E DD P PD G		281	P19204	CASQ2_CHICK
238	EPVTI P DKPN S EEEEIVN F VEE H RR S TL R KL K P E SM Y ET W EDDM D G-IHIVAF A E E AD P PD G		296	P31415	CASQ1_HUMAN
226	EPIT I PSKPN S EKEI V DF L HQ H K R PTL R KL R PD S MY E T W EDDLNG-IHIVAF A E E DD P PD G		284	P31231	CASQ1_RANES
232	D L FL F APT S AD T EE E EF D W V E K NE P VM Q KL T LD N Y F N L WR D P E EE E ER M IL A FL V DE E T R E G		291	Q20203	Q20203_CAEE
	Domain II	Domain III			
282	YEFLEILKQVARDNTD N P-DLSILWID P DD F LLVAYW E K T FKID L FR-PQIGVV N VT D A	308	339	O14958	CASQ2_HUMA
282	YEFLEILKQVARDNTD N P-DLSILWID P DD F LLVAYW E K T FKID L FK-PQIGVV N VT D A		339	O09161	CASQ2_MOUSE
282	FEFLEILKQVARDNTD N P-DLSI V WID P DD F LL I TYW E K T FKID L FR-PQIGI V N V T D A		339	P19204	CASQ2_CHICK
297	FEFLETLKAVAQDNT E N P -DLSI I WID P DD F LL V PYW E K T FDID L SA-PQIGVV N VT D A		354	P31415	CASQ1_HUMAN
285	YEF L Q I KE V AEDNTD N P-DLSI I WID P ED F LL I PYW E E K FGID L SR-PHIGVV N VT D A		342	P31231	CASQ1_RANES
292	RAMK R LLDK I ADENSEHAG T LE I IL V D P EF L LM V D V W E DM F GID E EG P Q I GLID I SE K		351	Q20203	Q20203_CAEE
	Domain III				

La variation p.Y55C entraîne la substitution de la tyrosine par une cystéine en position 55 de la chaîne d'acides aminés. L'acide aminé en position 55 est situé dans le feuillet β3 du domaine I. Cette variation a été identifiée chez deux probands non apparentés. Dans chaque cas, la variation était associée en trans à une variation très probablement pathogène (néomutation p.P308L (de la Fuente et al., 2008)), délétion mononucléotidique c.603delA, ind I:1, fam 80). La ségrégation intra-familiale du variant compatible avec un mode de transmission autosomique récessif dans deux familles, l'absence de la variation chez des individus témoins et l'étude du caractère pathogène de la variation par des logiciels de prédiction ont fourni un ensemble d'arguments en faveur du caractère pathogène de ce variant.

La variation p.P191L a été identifiée à l'état homozygote chez le proband de la famille 78 dans un contexte de consanguinité familiale. La proline en position 191 se situe sur la courte boucle entre l'hélice α7 et le feuillet β2' dans le domaine II. Compte-tenu de l'importance des résidus proline au niveau structural il est hautement probable que la substitution de cette proline altère de manière importante la conformation de Casq2. De plus, une mutation p.F189L a été identifiée dans la même région (Liu et al., 2008b).

La mutation p.W261G a été identifiée à l'état homozygote chez une patiente âgée de 33 ans d'origine turque (ind II:1, fam 79). Aucune notion de consanguinité n'était connue dans la famille. Dans ce contexte, la variation pouvait correspondre soit à un polymorphisme non retrouvé dans les témoins réalisés au laboratoire qui ne sont généralement pas d'origine turque, soit à une mutation retrouvée à l'état homozygote en raison d'un effet fondateur. L'ensemble des critères considérés sont en faveur du caractère pathogène de la variation : il s'agit d'un acide aminé très conservé, les témoins analysés même s'ils ne sont pas de la même origine géographique que le proband n'étaient pas porteurs de cette variation, le tryptophane en position 261 est important pour la fonction de la protéine. Il s'agit de l'un des 5 tryptophanes de la protéine. Les 5 résidus tryptophane de la protéine, Trp261, 305, 318, 343 et 361 sont localisés dans le domaine III de la protéine. A l'exception du tryptophane 305, ils sont tous situés dans un environnement hydrophobe. Particulièrement, les tryptophanes en position 261, 318 et 343 « forment » le cœur hydrophobe du domaine III grâce à leurs interactions étroites avec les résidus voisins aromatiques. La perte de fonction de la protéine associée à la variation p.W261G liée à la perte du tryptophane est très probable. En effet, la substitution du tryptophane en position 261 risque d'entraîner la perte de l'intégrité du cœur hydrophobe du domaine III avec une altération fonctionnelle de la protéine.

La variation p.P308Q concerne un acide aminé très conservé de la protéine. La proline en position 308 est située dans la courte boucle située entre le feuillet $\beta 3''$ et l'hélice $\alpha 13$ du domaine III de la protéine. Cette proline permet aux trois résidus aspartique voisins de former une région riche en charge négative (307, 309 et 310). Compte-tenu de l'importance des prolines au niveau structural, il est hautement probable que la substitution de cette proline altère de manière importante la conformation de Casq2. La variation est associée à une seconde variation hétérozygote, c.381C>T chez le proband (fam 84). L'étude familiale est en cours pour vérifier dans un premier temps que les deux variations sont à l'état hétérozygote composite chez le proband. Une variation *de novo* p.P308L concernant cet acide aminé a déjà été publiée dans le cadre d'une TVPC chez un individu de 30 ans (de la Fuente et al., 2008). Le patient était porteur à l'état hétérozygote composite de la variation p.P308L et p.Y55C. Une étude *in vitro* a permis de montrer que la substitution de la proline était associée à des anomalies de liaison du calcium (Bal et al., 2011). Enfin, la proline en position 308 est adjacente à la position 307 pour laquelle une mutation a été rapportée et largement étudiée puisqu'il s'agissait de la première mutation Casq2 identifiée (D307H). De plus, cette région est proche de l'interface « front-to-front » permettant les interactions dimériques (Park et al., 2004). Même si la proline n'est pas forcément impliquée directement dans l'interaction

dimérique, la perturbation locale de structure risque d'affecter la formation des dimères.

A la différence des 4 variations ci-dessus qui sont dans un des 3 domaines thiorédoxine-like de Casq2, la variation p.S15C est située dans la séquence du peptide signal du précurseur de la protéine mature. Le fait que l'acide aminé concerné se situe dans la séquence du peptide signal pouvait laisser supposer que la variation ait un impact en modifiant l'adressage de la protéine dans le réticulum sarcoplasmique. Une autre hypothèse serait que la modification du peptide signal altère son clivage. La persistance du peptide signal pourrait alors altérer la capacité de polymérisation de la protéine. La prédiction de l'altération du peptide signal a été testée *in silico* à l'aide du logiciel Signal IP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Les résultats ne montraient pas de modification de la reconnaissance de la séquence du peptide signal lorsque la serine en position 15 était substituée par une cystéine (tableau 14).

Tableau 14. Etude de l'impact de la variation p.S15C sur la séquence du peptide signal par le logiciel Signal IP.

	Score		Effet prédit de la variation
	Séquence de référence	p.S15C	
Reconnaissance du peptide signal	0,994	0,991	Aucun
Clivage (score et position du clivage)	0,985 AA 19-20	0,965 AA 19-20	Aucun

Les scores sont donnés sur 1. La position du clivage est située entre les acides aminés 19 et 20 de la séquence primaire de la protéine.

En l'état actuel, le caractère pathogène de ce variant reste discuté et nécessite donc des études complémentaires. La poursuite de l'étude familiale, particulièrement la recherche de la mutation p.S15C, est nécessaire pour déterminer si les deux variations, p.S15C et c.939+1G>T, sont situées en trans chez le proband (ind II:1, fam 83) et associées à une transmission autosomique récessive de la maladie. On ne sait pas pour l'instant si la variation p.S15C a été transmise par la mère du proband, ou si elle est survenue *de novo* chez le proband, éventuellement sur l'allèle muté c.939+1G>T. Ensuite, si les deux variations sont à l'état hétérozygote composite chez le proband, des études seront envisagées pour réaliser la caractérisation fonctionnelle de la variation p.S15C. Brièvement, après clonage du cDNA de Casq2, il est prévu d'introduire par mutagenèse dirigée la variation p.S15C et d'étudier son impact par différentes approches. Après transfection dans des cellules COS-7, la localisation de la protéine sera étudiée en immunofluorescence indirecte. D'autre part, l'étude de la capacité de polymérisation de Casq2 sera réalisée par immunoblot, après électrophorèse sur gel en condition non dénaturante.

En conclusion, les critères d'évaluation du caractère des variations p.Y55C, p.P191L, p.W261G et p.P308Q sont en faveur de leur rôle pathogène (conservation orthologue et paralogue, substitution physico-chimique non conservative, absence de la variation dans une cohorte de témoins sains, étude familiale). Cependant, seule une étude fonctionnelle permettrait de valider de manière formelle le caractère pathogène des variations faux-sens que nous avons identifiées. Cette étude pourrait rechercher une diminution de la capacité de liaison du Ca^{2+} liée à la mutation, une modification de la capacité de polymérisation, une altération du taux protéique de la calséquestrine mutée.

4. Variations affectant l'épissage

➤ Mutations affectant les sites consensus donneurs GT ou accepteurs AG

Quatre mutations modifiaient un site consensus donneur ou accepteur : c.320-2A>G (intron 2), c.737+1G>A (intron 6), c.939+1G>T (intron 9), c.1014+1G>A (intron 10). Ces quatre variations étaient prédites comme altérant l'épissage et entraînant un saut des exons 3, 6, 9 et 10 respectivement. Les sauts des exons 3, 6 et 9 seraient associés à un décalage du cadre de lecture au niveau protéique avec création d'un codon stop prématuré en position 143, 215 et 291 respectivement. Le saut de l'exon 10, probable conséquence de la modification du site donneur de l'intron 10, résulterait en une délétion des acides aminés 314 à 338, altérant le troisième domaine thiorédoxine de la protéine (acides aminés 247-370, (Kim et al., 2007)). Une telle délétion entraînerait une modification conformationnelle de la calséquestrine avec une perte de la fonction de la protéine ou bien la dégradation de la protéine via le mécanisme UPR (Unfolded Protein Response, (Schroder and Kaufman, 2005b)).

➤ Variation synonyme c.381C>T et variation intronique c.939+5G>C

Nous avons identifié une variation synonyme c.381C>T ; p.= dans l'exon 3 et une variation concernant une base intronique en +5 dans l'intron 9 : c.939+5G>C. Ces deux variations n'altérant pas les di-nucléotides invariants des sites consensus donneur ou accepteur, leur caractère pathogène était incertain. Nous nous sommes posé la question de leur possible rôle pathogène sur la base de plusieurs arguments :

1. Il s'agissait de variations non répertoriées dans les bases de données de polymorphismes.
2. Chacune était associée à l'état hétérozygote composite avec une variation de caractère

pathogène hautement probable chez le proband familial (ind II:3, fam 81 et ind II:3, fam 82).

3. La ségrégation des variants était compatible avec une transmission autosomique récessive de la pathologie dans les familles.

Nous avons donc étudié l'impact de ces deux variations, c.381C>T et c.939+5G>C, sur l'épissage à l'aide de logiciels de prédiction bioinformatique dans un premier temps puis expérimentalement à l'aide d'un système de minigène.

Les résultats obtenus *in silico* sont résumés sur le tableau 15.

Tableau 15. Etude bioinformatique de l'effet des variants c.381C>T et c.939+5G>C du gène CASO2.

Exon	Variant	Logiciels	Score du site donneur naturel ^a		Effet prédit de la mutation
			Séquence Reference	Séquence Variant	
3	c.381C>T	GeneSplicer	0	0	Création d'un site cryptique donneur en position 380_381 (score at 2.28)
		NetGene2	0	0	Création d'un site cryptique donneur en position 380_381 (score at 0.76)
		ASSA	8.3	8.3	Création d'un site cryptique donneur en position 380_381 (score at 9.5)
9	c.939+5G>C	GeneSplicer	9.84	0	Abolition du site donneur naturel, activation d'un site donneur 73 pb en aval (score at 6.67)
		NetGene2	0.93	0	Abolition du site donneur naturel
		ASSA	10.6	6.7	Abolition du site donneur naturel, activation d'un site donneur 73 pb en aval (score at 5.5)

^a Seuils de reconnaissance d'un site donneur: GeneSplicer : 0,46 / NetGene2 : 0,5 / ASSA : 0

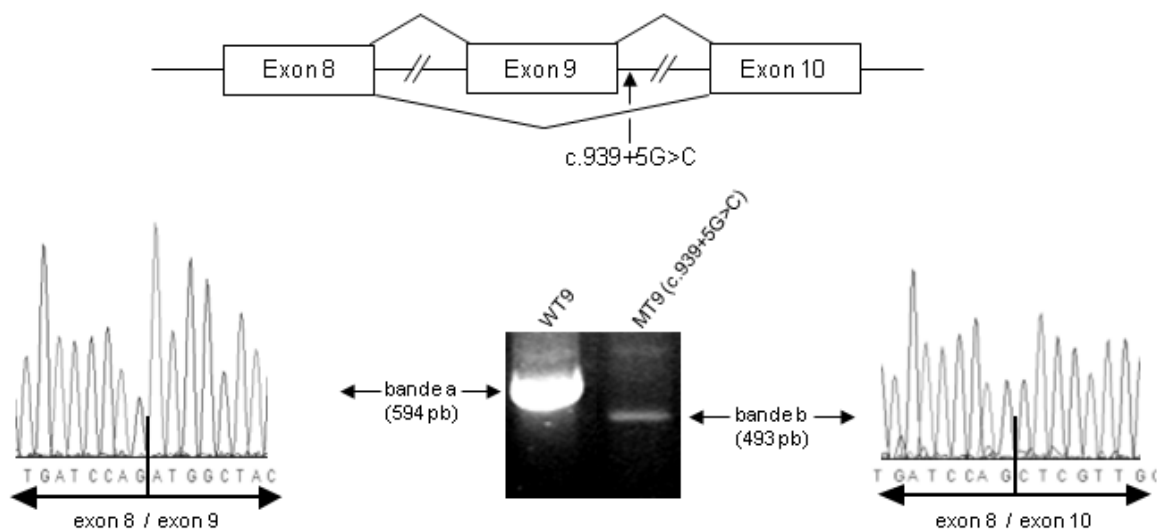
D'après les trois logiciels, le variant c.939+5G>C était prédit comme pouvant affaiblir ou abolir le site physiologique donneur de l'exon 9 en position c.939+1_2. De plus, les logiciels GeneSplicer et ASSA indiquaient l'activation potentielle d'un site cryptique donneur 73 bp en aval de l'extrémité 3' de l'exon 9. La variation synonyme c.381C>T était prédite comme pouvant créer un nouveau site donneur en position c.380_381 d'après les trois logiciels, tandis que le site physiologique en position c.420+1_2 n'étaient pas reconnu par les logiciels GeneSplicer et NetGene2. Ces résultats suggéraient que le site donneur résultant de la variation c.381C>T était plus fort que le site physiologique. Les études bioinformatiques étaient donc en faveur d'un impact de ces deux variations sur l'épissage.

Nous avons donc entrepris d'étudier les conséquences des variations observées à l'aide d'un système de minigène. Comme décrit dans le chapitre « Méthodes », chaque variation a été introduite dans un plasmide contenant la succession de trois exons avec 200 pb de bornes introniques amont et aval pour chacun des trois exons. Les minigènes ont été ensuite exprimés dans des cellules HEK-293. L'effet des mutations a été évalué par séquençage des produits

d'amplification obtenus par RT-PCR à partir des ARNm exprimés après transfection des minigènes.

La figure 44 présente l'étude de la variation c.939+5G>C. La transfection du minigène sauvage WT9 dans des cellules HEK-293 entraîne la synthèse d'un ARNm majoritaire (bande a). Le séquençage de ce produit a montré qu'il consistait en la succession des séquences codantes 8, 9 et 10. Ce résultat indique que les cellules transfectées avec le minigène sauvage sont capables de produire un ARN messager mature identique à celui résultant de l'épissage physiologique des introns 8 et 9 dans un tissu cardiaque. L'analyse du produit de RT-PCR obtenu après extraction des ARN totaux de cellules HEK-293 transfectées avec le minigène MT9 porteur de la variation c.939+5G>C montre une bande majoritaire de plus faible poids moléculaire (bande b). Le séquençage de la bande b montre que le produit analysé correspond à la succession des exons 8 et 10, démontrant que la variation c.939+5G>C entraînait un saut de l'exon 9 lors de l'épissage *in vitro*.

Figure 44. Etude de l'impact de la variation c.939+5G>C du gène CASO2 à l'aide d'un minigène.



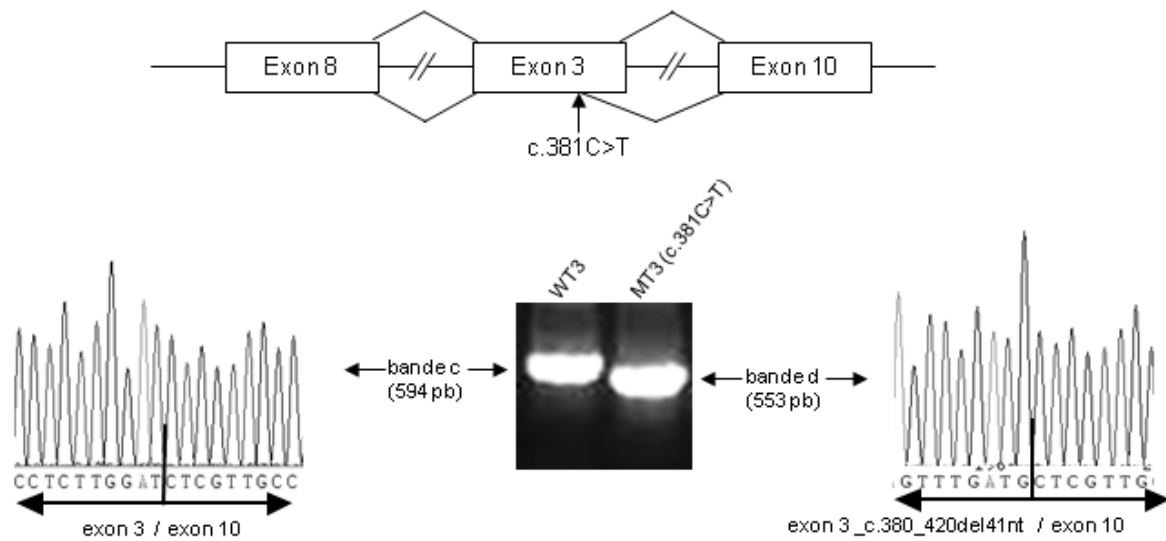
La figure montre le saut de l'exon 9 lié à la variation c.939+5G>C. Le gel d'agarose montre les produits obtenus après RT-PCR à partir des ARNm extraits des cellules transfectées. Le produit de RT-PCR obtenu à partir du minigène sauvage WT9 correspond à un ARNm correctement épissé (594 pb), avec la succession des séquences des exons 8, 9 et 10 (bande a). Le minigène mutant MT9, porteur de la variation c.939+5G>C produit un ARNm anormal de 493 pb (bande b). Le séquençage de la bande b montre un saut de l'exon 9 (séquence de droite).

Un épissage similaire *in vivo* résulterait dans la création d'un codon stop prématuré en position 291 de la chaîne d'acides aminés. Ce codon stop prématuré étant situé à moins de 55 pb en amont du dernier intron, le transcrit mature échapperait éventuellement à une dégradation lié au nonsense-mediated decay (NMD). La traduction de cet ARNm pourrait alors aboutir à la synthèse d'une protéine tronquée, stable ou non, dépourvue d'une partie du

troisième domaine thiorédoxine-like et de la partie C-terminale de la protéine (Khajavi et al., 2006). De manière intéressante, Song et al. ont réalisé un modèle murin de souris délétée pour l'exon 9 de *CASQ2* et ont montré que la protéine Casq2 était indétectable au niveau tissulaire chez cette souris. Les souris jeunes présentaient un cœur structurellement sans anomalie mais présentant des troubles du rythme ventriculaire déclenchés par une stimulation adrénergique (Alcalai et al., 2011). Les auteurs ont conclu que la délétion homozygote de l'exon 9, qui est associée à une absence de la protéine correspondante chez la souris, entraîne le développement d'un phénotype cardiaque murin équivalent à celui de la TVPC chez l'homme. Nos données expérimentales montrent par étude sur minigène que la variation c939+5G>C, aboutit au même défaut moléculaire, c'est-à-dire le saut de l'exon 9 lors de l'épissage. Ce défaut d'épissage pourrait donc entraîner un défaut quantitatif de protéine chez les patients à l'origine du phénotype observé.

Selon le même protocole, des cellules HEK-293 ont été transfectées avec un minigène sauvage WT3 ou muté MT3, porteur de la variation c.381C>T. L'analyse du produit de RT-PCR obtenu après transfection du minigène sauvage montre une séquence correspondant à la succession des exons 8, 3 et 10 compris dans le minigène traduisant un épissage respectant les sites donneurs et accepteurs physiologiques (Figure 45, bande c). La transfection du minigène muté entraîne la production d'un ARNm de taille inférieure (bande d). Le séquençage du produit amplifié met en évidence une délétion des 41 derniers nucléotides de l'exon 3, conséquence de la création d'un site donneur d'épissage en position c.380_381. L'absence de bande détectable correspondant à l'épissage physiologique montre que la variation c.381C>T abolit *in vitro* le site d'épissage donneur de l'exon 3.

Figure 45. Etude de l'impact de la variation c.381C>T du gène CASO2 à l'aide d'un minigène.



La figure montre la délétion des 41 nucléotides de l'exon 3 induite *in vitro* par la variation c.381C>T lors de l'épissage. Le gel d'agarose montre les produits obtenus après RT-PCR à partir des ARNm extraits des cellules transfectées. Le produit de RT-PCR obtenu à partir du minigène sauvage WT3 correspond à un ARNm correctement épissé (594 pb) avec la succession des séquences des exons 8, 3 et 10 (bande c). Le minigène mutant MT3, porteur de la variation c.381C>T produit un ARNm anormal de 553 pb (bande d). Le séquençage de la bande d montre une délétion de 41 nucléotides (c.380_420, séquence de droite).

L'étude *in silico* n'a pas mis en évidence d'éventuelle abolition d'un ESE (exonic splicing enhancer) lié à la variation c.381C>T qui aurait pu expliquer la disparition de l'épissage physiologique *in vitro* (Human Splicing Finder, <http://www.umd.be/HSF/>). L'abolition de la reconnaissance du site donneur physiologique de l'exon 3 est peut-être la résultante d'une « compétition » entre l'épissage fort au niveau du site cryptique créé et l'épissage faible au niveau du site donneur physiologique. L'épissage aberrant associé à la variation c.381C>T observé *in vitro*, correspond à une délétion des 41 nucléotides de l'exon 3 et entraînerait la création d'un codon stop prématuré en position 129 dans la chaîne d'acides aminés, aboutissant probablement à la dégradation de l'ARNm *in vivo* via le mécanisme NMD.

➤ Variation intronique c.838+88T>G (intron 8)

La variation intronique profonde non répertoriée, c.838+88T>G, a été retrouvée à l'état hétérozygote chez le proband de la famille 85, en association avec une seconde variation hétérozygote c.97C>T ; p.R33*. Le caractère bénin ou délétère de cette variation intronique est difficile à évaluer. Nous avons analysé son effet possible sur l'épissage à l'aide de logiciels de prédiction qui indiquaient une possible activation d'un site accepteur en c.838+87_88 (tableau 16).

Tableau 16. Etude bioinformatique de l'effet du variant c.838+88T>G du gène *CASQ2*.

Logiciel	Score du site donneur naturel ^a		Effet prédit du variant
	Reference sequence	Variant sequence	
GeneSplicer	10.16	10.16	Pas d'effet
NetGene2	0.94	0.94	Création d'un site cryptique accepteur en c.838+87_88 Score 0.53
ASSA	12.5	12.5	Renforcement d'un site cryptique accepteur en c.838+87_88 Score passe de 5.3 à 14

^aSeuil de reconnaissance d'un site donneur : GeneSplicer : 1.01 / NetGene2 : 0,2 / ASSA : 0

Au total, l'analyse bioinformatique n'apportant que peu d'éléments, plusieurs études restent à réaliser pour évaluer le caractère bénin ou pathogène de cette variation. La variation doit tout d'abord être recherchée chez les parents du proband pour déterminer si les deux variations identifiées sont situées sur un ou deux allèles différents. Si les deux variations sont un seul allèle, le caractère possiblement pathogène de la variation intronique est sans intérêt puisqu'elle est en aval de la variation non-sens. Si les deux variations sont en trans, alors leur association peut être compatible avec une transmission autosomique récessive de la maladie et il sera intéressant de considérer l'effet de la variation c.838+88T>G sur l'épissage de l'exon 8 à l'aide d'un minigène.

Au total, l'existence de variants altérant l'épissage et situés à d'autres positions que les sites di-nucléotidiques invariants donneur et accepteur montre l'intérêt de l'étude de ces variations dont le caractère pathogène n'apparaît pas évident. L'étude des variants c.381C>T et c.939+5G>C à l'aide de minigènes a permis de valider leur caractère pathogène. L'effet de ces variants sur l'épissage de l'ARNm de *CASQ2* aurait pu être analysé directement à partir de tissu cardiaque ou de tissu musculaire squelettique. Un prélèvement de tissu cardiaque n'était pas envisageable pour des raisons éthiques. Nous n'avons pas non plus obtenu de tissu musculaire. De plus l'épissage pouvant être différent d'un tissu à l'autre, l'étude de l'épissage de *CASQ2* à partir du transcrite musculaire squelettique n'aurait fourni qu'un élément indirect de l'épissage dans le tissu cardiaque. L'étude de l'épissage à l'aide d'un minigène est réalisée dans un système artificiel et ne reproduit pas non plus forcément fidèlement les phénomènes d'épissage physiologiques observés dans le tissu d'intérêt *in vivo*. Le minigène fournit surtout l'avantage d'étudier l'épissage lorsque le tissu d'expression n'est pas disponible ou lorsque l'ARNm est éventuellement dégradé via le NMD. Dans le futur, une autre approche pour étudier ces mutations affectant l'épissage dans des tissus difficiles ou impossibles à prélever chez l'homme pourrait être celle représentée par les IPS.

5. Discussion

A ce jour, les mutations de la calséquestrine restent relativement rares puisque seuls 5% des 214 patients TVPC inclus dans cette étude se sont révélés porteurs de mutations du gène *CASQ2*.

Compte-tenu de son caractère récessif, ce gène est souvent impliqué dans les cas où il existe une notion de consanguinité. Ainsi, dans notre cohorte, nous avons trouvé une mutation homozygote du gène *CASQ2* chez les 3 individus issus d'une union consanguine (fam 76, 77 et 78). Il apparaît donc indiqué de rechercher des mutations du gène *CASQ2* en première intention dans ces situations.

La transmission possible de la pathologie selon un mode autosomique dominant et/ou l'existence de formes modérées associées à la présence d'un seul allèle muté reste discutée. La réponse à ces interrogations est particulièrement importante dans le cadre du conseil génétique où l'identification du mode de transmission intervient dans l'évaluation du risque de survenue de troubles du rythme pour chaque individu.

Nous disposons de plusieurs éléments permettant d'orienter cette discussion. Dans notre étude, nous n'avons pas identifié de mutations *CASQ2* dans des formes familiales associées à une transmission autosomique dominante de la maladie (19 probands sur les 139 analysés). Dans la littérature, une seule famille a été rapportée avec une transmission autosomique dominante de la maladie peut-être liée à une mutation *CASQ2* à pénétrance réduite (Kirchhefer et al., 2010). Le proband relatait des syncopes répétées à l'âge de 10 ans, et présentait des extrasystoles ventriculaires isolées puis en doublets à l'épreuve d'effort. Un de ses deux fils est décédé subitement à l'âge de 13 ans avec des antécédents de syncopes à l'effort et à l'émotion. Une mutation faux-sens p.K206N a été identifiée à l'état hétérozygote chez le proband. Son fils décédé n'a pu être analysé. Son second fils est porteur sain de la mutation à l'état hétérozygote. On ne peut écarter la possibilité d'une seconde mutation passée inaperçue chez l'enfant décédé, l'association de deux mutations *CASQ2* serait alors responsable du phénotype sévère ayant abouti au décès de l'enfant.

Dans notre étude et pour ce qui concerne les familles associées au gène *CASQ2*, 9 probands sur 11 sont porteurs de deux mutations. Nous avons identifié une mutation à l'état homozygote chez 4 probands (fam 76 à 79). Pour le proband de la famille 79, l'association de la mutation identifiée à l'état hémizygotique avec une délétion hétérozygote concernant la région porteuse de la mutation ponctuelle ne peut être écartée avec certitude. Pour les familles 80 à 84, nous avons identifié deux mutations hétérozygotes chez les probands. Si le statut

hétérozygote composite est bien établi pour les probands des familles 80, 81 et 82, la poursuite de l'étude familiale est cependant nécessaire pour les familles 83 et 84. Au total, l'ensemble des individus symptomatiques dans ces familles est porteur de deux allèles mutés de manière certaine ou probable, à l'exception de l'individu II:4 de la famille 76 testé en pré-symptomatique à quelques mois de vie (11/12). La pénétrance de la maladie apparaît complète chez les individus porteurs de deux allèles mutés (fam 76 à 82). La présence d'une seule mutation pourrait représenter potentiellement une susceptibilité aux arythmies puisque certains apparentés hétérozygotes, bien qu'asymptomatiques, présentent des anomalies rythmiques lors de l'épreuve d'effort (de la Fuente et al., 2008; Hayashi et al., 2009a; Postma et al., 2002). La nature des mutations concernées est hétérogène. Il s'agit aussi bien de mutations faux-sens (p.Y55C), non-sens (p.R33*), de microdélétions (c.546delT) ou de mutations d'épissage (c.381C>T). Par ailleurs, certains apparentés porteurs de l'une de ces mutations présentent une épreuve d'effort normale.

Ainsi, dans les familles 76 à 82 au sein desquelles les probands sont porteurs de deux allèles mutés, les individus porteurs d'un seul allèle muté sont tous asymptomatiques (n=19). Cependant, deux personnes de la famille 81 ont présenté des anomalies lors de l'épreuve d'effort (2/19). Lors de l'épreuve d'effort, le père du proband (ind I:2), porteur de la mutation c.381C>T à l'état hétérozygote, a présenté un épisode de tachycardie ventriculaire non soutenue, et la mère du proband (ind I:1), porteuse à l'état hétérozygote de la variation c.546delT, des battements ventriculaires prématurés.

Pour les familles 85 et 86, une seule mutation à l'état hétérozygote a été identifiée chez les probands (Hayashi et al., 2009a; Postma et al., 2002). Sept apparentés sont porteurs hétérozygotes de la variation identifiée chez le proband. Aucun n'avait présenté de symptôme pouvant être rattaché à un trouble du rythme, mais 3 ont présenté des anomalies à l'épreuve d'effort (bigéminisme, battements ventriculaires prématurés, extrasystoles ventriculaires polymorphes). On notera que le proband de la famille 86, porteur de la mutation c.546delT hétérozygote isolée, présentait une clinique atypique, sans syncope vraie, mais avec une TV polymorphe non soutenue à l'épreuve d'effort. Par ailleurs, cette mutation a également été identifiée chez le proband de la famille 81 dans le cadre d'une forme récessive, associée à une symptomatologie plus typique (syncopes répétées à l'effort et à l'émotion, proband porteur des mutations [c.381C>T]+[c.546delT]). Il se pourrait donc que la présence isolée de la mutation c.546delT soit responsable d'une clinique atypique alors qu'elle serait associée à une symptomatologie franche dans le cadre de forme récessive. Le fait qu'une forme avérée de TVPC soit associée chez le proband de la famille 85 à une seule variation et chez deux

apparentés à une forme « modérée de TVPC » pourrait être liée à la présence d'une mutation passée inaperçue chez le proband sur *CASQ2* ou à l'implication d'un autre gène. Pour les raisons que nous venons d'évoquer, nous nous sommes donc attachés à rechercher une seconde variation de *CASQ2* chez les probands des familles 85 et 86. Le séquençage des régions codantes du gène et de la région 3'UTR ne nous a pas permis d'identifier une seconde variation chez le proband de la famille 86. Pour la seconde famille, nous avons trouvé chez le proband de la famille 85, une variation hétérozygote intronique non répertoriée dans l'intron 8, c.838+88T>G, dont le caractère bénin ou pathogène reste à définir.

Au total, nous retiendrons que :

- Une pénétrance complète de la maladie est observée chez les patients porteurs de 2 allèles mutés, l'âge de survenue des premiers symptômes se situant entre 4 et 20 ans.
- La transmission apparaît dans la grande majorité des cas être de type autosomique récessive, avec des formes modérées chez certains individus hétérozygotes.
- Les apparentés hétérozygotes sont asymptomatiques mais l'épreuve d'effort révèle dans certains cas des troubles du rythme ventriculaire, justifiant la mise en place de traitement préventif. L'identification de troubles de rythme à l'effort chez les patients porteurs hétérozygotes est inconstante. A ce jour, il n'existe pas de corrélation entre la nature de la mutation et la susceptibilité arythmogène chez les porteurs hétérozygotes. La réalisation d'un bilan para-clinique rythmologique extensif, associé à l'enquête génétique, prend toute sa place dans ce contexte lors de l'enquête familiale.
- La nature des mutations identifiées est très hétérogène. Si nous considérons l'ensemble des mutations connues, données de l'étude et données bibliographiques, 23 mutations distinctes ont été identifiées à ce jour, quelques unes étant récurrentes. On dénombre 11 mutations faux-sens, 1 mutation non-sens, 4 micro-délétions, 7 altérations de l'épissage dont six aboutissant à un codon stop prématuré. Onze mutations sont donc associées à un codon stop prématuré, une à une délétion exonique en phase et onze faux-sens. Les mutations apparaissent réparties sur l'ensemble du gène (Figure 42, p 128). Seuls les exons 2, 8 et 11 ne sont pas concernés. Les mutations faux-sens sont situées dans les trois domaines thiorédoxine-like et nous rapportons dans ce

travail la première mutation faux-sens située dans la séquence du peptide signal, dont le caractère pathogène reste cependant à valider. Aucune mutation n'est située dans la queue C-terminale (AA 371-399).

L'existence de variants de signification inconnue, variation synonyme ou intronique à l'extérieur des sites accepteur AG et donneur GT, montre l'intérêt de l'étude par minigène de ces variations sur l'épissage, en l'absence d'ADNc disponible. Les IPS représentent également une source d'étude potentielle de l'ADNc du gène d'intérêt. L'implication de ces variations dans l'expression des phénotypes sévères chez les probands permet de mieux comprendre l'expression de la maladie chez les probands et l'absence de symptômes chez d'autres membres de la famille. Elle permet également de mieux comprendre la présence d'anomalie à l'épreuve d'effort chez les apparentés porteurs hétérozygotes de ce variant alors qu'ils ne portent pas la seconde variation.

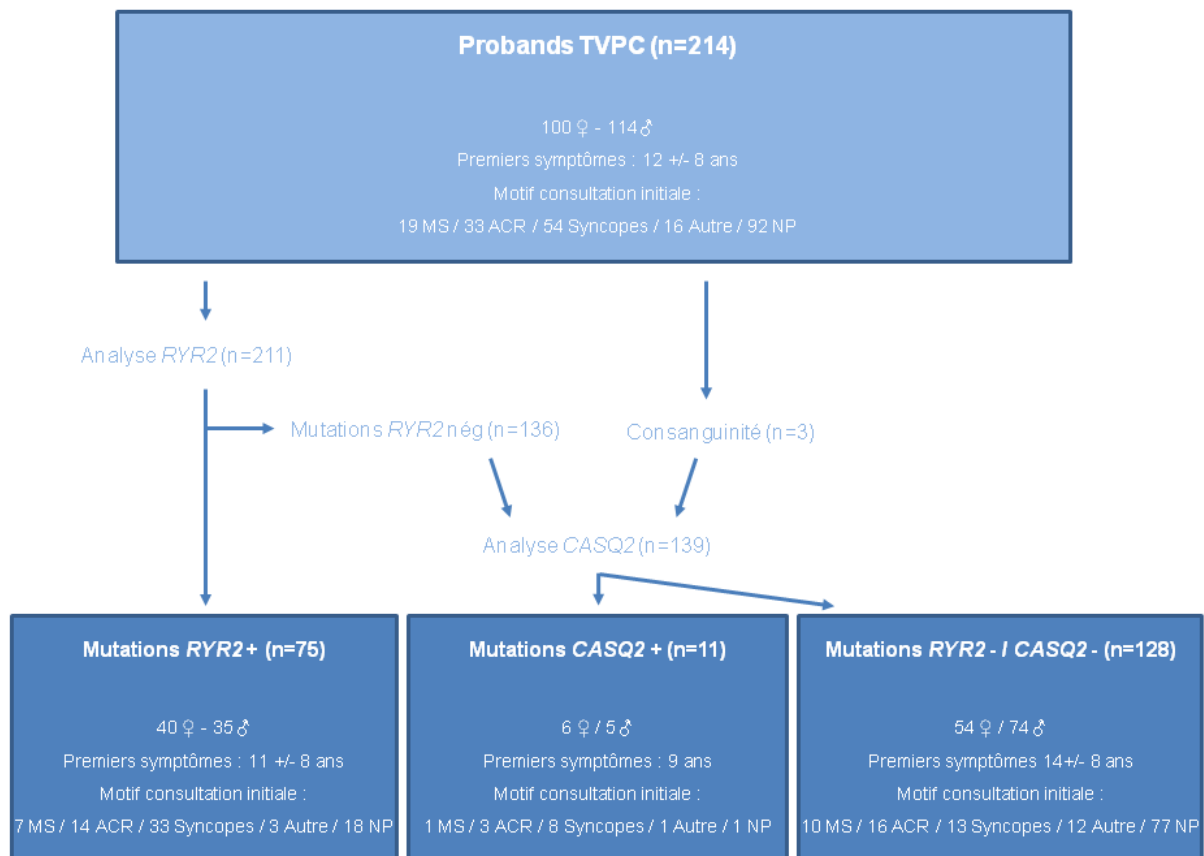
- Sur un plan physiopathologique, les mutations entraînant l'apparition d'un codon stop prématuré sont probablement associées à une perte quantitative de la protéine à la suite d'une dégradation de l'ARN messager ou de la protéine tronquée. Les études réalisées présentées dans l'introduction bibliographique montrent que les mutations faux-sens semblent pouvoir également être associées à un défaut quantitatif (Song et al., 2007). Cette diminution de la protéine mutée pourrait s'expliquer par une dégradation de la protéine non fonctionnelle. On peut imaginer que le phénotype est lié éventuellement à un effet seuil fonction de la quantité de Casq2 fonctionnelle résiduelle pour les sujets hétérozygotes.

La cohorte actuelle de patients porteurs de mutations du gène *CASQ2* apparaît encore trop limitée pour identifier des corrélations phénotype-génotype. L'étude des polymorphismes fréquents en plus des mutations pourra peut-être apporter un début de réponse à la susceptibilité des individus hétérozygotes lors de l'épreuve d'effort.

III. Conclusion partie 1

L'analyse des gènes *RYR2* et *CASQ2* dans la population cible a permis d'identifier des mutations chez 40% des probands analysés (Figure 46).

Figure 46. Résumé de l'analyse des gènes *RYR2* et *CASQ2* chez les 214 probands analysés.



MS : mort subite / ACR : arrêt cardio-respiratoire / NP : non précisé / ♀ : femme / ♂ : homme

La moyenne d'âge de survenue des premiers symptômes varie de 9 à 14 ans mais les différences ne sont pas statistiquement significatives. La proportion d'ACR et morts subites est estimée à 40% chez les patients porteurs de mutations *RYR2* ou *CASQ2*. La quantité de données manquantes est trop importante sur le motif de consultation initial pour regarder si la proportion d'ACR et morts subites est différente chez les patients porteurs de mutations et ceux sans mutation identifiée. Il est prévu de compléter les informations manquantes afin de pouvoir réaliser des analyses informatives car la taille des échantillons est suffisante.

Nous n'avons pas pu faire ressortir de phénotype particulier selon le gène impliqué ou

l'absence de mutation identifiée. Une meilleure définition des tableaux cliniques et une augmentation des données actuelles est nécessaire afin de pouvoir rechercher à identifier une corrélation phénotype-génotype éventuelle.

En dehors de ces perspectives générales, nous retiendrons deux observations particulières :

1. L'existence de mutations du gène *RYR2* présentes en mosaïques dans les cellules germinales justifie le dépistage génétique systématique des individus d'une fratrie, même en l'absence de mutation détectée chez les parents du proband (Roux-Buisson et al., 2011a).
2. L'identification d'une mutation du gène *CASQ2* sur un seul allèle lors de l'analyse génétique du proband doit faire rechercher une seconde variation potentiellement pathogène (variation intronique profonde, variation synonyme..., (Roux-Buisson et al., 2011b).

L'apparition de techniques à haut débit peut laisser espérer l'extension de l'analyse du gène *RYR2* à l'ensemble des régions codantes, ainsi que la recherche de la délétion de l'exon 3 en MLPA (multiplex ligation probe assay) pour permettre une amélioration du taux de détection des mutations.

Compte-tenu des difficultés diagnostiques et de chevauchement phénotypiques (phénocopies), l'inclusion d'un nombre de gènes plus important dans la TVPC sera également à envisager de manière plus régulière (*RYR2*, *CASQ2*, *KCNJ2*, *ANK2* ...).

Au total, il reste qu'aucune mutation n'avait été identifiée chez plus de la moitié des probands que nous avons analysés. C'est dans cette population que nous avons entrepris de rechercher des mutations dans de nouveaux gènes.

Partie 2. Etude de nouveaux gènes

I. Etudes génétiques

1. Population étudiée

Aucune mutation de *RYR2* ou *CASQ2* n'avait été identifiée chez 128 des 214 probands inclus dans cette étude. Nous avons recherché des mutations des gènes candidats *FKBP1B*, *ASPH* et *TRDN* chez 97 d'entre eux et 31 n'ont pas été étudié en raison d'une quantité insuffisante d'ADN disponible. Les deux probands pour lesquels une seule mutation à l'état hétérozygote du gène *CASQ2* avait été identifiée ont également été analysés.

L'âge de survenue des premiers symptômes chez les patients analysés se situe entre 2 et 37 ans (âge moyen 16 ans +/- 9,7). Sept probands inclus étaient décédés de mort subite ou de complication post-ACR. Parmi les 92 probands survivants, le motif de consultation initial était un arrêt cardiaque dans 11 cas, les autres patients ayant présenté des syncopes (n=14) ou des signes moins spécifiques (crises convulsives, palpitations, dyspnée, malaises, n=13) dans un contexte de stimulation adrénergique. Pour 54 patients, le motif de consultation initial n'était pas précisé. Des antécédents familiaux de mort subite sont rapportés chez 11 probands.

2. Exclusion des gènes candidats *FKBP1B* et *ASPH*

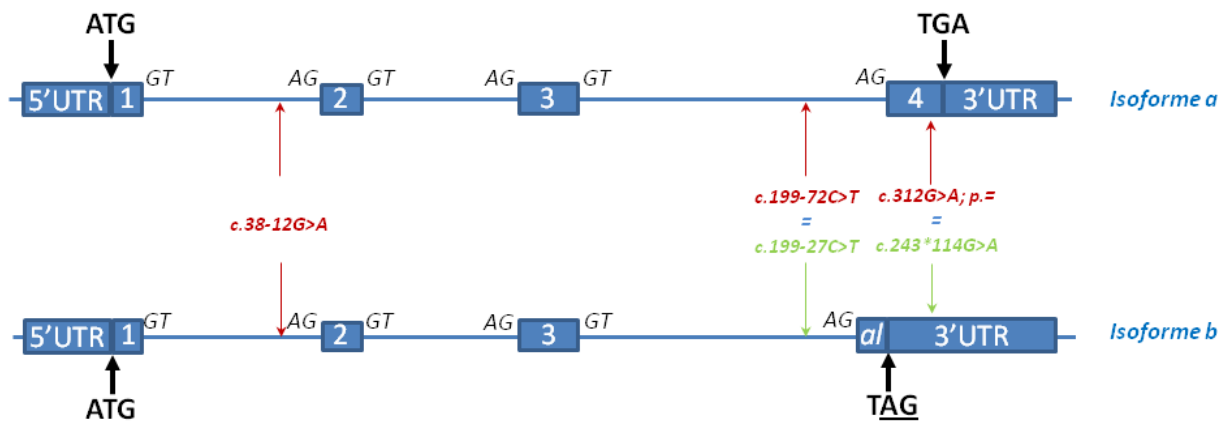
➤ Analyse moléculaire du gène *FKBP1B*

Nous avons identifié trois variations hétérozygotes non répertoriées dans le gène *FKBP1B* chez 3 probands (Figure 47, tableau 17) :

- c.38-12G>A
- c.199-72C>T (isoforme a, NM_004116.3) ou c.199-27C>T (isoforme b, NM_054033.2)
- c.312G>A ; p.= (isoforme a, NM_004116.3) ou c.243*114G>A (isoforme b, NM_054033.2)

Les variations sont ensuite toujours désignées par leur position sur l'isoforme a.

Figure 47. Représentation des variations identifiées sur le gène *FKBP1B*.



Il existe deux isoformes de la calstaine 2 issues de l'épissage alternatif du gène *FKBP1B*, présente en quantité relativement équivalente dans le tissu cardiaque humain. L'isoforme a est désignée comme l'isoforme de référence. L'isoforme b résulte d'un épissage alternatif avec une rétention de 45 pb (*al*) incluant un codon stop (TAG). Le AG du codon stop de l'isoforme b constitue le site accepteur du dernier exon de l'isoforme a. Les variations trouvées chez les patients sont indiquées en rouge sur l'isoforme a et b si la séquence de l'ADNc est commune, en vert sur l'isoforme b si l'épissage est spécifique.

La variation c.38-12G>A a été identifiée à l'état hétérozygote chez un proband, âgé de 20 ans, qui avait décrit des malaises et des palpitations à l'effort depuis l'âge de 12 ans, sans syncope vraie (fam 86). L'épreuve d'effort avait révélé une tachycardie ventriculaire polymorphe non soutenue, évocatrice de TVPC. Ce patient est par ailleurs également porteur d'une délétion c.546delT hétérozygote dans l'exon 5 de *CASQ2*, responsable d'un décalage du cadre de lecture à partir du codon 182, entraînant un codon stop prématuré en position 209 dans la protéine (arbre généalogique, Fam 86, figure 41, p.127).

La variation intronique c.199-72C>T située dans l'intron 3 a été identifiée chez un enfant de 8 ans décédé des complications neurologiques d'un arrêt cardiaque survenu lors d'un effort intense (fam 87). Les troubles du rythme d'origine ventriculaire enregistrés lors de la réanimation n'ont pas permis d'orienter avec certitude le diagnostic. Dans les antécédents personnels était rapporté un syndrome de Wolf-Parkinson-White, sans hypertrophie cardiaque associée. Dans les antécédents personnels, on retiendra le décès subit de son grand-père paternel à 57 ans.

La variation synonyme c.312G>A a été identifiée chez une jeune patiente de 17 ans vue en consultation au centre de référence de Nantes pour un bilan de malaises non spécifiques d'allure vagale depuis l'âge de 15 ans (fam 88). L'épreuve d'effort montrait des extrasystoles ventriculaires polymorphes avec quelques doublets et triplets dont le caractère bidirectionnel a fait évoquer une TVPC. Aucun antécédent familial n'a été rapporté. Cette variation est située dans l'exon 4 de l'isoforme a de la protéine. L'exon 4 est codant uniquement dans cette isoforme de *FKBP1B* et la variation est localisée dans la région 3'UTR de l'isoforme b.

Tableau 17. Résumé des données cliniques et des variations du gène *FKBP1B* identifiées chez trois probands.

Famille	Variations identifiées cDNA (NM_004116.3)	Mutations identifiées protéines	Premiers symptômes (âge)	Symptômes	Paraclinique (Epreuve d'effort)
86	c.38-12G>A	Altération de l'épissage ?	12	Malaise et palpitations à l'effort et à l'émotion	TVP non soutenue
87	c.199-72C>T	Altération de l'épissage ?	8	Décès par arrêt cardiaque à l'effort	FV lors de la réanimation
88	c.312G>A ; p.=	Altération de l'épissage, défaut régulation 3'UTR ?	15	Malaises répétés d'allure vagale	ESV bidirectionnelles

ESV : extrasystoles ventriculaires / TVP : tachycardie ventriculaire polymorphe / FV : fibrillation ventriculaire

Aucune de ces trois variations ne présente un caractère pathogène évident :

- Les deux variations, c.38-12G>A et c.199-72C>T, se situent dans des régions non codantes, à distance des sites accepteurs les plus proches.
- La variation synonyme c.312G>A est située dans la région codante du dernier exon de l'isoforme a dont elle ne modifie pas la traduction et dans la région non codante 3'UTR de l'isoforme b.

Nous avons étudié *in silico* l'effet de ces variations sur la reconnaissance des sites d'épissage à proximité. Les résultats présentés dans le tableau 18 montrent qu'aucun logiciel ne prédit un impact pathologique d'une des variations identifiées.

Tableau 18. Etude bioinformatique de l'effet des variations identifiées sur l'épissage du gène *FKBP1B*.

Exon	Variant	Logiciels	Score du site naturel		Effet prédit de la variation
			Séquence référence	Séquence avec variation	
2	c.38-12G>A	GeneSplicer	13.67	12.69	Aucune modification, pas de création de site
		NetGene2	0.68	0.49	Aucune modification, pas de création de site
4	c.199-72C>T	GeneSplicer	8.95 / 0	8.88 / 0	Aucune modification, pas de création de site
		NetGene2	0.47 / 0	0.47 / 0	Aucune modification, pas de création de site
4	c.312G>A	Genesplicer	8.95 / 0	8.95 / 0	Aucune modification, pas de création de site
		NetGene2	0.47 / 0	0.47 / 0	Aucune modification, pas de création de site

^a Seuil de reconnaissance d'un site accepteur : GeneSplicer : 1.01 / NetGene2 : 0,2 / ASSA : 0

Lorsque deux scores sont indiqués, le premier concerne le site accepteur de l'exon 4 de l'isoforme a et le deuxième l'exon alternatif de l'isoforme b.

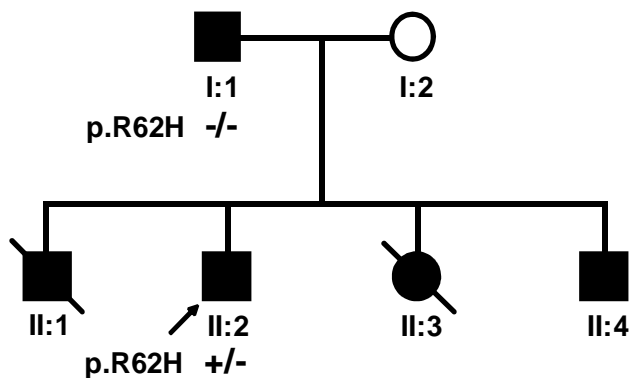
Au total, nous n'avons identifié aucune variation présentant un caractère pathogène évident dans le gène de la calstabile. Il serait néanmoins intéressant de regarder si l'une des variations modifie un motif de reconnaissance de facteurs d'épissage (séquences ESE, ESS, ISE, ISS) ou

une régulation de la région 3'UTR. En l'absence de mutations délétères manifestes identifiées, nous n'avons pas retenu le gène *FKBP1B* dans la TVPC.

➤ Analyse moléculaire du gène *ASPH*

Après analyse de la cohorte, une seule variation non répertoriée du gène *ASPH* a été identifiée chez un patient (ind II:2, proband, fam 89, figure 48). Il s'agissait d'un individu de 18 ans, asymptomatique, présentant un allongement paroxystique de l'intervalle QT alors que le tracé de l'électrocardiogramme de repos était normal. Ce patient avait bénéficié d'un bilan cardiaque en raison de lourds antécédents familiaux. Dans la fratrie, son frère cadet (ind II:1) et sa sœur (ind II:3) sont en effet décédés subitement à 16 et 26 ans respectivement. Son frère aîné survivant (ind II:4) et leur père (ind I:1), asymptomatiques également présentaient un tracé électro-cardiographique analogue au sien. Un traitement préventif β -bloquants a été initié, compte-tenu de l'allongement de l'intervalle QT et du contexte familial. L'analyse de la famille était en faveur d'un mode de transmission dominant de la maladie.

Figure 48. Arbre généalogique de la famille 89.



Les symboles noirs barrés représentent les individus décédés par mort subite. Les symboles noirs non barrés, les individus asymptomatiques présentant un allongement du QT paroxystique, le cercle blanc figure la mère du proband avec un bilan négatif. La présence de la variation faux-sens identifiée chez le proband pR62H est indiquée par + pour un allèle, et son absence par -.

L'analyse des gènes *KCNQ1* et *KCNH2* impliqués dans le syndrome du QT long congénital de type 1 et 2 respectivement n'a pas permis d'identifier de mutation. Le séquençage du gène *ASPH* a permis d'identifier une variation faux-sens hétérozygote, c.185G>A; p.R62H, située dans l'exon 4 du gène. Il s'agit d'une substitution d'une guanine par une adénine en position 185 sur l'ADNc de l'isoforme longue de la junctine (NM_032467.3). Cette variation est située dans l'exon alternatif, présent uniquement dans l'isoforme longue de la junctine. Elle est associée au niveau protéique à la substitution d'une arginine par une histidine en position 62 de la chaîne d'acides aminés. Cette variation n'a pas été retrouvée parmi 200 chromosomes

témoins et n'est pas répertoriée dans les bases de données de polymorphismes. Cette variation n'a cependant pas été retrouvée chez le père du proband. Ce résultat montrant un défaut de ségrégation entre le variant et la pathologie, nous n'avons pas retenu la variation c.185G>A; p.R62H comme un variant potentiellement causal dans les troubles du rythme identifiés dans cette famille.

Aucun autre variant non répertorié du gène *ASPH* n'ayant été retrouvé dans notre cohorte, cette étude n'a au final pas permis d'impliquer ce gène dans les TVPC. Le gène *ASPH* code pour la junctine, mais aussi pour la junctate et la protéine *ASPH* exprimées dans de nombreux tissus. Seuls les exons 6 et 7 sont spécifiques de la junctine. Une mutation en dehors de ces deux exons serait donc susceptible d'entraîner des défauts protéiques de la junctate et de la protéine *ASPH* associés à une atteinte pléiomorphe, responsable d'un tableau clinique distinct de la TVPC typique.

3. Identification de mutations dans le gène *TRDN*

- Définition des régions codantes pour l'isoforme CT1 chez l'homme.

Au début de ce travail, nous avons réalisé le séquençage du transcrit de CT1 chez l'homme selon la méthodologie décrite dans le chapitre « Matériels et Méthodes » de ce rapport. Ceci nous a permis de définir les régions codantes pour cette isoforme au niveau du gène *TRDN*, correspondant aux régions dans lesquelles nous avons ensuite recherché des mutations dans le génome des patients (Figure 49).

Après reverse transcription à partir d'ARN cardiaque humain témoin, nous avons amplifié par PCR un fragment de 1230 pb à l'aide des amorces *TRDN_1i5* et *TRDN_1R*, et déterminé sa séquence (Figure 49, i). La traduction de la séquence a permis d'identifier un cadre ouvert de lecture, correspondant à une séquence de 286 AA (Figure 49, ii).

Figure 49. Séquences du transcrit et de la protéine CT1, organisation des exons sur le gène *TRDN*.

i. Séquençage du transcrit CT1 à l'aide des amorces TRDN_1i5 et TRDN_1R (1230 pb)

TGCAGAGGAGAGGGCAAAGTTCAACAGGACAACAAAGAAGCAGCAGAAACAGCCAGGAAAACGAAGAGCCCC
 CAGGTTTTGACACAGAACCCTCCACCAGAGTTCTCAAATCCCCAAATACTCTGCAAAGTGCAACTTGACGGGA
 ACTTTTCAACTGACTTTTACTTTTGACGACCACC**ATG**ACTGAGATCACTGCTGAAGGAAATGCATCTACAACCA
 CAACTGTGATAGACAGCAAAAATGGATCTGTGCCCAAATCCCCCGGAAAAGTGCTGAAGAGGACAGTCAAG
 AAGACATAGTGACGACGTTCCAGCTCCCCTGCAGCCTGGCTTCTGGTCATTGCCCTGATAATCAGTGGTCAGCT
 GTTGCCATCGTTATGTTTGTATTTAGTGGATTACAAAACTTTTCAGCAAGCTCTATTGCCAAGATTGGCTCAGA
 TCCTTTAAAACCTGGTACGTGATGCTATGGAGGAAACCACGGACTGGATCTATGGCTTCTTTTCTTTGTTATCTGA
 CATCTCTCATCTGAAGATGAAGAAGATGATGGTGACGAAGATACTGATAAAGGAGAAATAGATGAGCC
 TCCCTTGAGAAAAAAGAAATACACAAAAGATAAGACTGAAAAACAAGAGAAACCTGAAAAGGAAAAATACAAA
 CTAAAGTTACACACAAAAGAAAAAGAAAAAGAAAAAGTAAGAGAAAAAGAAAAACCTGAAAAGAAA
 GCAACTCACAAGGAAAAAATTGAGAAAAAGAAAAACCAGAAACAAAGACACTGGCGAAAGAACAGAAGAA
 AGCTAAGACTGCAGAAAAGAGTGAAGAAAAGACTAAAAAGGAAGTGAAGGTGGAACAGGAGAAAGTGA
 AGCAAAACAGCTGCAAAAAGTAAAAGAAGTACAGAAAACACCATCAAAACCCAAAGAAAAGGAGGACAAAAG
 AAAGCAGCTGTGTCAAAGCATGAACAGAAAAG**GT**AAACATTCAGAGCAGGAGGCTGCCGGAGGTTCTAAGAGA
 ATATTGGGCAAGAAGCACATGCAG**TGA**AATTTAAAAGTTGAAAAAGACCAAAATCAGACTTCAAATGGGGGTA
 AAAGACATTAAGTAAATATATACAGAAAAGAAATACAGTAAATTTGGGAATTAATATTTTATAAAAAATACT
 AAAATGTGTTACAGATCTAAAGGGGCATTTTGAAGTATTTTTAAAAGGGGTTTGGAGGTAGCATCCGAAATCa
 tataaagattgggataaatgtgaatgtttgagatatggaatgtctattaagaggtggaataaa

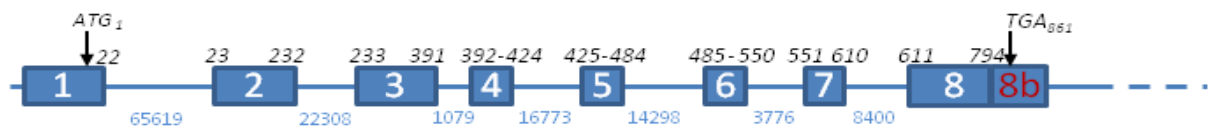
Les séquences des amorces TRDN_1i5 et TRDN_1R sont soulignées sur la séquence. Le codon initiateur est indiqué en rouge. Les séquences correspondant aux exons 1, 3, 5 et 7 sont marquées en bleu et les exons 2, 4, 6, 8 et 8 bis en vert. La séquence de l'exon 8 bis est située entre le GT et le TGA indiqué en rouge. La séquence terminale a été rajoutée à partir de la séquence génomique pour faire figurer le signal de polyadénylation AATAAA 251 pb après le codon stop. Cette séquence est référencée dans la base de données NCBI en tant que : transcript variant 4 mRNA homo sapiens triadin, NM_001256021.

ii. Séquence protéique de CT1 déduite à partir du cadre ouvert de lecture identifié dans le transcrit.

Cette séquence est référencée dans la base de données NCBI en tant que « triadin isoform 4 homo sapiens », NP_001242950.1

MTEITAEGNASTTTTTVIDSKNGSVPKSPGKVLKRTVTEDIVTTFSSPAAWLLVIALIITWSAVAIVMFDLVDYKN
 FSASSIAKIGSDPLKLVLDAMEETTDWIYGFSLSDIISSEDEEDDDGDEDTDKGEIDEPPLRKKEIHKDKTEK
 QEKPERKIQTQVTHKEKEKGEKVKREKEKPEKKATHKEKIEKKEKPKETKTLAKEQKKAKTAEKSEEKTKKEVKGG
 QKEKVKQTAAKVKEVQKTPSKPKEKEDKEKAAVSKHEQKQKHSEQEAAGGSKRILGKKHMQ

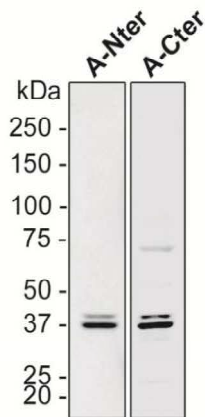
iii. Organisation des exons 1 à 8 bis sur le gène *TRDN*



Les exons sont figurés par des rectangles bleus. Le A de l'ATG est le 1 de l'ADNc et le A du TGA est 861^{ème} nucléotide de l'ADNc. La numérotation sur l'ADNc des bornes intron-exon est indiquée en italique en noir au dessus des exons. (8b = 8bis)

A partir d'homogénats de tissu cardiaque humain témoin, nous avons identifié la présence de la protéine correspondante en immunoblot, en utilisant des anticorps dirigés contre la partie N-terminale de la triadine commune à l'ensemble des isoformes d'une part et contre la partie C-terminale spécifique de cette isoforme d'autre part (Figure 50).

Figure 50. Immunoblot de CT1 humain sur homogénat de tissu cardiaque humain témoin.



30 µg de protéines d'homogénat ont été déposés dans chaque puits sur un gel de polyacrylamide (gradient 5-15%). Après électrophorèse, les protéines ont été transférées sur membrane pendant 2h à 500 mA puis mises à incuber avec des anticorps contre la partie N-terminale (A-Nter) ou C-terminale (A-Cter) de CT1. La révélation montre que les anticorps reconnaissent chacun deux bandes de masse moléculaire apparente de 37 kDa, correspondant le plus probablement à la protéine CT1 et à sa forme glycosylée.

➤ Données cliniques et génétiques

Après analyse du gène *TRDN* dans notre cohorte, nous avons identifié trois variations non répertoriées (Figure 51) :

- c.53_56delACAG; p. p.D18Afs*13 (fam 90)
- c.176C>G ; p.T59R (fam 91)
- c.613C>T ; p.Q205* (fam 91)

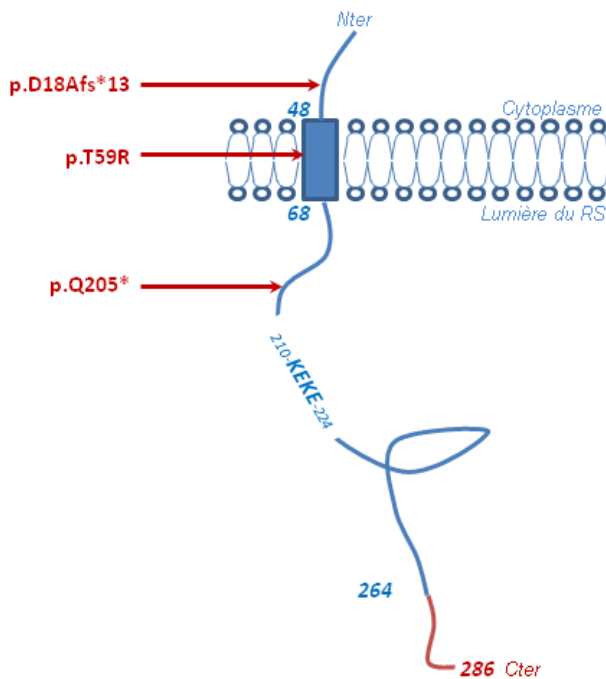
Figure 51. Position des mutations identifiées sur a) le gène *TRDN* et b) représentation sur la protéine CT1.

a. Représentation des mutations sur le gène *TRDN*.



Le gène *TRDN* est figuré par le trait horizontal bleu, les exons par les rectangles bleus numérotés. Les exons 1 à 8 sont communs aux différentes isoformes du gène, l'exon 8 bis (ou 8b) est spécifique à l'isoforme cardiaque CT1. La position des mutations identifiées sont marquées par une flèche rouge. On notera que les 3 mutations sont situées dans la région commune du gène à l'ensemble des isoformes musculaires squelettiques et cardiaque du gène.

b. Représentation des mutations sur la protéine CT1.

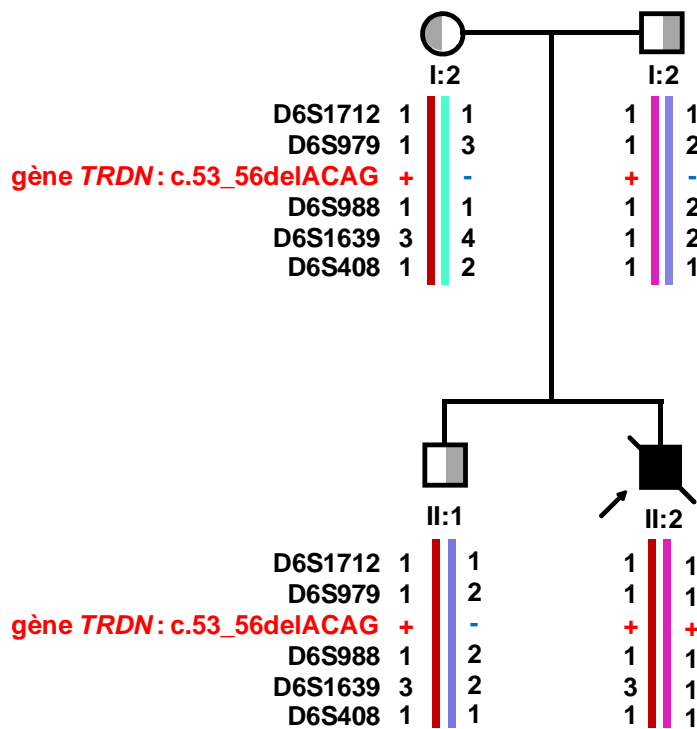


Les trois mutations sont indiquées en rouge. La mutation p.D18Afs*13 induit un codon stop prématuré en position 31, marquée par la flèche sur la protéine, faisant sauter la majeure partie de la protéine en cas de synthèse protéique. La mutation p.T59R induit une substitution au milieu du domaine transmembranaire de la protéine. La mutation p.Q205* entraîne un codon stop prématuré en amont du domaine d'interaction de CT1 avec RyR2 et Casq2, déléant la protéine d'un domaine d'interaction majeur.

- Mutation c.53_56delACAG; p. D18Afs*13

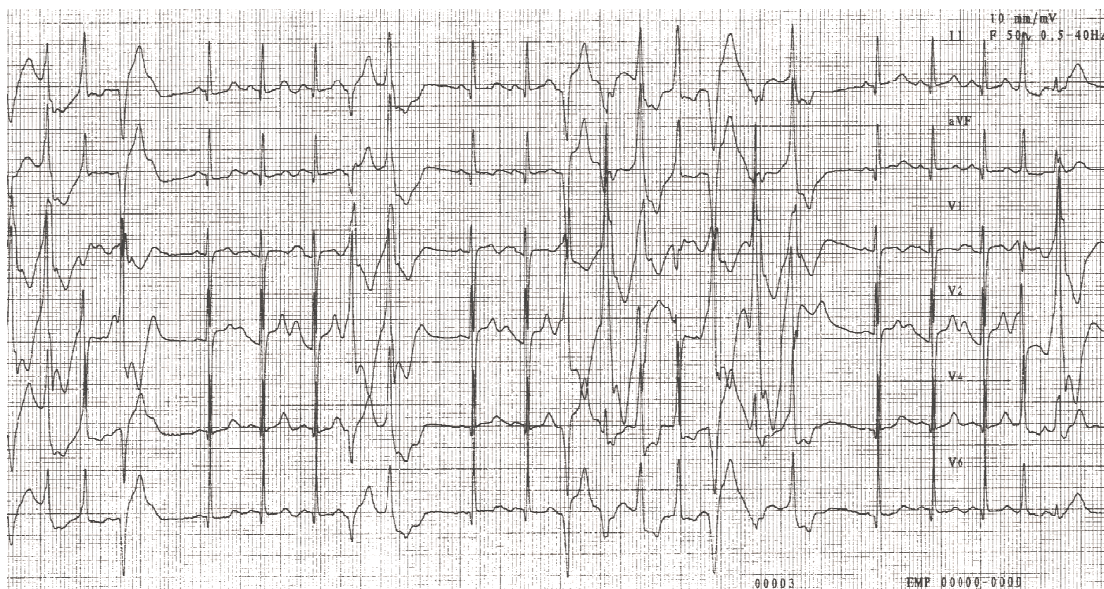
Le proband de la famille 90 (ind II:2, figure 52), porteur de la mutation c.53_56delACAG; p.D18Afs*13, était un enfant de 2 ans décédé des complications d'un arrêt cardiaque survenu dans un contexte de stress adrénergique. L'enfant a présenté une syncope suivie d'un arrêt cardiaque à la suite d'un choc en jouant au ballon. Un rythme sinusal a pu être ré-initié après l'arrêt cardiaque, mais l'enfant est décédé après trois semaines d'hospitalisation en réanimation des complications post-anoxiques de l'arrêt cardiaque. La mise en évidence, après l'arrêt cardiaque, de nombreuses extrasystoles ventriculaires d'aspect polymorphe et la survenue de plusieurs épisodes de tachycardies ventriculaires également polymorphes ont fait évoquer la possibilité d'une TVPC (Figure 53). Aucun antécédent familial n'était connu dans cette famille d'origine guadeloupéenne. Aucune notion de consanguinité n'était rapportée. Les parents et le frère du proband ont pu bénéficier d'un bilan clinique et paraclinique (ECG de repos, enregistrement Holter et épreuve d'effort) qui n'a détecté aucune anomalie du rythme cardiaque. A l'issue de ce bilan, les parents et le frère du proband ont été considérés comme phénotypiquement sains.

Figure 52. Arbre généalogique de la famille 90.



Le symbole plein noir barré marqué par la flèche représente le proband décédé, les symboles demi-remplis en gris les individus hétérozygotes asymptomatiques avec une exploration paraclinique négative. Le statut des individus pour la mutation c.del53_56ACAG est marqué en rouge. Le signe + désigne un allèle muté, le – un allèle sain. Les microsatellites sont indiqués en noir.

Figure 53. Electrocardiogramme du proband lors de l'hospitalisation en réanimation après l'arrêt cardiaque.



Arhythmies ventriculaires polymorphes observées chez l'enfant en réanimation.

L'analyse moléculaire du gène *TRDN* chez le proband a permis d'identifier une délétion homozygote de 4 nucléotides au niveau de l'exon 2, c.53_56delACAG; p.D18Afs*13 (Figures 51 et 52). Cette délétion se traduit au niveau de la séquence d'acides aminés par

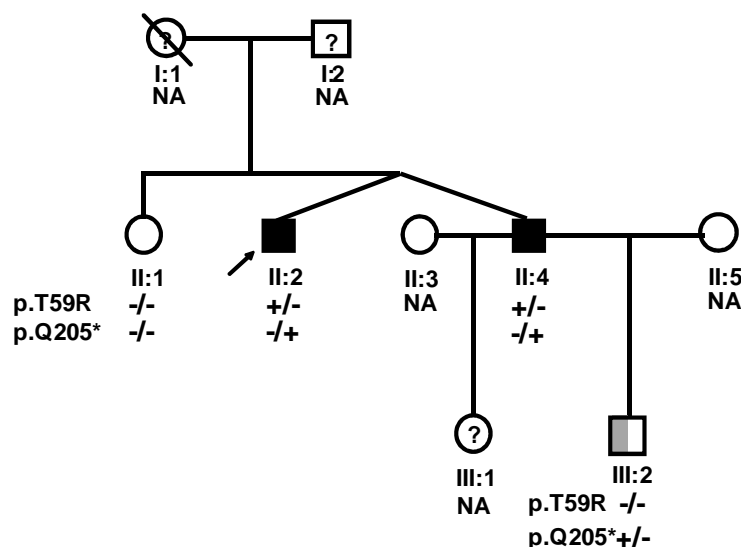
l'apparition d'un codon stop prématuré en position 31, ne conservant qu'un fragment cytosolique de la protéine sauvage, dépourvue de l'intégralité des domaines transmembranaire et luminal de la protéine.

L'étude familiale a montré que la variation était présente à l'état hétérozygote chez les trois apparentés étudiés non atteints. Une étude indirecte, réalisée à l'aide de 5 marqueurs microsatellites juxtagéniques situés en amont et en aval du gène (D6S1712, D6S979, D6S988, D6S1639 et D6S408), a mis en évidence un haplotype quasi-identique au niveau de l'allèle paternel et de l'allèle maternel muté, avec 4 marqueurs identiques sur 5. Ce résultat est en faveur d'un ancêtre commun chez les deux parents du proband, tous deux d'origine guadeloupéenne, pouvant expliquer la mutation commune retrouvée chez eux (Figure 52).

- Mutations c.176C>G; p.T59R et c.613C>T; p.Q205*

Le proband de la famille 91 (individu II:2, figure 54) est un individu âgé de 26 ans au moment de l'investigation génétique, décrivant des épisodes de syncopes à l'effort récurrentes depuis l'enfance.

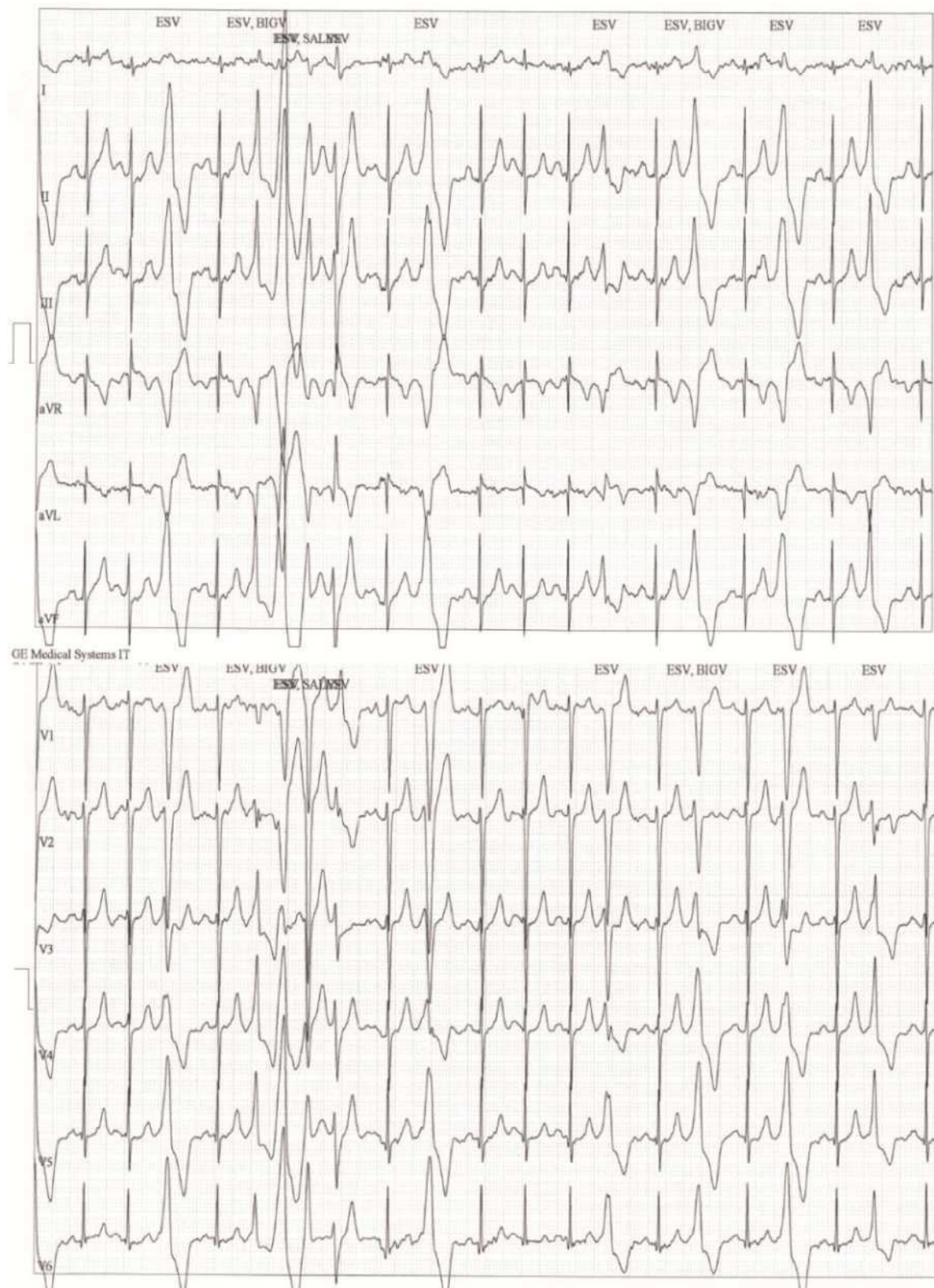
Figure 54. Arbre généalogique de la famille 91 indiquant le phénotype des patients analysés et leur statut génétique.



Les symboles pleins noirs représentent les individus atteints; le symbole demi-rempli en gris un individu hétérozygote asymptomatique avec une exploration paraclinique négative, les symboles blancs les individus asymptotiques non hétérozygotes. Les points d'interrogations et les lettres NA les individus non phénotypés, non génotypés. L'individu I:1 est décédée d'une pathologie néoplasique. Le signe + désigne un allèle muté, le - un allèle sain. Les mutations p.T59R et p.Q205* ont été identifiées sur le gène *TRDN*.

L'ECG de repos était normal, avec en particulier un intervalle QT conservé. L'épreuve d'effort a permis de mettre en évidence de nombreuses extrasystoles auriculaires et de nombreuses ESV bidirectionnelles (Figure 55).

Figure 55. Extrasystoles ventriculaires bidirectionnelles lors de l'épreuve d'effort chez le proband (ind II:2, fam 91)



Son frère jumeau dizygote (ind II:4) a également présenté des syncopes durant l'enfance, avec des troubles du rythme ventriculaires objectivés à ce moment-là alors que l'ECG de repos était normal. Un traitement par le nadolol (40mg/jour) a permis de faire disparaître les

syncopes chez les deux patients. En 2009, le frère du proband (ind II:4), traité par β -bloquants et asymptomatique depuis plusieurs années sur le plan cardiologique, se plaignait de fatigabilité dans les jambes, ayant des difficultés à passer de la position assise à debout et à monter les escaliers. A l'examen clinique, il était obligé de s'aider de ses mains lors de genuflexions. Cependant, un an après, la symptomatologie s'était atténuée et le patient n'a pas souhaité réaliser un bilan plus étendu. Les deux autres membres de la famille investigués, la sœur et le neveu du proband étaient asymptomatiques et n'ont montré aucune anomalie détectable après un bilan cardiologique comprenant un ECG de repos, un enregistrement Holter +/- une épreuve d'effort et une échographie cardiaque (ind II:1 et III:1). Dans les antécédents familiaux, un cousin du côté maternel aurait présenté des syncopes d'effort lors de son service militaire mais aucun bilan clinique n'a été réalisé chez ce patient, ne permettant de rattacher cet antécédent à une TVPC.

L'analyse moléculaire du gène *TRDN* chez le proband (ind II:2) de la famille 91 a permis d'identifier deux variations hétérozygotes non répertoriées dans le gène *TRDN* : une variation faux-sens c.176C>G; p.T59R et une variation non-sens c.613C>T; p.Q205* (Figures 51 et 54). La variation non-sens, située au niveau de l'exon 8, entraîne l'apparition d'un codon stop prématuré en position 205 de la chaîne d'acides aminés, correspondant à une protéine dépourvue du domaine d'interaction physiologique de la triadine avec RyR2 et Casq2. La variation faux-sens p.T59R, située dans l'exon 2 du gène, entraîne le remplacement d'une arginine par une thréonine dans le domaine transmembranaire de la protéine. La nature très conservée de l'acide aminé dans l'évolution, le caractère non-conservatif de la substitution au niveau physico-chimique et la topographie de la variation était susceptible de déstabiliser le segment transmembranaire de la protéine (Figures 51 et 56). L'impact de la variation sur la protéine a été prédit délétère par l'ensemble des logiciels bioinformatiques utilisés (Tableau 19).

L'étude familiale a montré que le frère du proband (II:4), également atteint, était aussi porteur hétérozygote des deux variations. Leur sœur (II:1), indemne au niveau clinique, ne présentait aucun des deux variants. Le neveu du proband (III:2), asymptomatique, avait hérité la variation non-sens de son père, ce qui était en faveur du fait que les variations soient portées par deux allèles différents, hormis la possibilité d'une recombinaison intragénique entre les deux allèles paternels. Il est prévu de réaliser une étude par microsatellites qui pourra éventuellement écarter la possibilité de recombinaison intragénique (selon le degré d'informativité des microsatellites), et permettre d'affirmer avec une certitude complète le statut hétérozygote composite des deux probands. L'analyse familiale n'a malheureusement

pas pu être plus étendue, en particulier, le statut du cousin du proband présentant des antécédents de syncope n'a pas pu être déterminé.

Figure 56. Conservation de la thréonine 59 dans la triadine dans différentes espèces.

[Q13061](#) PAAWLLVIALIIITWSAVAIVMF HUMAN
[Q28820](#) PAAWLLVIALIIITWSAVAVVMF RABBIT
[A6QNN1](#) PAAWLLVIALIIITWSAVAVVMF BOVIN
[Q05BQ8](#) PAAWLLVIALIIITWSAVAIVMF MOUSE
[Q5DVI6](#) PAAWLLVIALIIITWSAVAIVMF RAT
[B1H2G4](#) PVAWLLVGALIVTWSAVIIVVF XENOPE
[A3KNU6](#) PMAWILVLALIIITWSAVAIIMF ZEBRA_FISH

Tableau 19. Etude *in silico* du caractère délétère de la variation p.T59R de la triadine.

Prédiction bioinformatique (seuil)						
SIFT (0,05)	Polyphen	SNPs 3D (0)	Pmut (0,5)	SNPs&GO	SNAP	MutPred (0,75)
NA	Délétère 1,350	Délétère -2,38	Délétère 0,72	Délétère (RI = 7)	Délétère 87%	Délétère 0,78

SIFT n'a pas fourni de prédiction compte-tenu du nombre insuffisant de séquences à aligner.

Le gène *KCNJ2* a également été analysé au niveau de l'ADN des deux probands des familles 90 et 91 sans retrouver de mutation.

Au total, l'analyse de nouveaux gènes dans la TVPC nous a permis d'identifier trois variants non répertoriés du gène *TRDN* dans deux familles. Les résultats des études génétiques réalisées montraient une transmission autosomique récessive de la maladie, associée aux variations de la triadine découvertes dans ces deux familles. Aucune des trois variations identifiées n'a été retrouvée parmi 200 individus contrôles testés, ni dans les bases de données de variations utilisées (NCBI SNP, 1000 genomes project, Genome variation server, Exome Variation Server).

La nature des mutations identifiées est hétérogène. Le caractère pathogène de la variation non-sens p.Q205* et de la microdélétion c.53_56delACAG ; p.D18Afs*13 conduisant à un codon stop prématuré apparaissaient très probable tandis que la nature bénigne ou délétère de la variation faux-sens p.T59R posait plus question. Nous avons donc entrepris la caractérisation fonctionnelle de cette variation à l'aide de modèles cellulaire et animal pour déterminer son impact sur la protéine.

II. Caractérisation fonctionnelle de la variation p.T59R du gène *TRDN*

1. Etudes sur cellules COS-7

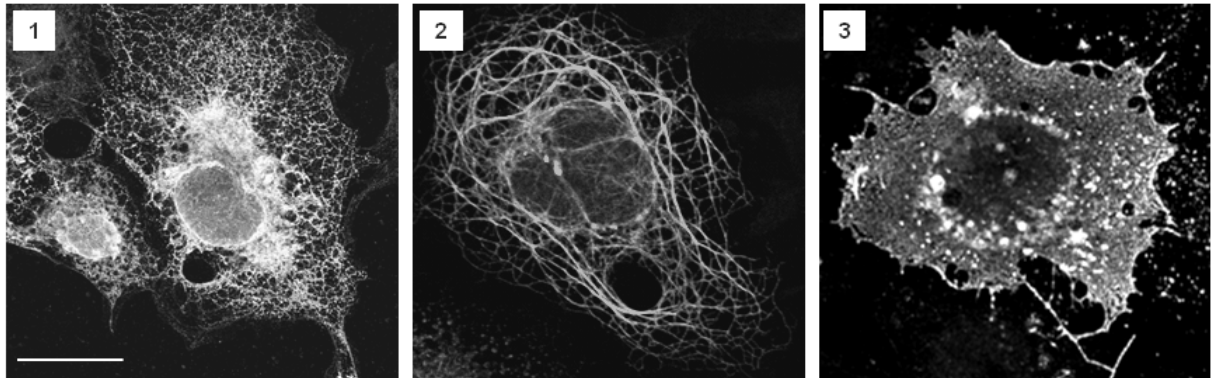
L'effet de l'impact de la variation p.T59R sur la triadine cardiaque CT1 a été étudié dans un premier temps par expression ectopique de la triadine sauvage ou mutée dans une lignée cellulaire non-myogénique, les cellules COS-7. Les phénotypes cellulaires des cellules COS-7 surexprimant CT1 sauvage ou mutée ont été comparés par différentes approches (étude de localisation en immunofluorescence et étude d'expression en immunoblot).

➤ Etudes de localisation

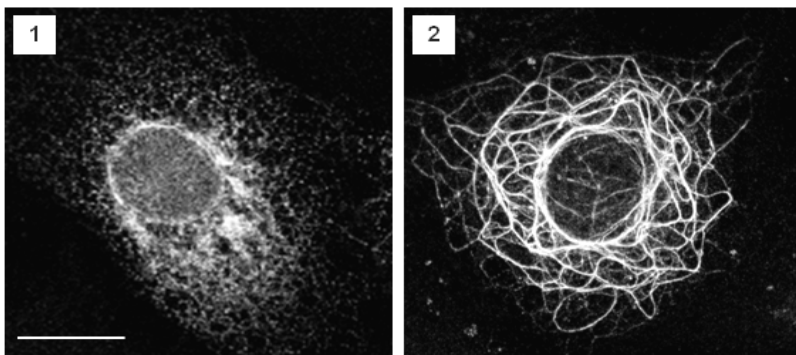
Après transfection de la séquence codante de CT1 de rat sauvage ou mutée dans des cellules COS-7, la localisation de la triadine a été étudiée en microscopie confocale (Figure 57). Cinq cents cellules transfectées ont été analysées pour chaque condition. Dans la grande majorité des cellules exprimant la triadine sauvage (83%), les anticorps marquaient la surface cellulaire, compatibles avec une localisation de la triadine dans ou près de la membrane. Dans une plus faible proportion (17%), les cellules présentaient une fluorescence du réticulum endoplasmique (RE). De manière différente, la triadine mutée présentait une fluorescence exclusivement intracellulaire dans l'ensemble des cellules comptées (100%, n=500 cellules).

Figure 57. Marquage observé dans les cellules COS-7 surexprimant CT1 sauvage de rat ou mutée p.T59R.

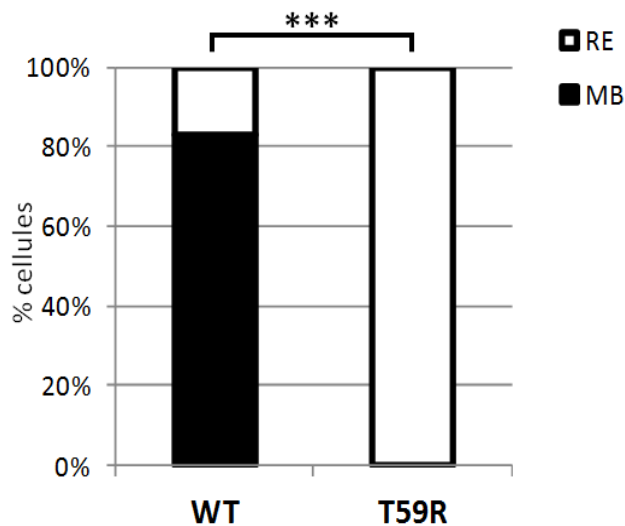
a. COS-7 surexprimant CT1 sauvage



b. COS-7 surexprimant CT1 mutée p.T59R



c. Marquage de CT1 sur 500 cellules COS-7 transfectées exprimant CT1 sauvage (WT) ou mutée (T59R)



La mutation p.T59R induit des différences dans les profils de localisation de CT1 dans des cellules COS-7. Les figures montrent le marquage de CT1 en immunofluorescence indirecte dans des cellules COS-7 exprimant la protéine CT1 sauvage (a) ou mutée (b), après transfection.

(a) Trois profils sont observés pour les cellules exprimant la triadine sauvage. Deux traduisent une localisation intracellulaire : 1) dans un RE présentant un aspect dentelé physiologique ou 2) dans une structure ressemblant à du RE déformé. Le troisième profil correspond à un marquage en faveur d'une localisation de CT1 dans la membrane cellulaire (3). (b) Dans les cellules exprimant CT1 mutée, seulement deux profils ont été observés : 1) dans un RE présentant un aspect dentelé physiologique ou 2) dans une structure ressemblant à du RE déformé. Barre = 20 μ m

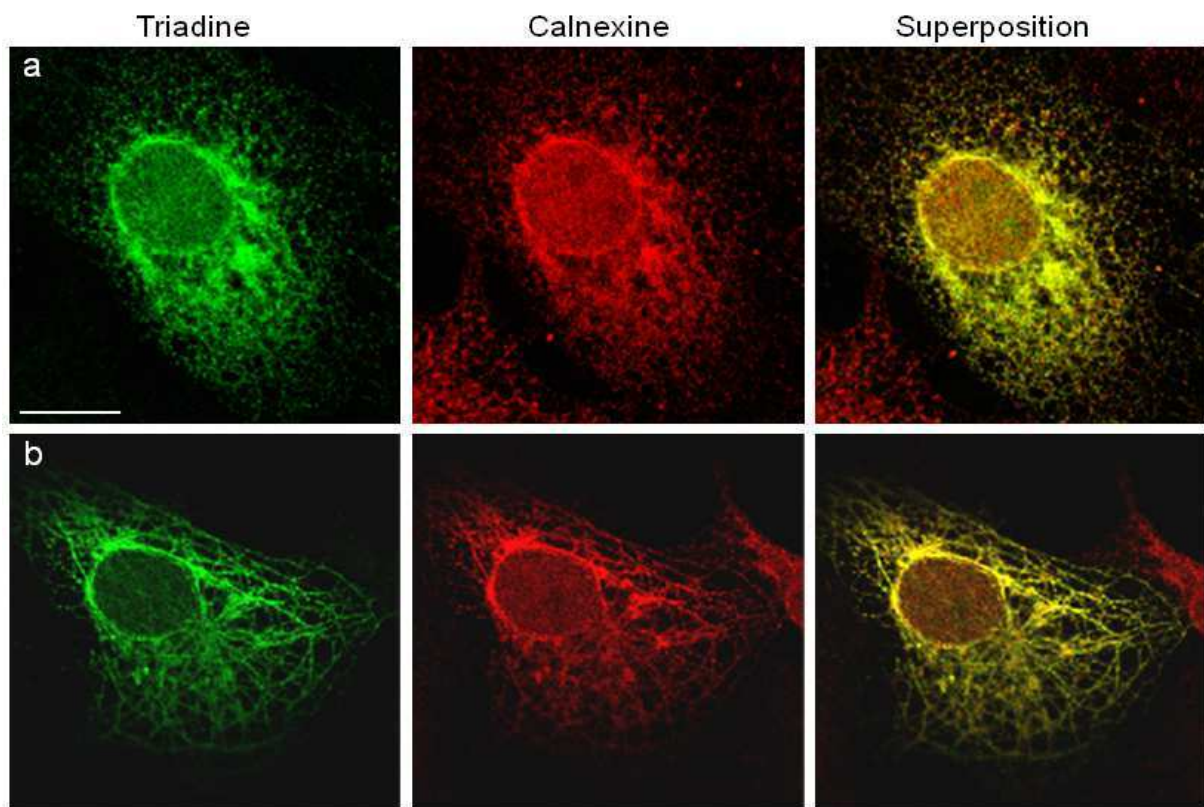
c. L'histogramme indique le pourcentage de cellules transfectées présentant un marquage d'aspect membranaire (MB) ou du RE pour 500 cellules, à partir de 3 expériences. *** $p < 0.0001$, test de Fisher.

De manière intéressante, qu'il s'agisse des cellules exprimant la triadine sauvage ou mutée, le marquage intracellulaire présentait deux aspects différents :

- soit un aspect correspondant au marquage d'un RE intact,
- soit un aspect correspondant au marquage d'un RE déformé.

La localisation de la triadine au niveau du RE a été évaluée par co-immunomarquage de la triadine et de la calnexine, une protéine spécifique du RE. Les résultats obtenus qui montraient une co-localisation de la triadine et de la calnexine dans les cellules, ont permis de confirmer la localisation de la triadine dans le RE, que son aspect soit intact ou altéré (Figure 58).

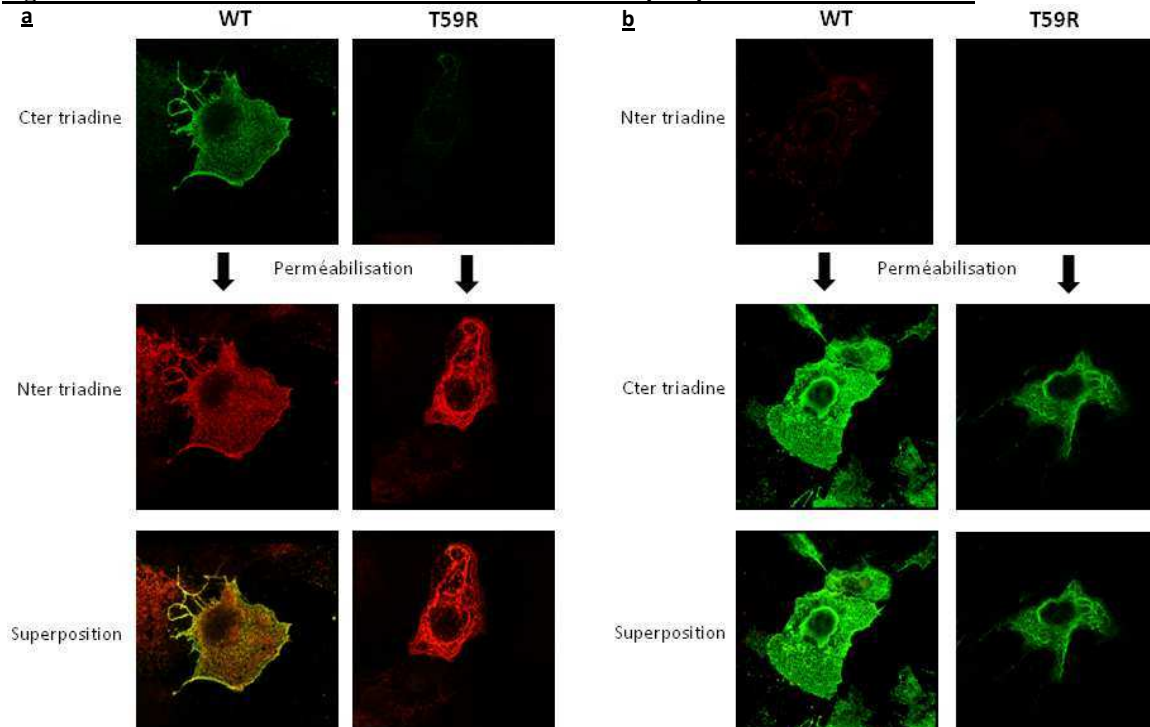
Figure 58. Co-immunomarquage de la triadine CT1 et de la calnexine dans des cellules COS-7 surexprimant CT1.



La triadine CT1 se localise dans le RE et induit une déformation du RE. Les cellules COS-7 ont été transfectées avec de l'ADNc de CT1, puis fixées au méthanol et la triadine et la calnexine ont été marquées à l'aide d'anticorps spécifiques en immunofluorescence indirecte (anticorps anti Nter-triadine (vert), et anti calnexine (rouge)). Deux profils de marquage de la triadine ont été observés en intracellulaire : un aspect de RE normal (a) et un aspect de RE déformé (b). La triadine et la calnexine sont parfaitement co-localisées dans les cellules transfectées, indiquant que les structures déformées proviennent du RE. Ce type de marquage a été observé pour la triadine sauvage ou mutée (données non montrées).

La localisation membranaire de la triadine a été évaluée par deux approches : i) un marquage en immunofluorescence différentielle de la triadine avant et après perméabilisation de la membrane cellulaire et ii) une biotinylation des protéines de surface détectée en immunoblot. Brièvement, l'étude en immunofluorescence a été réalisée comme suit (Figure 59). Après transfection, les cellules ont été fixées puis incubées en présence d'un anticorps anti C-terminal de CT1, la membrane plasmique a ensuite été perméabilisée puis les cellules incubées en présence d'un anticorps anti N-terminal de la protéine. Les résultats montrent pour la triadine sauvage un marquage positif avant et après perméabilisation, traduisant la localisation de la triadine sauvage dans la membrane plasmique avec le domaine C-terminal dans l'espace extracellulaire. La triadine mutée n'est en revanche marquée que par l'anticorps N-terminal mis après perméabilisation. Le marquage inverse a été réalisé, et la triadine était détectée uniquement l'anticorps anti-C-terminal, pour la triadine sauvage et mutée. Ces données mettaient en évidence que la triadine sauvage était insérée dans la membrane cellulaire avec le domaine C-terminal extracellulaire et le domaine N-terminal cytosolique. La triadine mutée était en revanche exclusivement intracellulaire puisque seuls les marquages réalisés après perméabilisation cellulaire s'étaient avérés positifs.

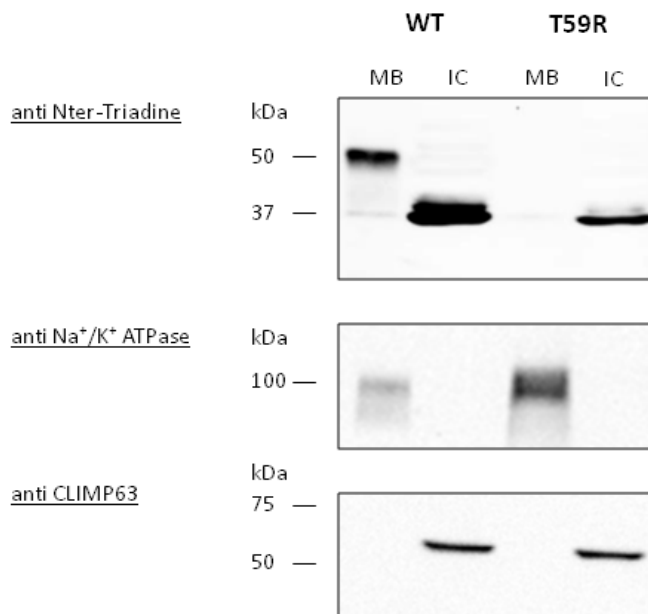
Figure 59. Détection en immunofluorescence de CT1 avant et après perméabilisation cellulaire.



La triadine mutée (T59R) est détectée en IF uniquement après perméabilisation de la membrane cellulaire, signant sa localisation intracellulaire. Par opposition, la triadine sauvage (WT) est détectée en l'absence de perméabilisation cellulaire avec l'anticorps anti Cter-triadine, témoignant de sa localisation dans la membrane cellulaire, avec la partie C-terminale de la protéine extracellulaire. a. Les cellules transfectées avec CT1 sauvage ou mutée, ont été fixées à la PFA, marquées avec un anticorps anti Cter-triadine (vert), puis perméabilisées à la saponine et marquées avec un anticorps anti Nter-triadine (rouge). b. La manipulation inverse de celle décrite en (a) est présentée : marquage des cellules avec un anticorps anti Nter-triadine (rouge), perméabilisation, marquage des cellules avec un anticorps anti Cter-triadine (vert).

L'absence de protéine mutée à la membrane a été confirmée par une expérience de biotinylation des protéines de surface (Figure 60). Les expressions des triadines sauvage ou mutée sont visualisées en immunoblot. La présence de la triadine sauvage est mise en évidence dans les fractions protéiques intracellulaire et membranaire. La protéine mutée est détectée au niveau de la fraction intracellulaire mais elle n'est en revanche pas visible dans la fraction membranaire.

Figure 60. Immunoblot après séparation des protéines intracellulaires et de la membrane cellulaire (par biotinylation des protéines de la membrane cellulaire).



La triadine mutée (T59R) est présente dans la fraction intracellulaire (IC) mais elle n'est pas détectée au niveau de la membrane cellulaire (MB) à la différence de la triadine sauvage (WT) présente dans les deux fractions. Vingt-neuf heures après transfection des cellules COS-7, les protéines de la membrane cellulaire ont été biotinyllées avec un réactif sulfo-NHS-SS-biotine. Les cellules ont ensuite été lysées et les lysats cellulaires incubées en présence de billes agarose-streptavidine pour lier les protéines biotinyllées et séparer la fraction protéique membranaire et intracellulaire. Chaque fraction a été déposée sur gel pour électrophorèse et immunoblot. La révélation de la présence de CT1 a été réalisée à l'aide d'un anticorps anti Nter-triadine. Le shift de poids moléculaire dans la fraction membranaire est lié au groupement sulfo-NHS-S lié aux amines des résidus extracellulaires K, Q, N et R de CT1. La détection de la Na⁺/K⁺ ATPase uniquement dans la fraction de la membrane cellulaire, et de CLIMP63 dans la fraction intracellulaire ont servi de contrôle de l'efficacité de séparation des deux fractions subcellulaires.

Prises ensemble, ces données montrent que la mutation p.T59R affecte la localisation de la triadine après expression artificielle de la protéine dans une lignée cellulaire de mammifère, les cellules COS-7.

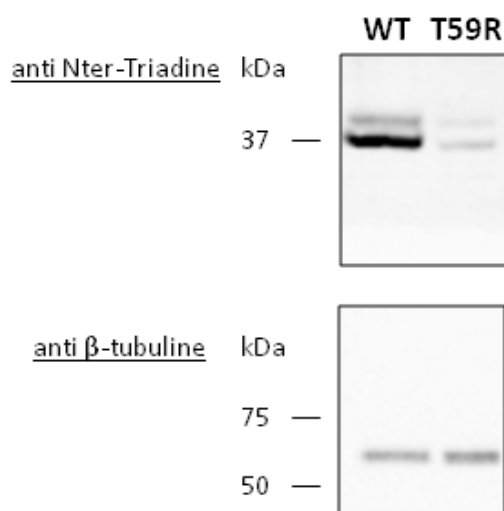
➤ Etudes d'expression

Cette absence d'expression de la protéine mutée à la membrane cellulaire pouvait être due à la rétention de la protéine dans le réticulum endoplasmique ou à une dégradation de la protéine à une étape de sa vie cellulaire.

Deux observations préliminaires ont été en faveur d'une possibilité de dégradation accrue de la protéine mutée. Premièrement, le taux de transfection estimé en immunofluorescence montrait un taux de transfection « apparent » très faible pour les cellules transfectées avec la séquence mutée en comparaison des cellules transfectées avec la séquence de la triadine sauvage. En effet, le taux de transfection respectif des cellules transfectées avec le cDNA de la triadine sauvage atteignait 50 cellules transfectées par champ à l'objectif 10 alors qu'il ne dépassait pas 10 cellules transfectées par champ pour la triadine mutée, montrant une efficacité de transfection apparente moindre pour les expériences utilisant le plasmide contenant la séquence de la triadine mutée. Ces résultats ont été obtenus à partir d'expériences répétées à partir de préparations d'ADN plasmidiques indépendantes.

Deuxièmement, le taux de triadine évalué en immunoblot, à partir d'une même quantité de cellules transfectées, apparaissait beaucoup plus faible pour la triadine mutée que la triadine sauvage (Figure 61).

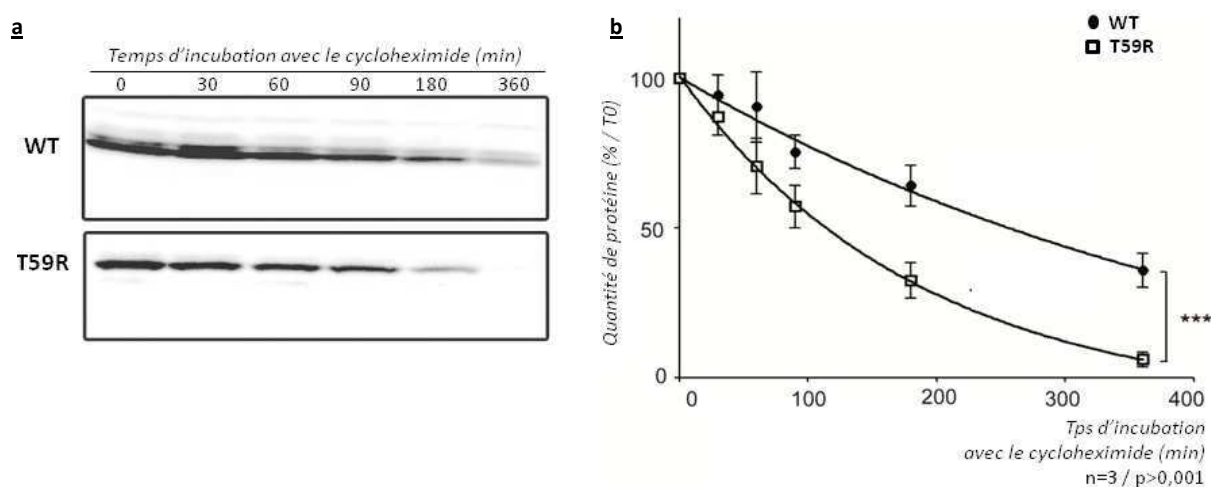
Figure 61. Immunoblot à partir de lysat cellulaire de COS-7 surexprimant CT1.



La triadine mutée semble moins exprimée que la triadine sauvage après transfection de l'ADNc dans des cellules correspondantes. Un dépôt de 20 μ g de protéines a été réalisé dans chaque ligne à partir de lysat cellulaire de cellules COS-7 transfectées avec CT1 sauvage ou mutée. La tubuline a été analysée comme contrôle de la quantité de protéine déposée dans chaque puits.

Des expériences complémentaires ont été réalisées pour étudier l'effet de la mutation sur la stabilité. Pour cela, nous avons réalisé une cinétique en présence de cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique. Les cellules transfectées ont été mises en incubation pendant différents temps avec du cycloheximide et les quantités de CT1 sauvage ou mutée ont été analysées par immunoblots quantitatifs pour chaque temps. Les résultats montrent une différence significative entre la courbe de décroissance de CT1 sauvage et de CT1 mutée, illustrant la stabilité moindre de la protéine mutée dans ce modèle cellulaire (Figure 62).

Figure 62. Etude de la dégradation de la triadine lors de l'inhibition de la synthèse protéique (cycloheximide, CHX).

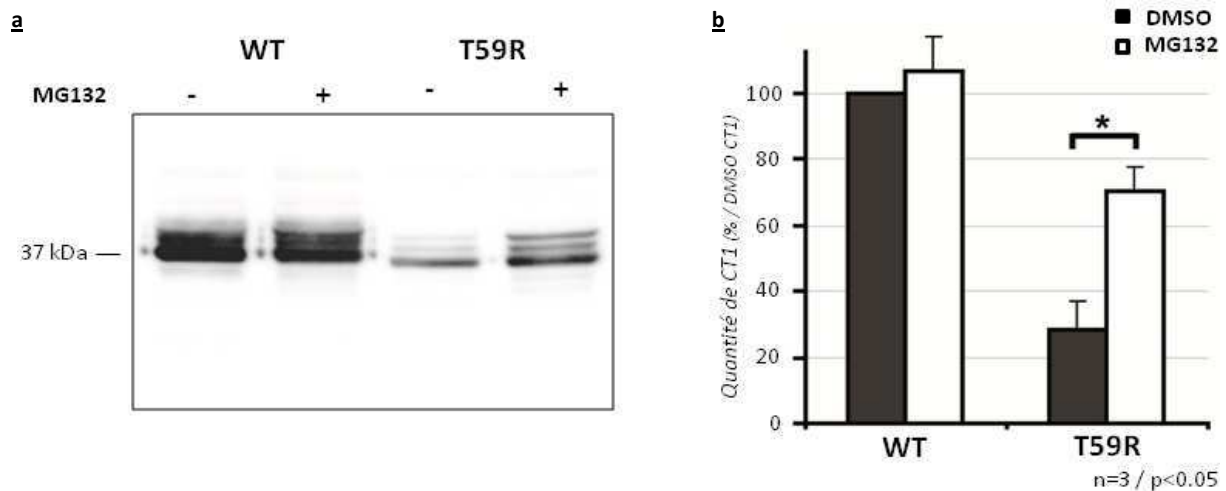


La triadine mutée est dégradée plus rapidement que la triadine sauvage. a. Les cellules COS-7 transfectées avec CT1 sauvage (WT) ou mutée (T59R) ont été incubées avec du CHX pendant 0 à 6h et récoltées. La quantité de CT1 a été analysée en immunoblot avec un anticorps anti Nter-triadine. b. Le graphique montre la quantification relative de CT1 pour chaque temps par rapport à la quantité de CT1 à T₀. Les données de quatre expériences sont incluses (***) p<0,001 ; test de Fisher). Les barres d'erreur indiquent les SEM.

Une seconde approche a été utilisée pour confirmer cette donnée. Nous avons étudié la dégradation de la protéine par le protéasome en examinant l'effet du MG132, un inhibiteur du protéasome, sur la quantité de protéine détectée en immunoblot.

Brièvement, les cellules transfectées ont été mises en incubation pendant 6h avec ou sans MG132 et le taux de protéine évalué en immunoblot. Lorsque la triadine sauvage était considérée, l'inhibition du protéasome n'entraînait pas d'augmentation significative de la quantité de triadine présente par rapport aux mêmes cellules transfectées non traitées au MG132. De manière différente, l'incubation des cellules en présence de MG132 pendant 6h permettait d'augmenter significativement la quantité de CT1 mutée présente de 148% par rapport aux cellules non traitées au MG132 (Figure 63). Ceci montrait que le protéasome intervenait dans la dégradation de la protéine mutée lors de son expression cellulaire, expliquant pour partie ou totalité la différence de stabilité entre la protéine sauvage et la protéine mutée.

Figure 63. Effet de l'inhibition du protéasome (MG132) sur l'expression de CT1.



Le MG132 augmente l'expression de CT1 mutée. a. Immunoblot réalisé en utilisant un anticorps anti Nter-triadine, à partir de COS-7 transfectées avec CT1 sauvage (WT) ou mutée T59R, en absence (-) ou en présence (+) de MG132, 50 μ M 6h (DMSO en contrôle). b. Le graphique montre la quantification relative des valeurs de chaque bande correspondant à l'expression de CT1 correspondant à l'expression de CT1 par rapport l'expression de CT1 sauvage en l'absence de MG132 (WT, DMSO). Les données de trois expériences sont incluses. * $p < 0,05$, test de Student, les barres d'erreur indiquent les SEM.

➤ Discussion des résultats

Ces données ont permis de montrer que la mutation faux-sens p.T59R avait un impact sur la localisation et l'expression de CT1 après expression ectopique de la protéine dans des cellules COS-7.

D'une part, la protéine CT1 mutée n'est pas détectable au niveau de la membrane cellulaire alors qu'il s'agit de la localisation préférentielle de la triadine sauvage. D'autre part, la protéine mutée est dégradée de manière massive, à la différence de la protéine sauvage.

L'hypothèse que nous proposons serait que la mutation, en modifiant la séquence transmembranaire de la protéine, pourrait entraîner une anomalie de l'insertion du domaine transmembranaire dans la bicouche lipidique ou un défaut d'adressage de la protéine. La protéine mal conformée ou mal localisée serait alors dégradée par la voie protéasomale.

La voie majeure de dégradation des protéines dans les cellules est en effet la voie protéasomale. Dans le cas des protéines mal conformées, si elles ne passent pas le « contrôle de qualité » du RE, elles seront dégradées par le processus ERAD (ER-associated-degradation) qui consiste en l'export des protéines dans le cytoplasme où elles seront dégradées par la voie du protéasome (Schroder and Kaufman, 2005a).

Cependant, plusieurs observations posaient les limites d'une étude sur une lignée cellulaire non-myogénique.

Premièrement, la protéine CT1 présente une localisation physiologique dans le réticulum sarcoplasmique des cellules cardiaques, une structure subcellulaire spécialisée absente des

cellules COS-7. Le réticulum sarcoplasmique étant une structure issue du RE, la localisation « attendue » des protéines de ce compartiment lors des expériences réalisées était une localisation dans le réticulum endoplasmique des cellules COS-7. L'expression majoritaire de CT1 au niveau de la membrane cellulaire était inattendue et difficile à expliquer. Toutefois, la triadine ne présente pas de motif identifié de rétention dans le réticulum endoplasmique. Il est donc imaginable que la localisation de CT1 dans le RS soit liée à une interaction avec des protéines du RS absentes des cellules COS-7. Dans ce cas, la triadine au niveau des cellules COS-7 ne serait pas retenue dans le RE et irait à la membrane. Deuxièmement, lorsque la triadine est localisée dans le RE, l'aspect du RE peut être déformé. Il est connu que ce type de déformation, dite en corde (« rope-like structure »), n'est pas lié à une surcharge du RE due à la surexpression d'une protéine. En effet, la surexpression d'une autre protéine du réticulum, RyR1, n'induit pas de structure en corde (données du laboratoire). Il est en revanche décrit lors de l'expression ectopique dans les cellules COS-7 de protéines ayant un rôle dans la morphologie du RE (CLIMP63, REEP-1, (Klopfenstein et al., 1998; Park et al., 2010)). De manière intéressante, cette observation semblerait donc ouvrir la porte à la notion déjà évoquée d'un possible rôle structural de la triadine au niveau du RS, en dehors ou à côté d'un rôle régulateur ou d'interaction avec RyR2 (Marty et al., 2009).

Si les études de localisation ouvrent plusieurs questions, les études d'expression montraient de manière franche, la dégradation accrue de la protéine mutée impliquant le protéasome.

Les études réalisées sur lignée cellulaire ont donc permis d'obtenir différents résultats préliminaires en faveur de l'impact de la mutation p.T59R sur la protéine. Cependant, ce modèle cellulaire était éloigné du cardiomyocyte où est exprimée la protéine de manière physiologique chez l'homme.

Pour étudier l'impact fonctionnel de cette mutation dans un modèle plus proche de la physiologie, nous avons entrepris de considérer l'effet de la mutation sur l'expression et la localisation de la protéine dans des cardiomyocytes.

2. Etudes sur cardiomyocytes primaires

Pour cela, des virus AAV2/9, qui permettent un ciblage cardiaque préférentiel, ont été conçus pour induire l'expression *in vivo* de CT1 de rat sauvage ou mutée. Une injection systémique des vecteurs viraux a été réalisée et, un mois après l'injection, les souris ont été euthanasiées et les cardiomyocytes isolés pour études d'expression et de localisation de CT1.

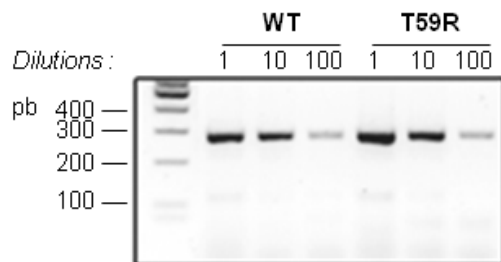
La préparation des cardiomyocytes primaires a été réalisée en collaboration avec l'unité Inserm U1046 de Montpellier.

➤ Etude du niveau d'expression du transcrit CT1

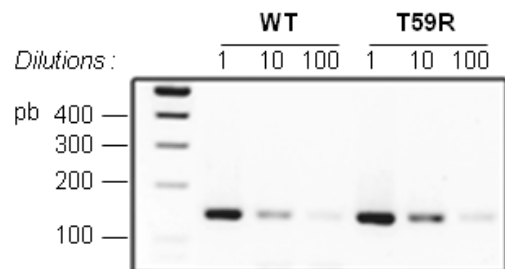
Le niveau d'expression des transcrits étudié par RT-PCR semi-quantitative a montré que le niveau du transcrit de CT1 de rat était identique pour la triadine sauvage et la triadine mutée (Figure 64).

Figure 64. Détection du transcrit CT1 de rat dans les cardiomyocytes de souris KO *TRDN* transduites.

➤ PCR transcrit CT1 rat (250 pb)



➤ PCR transcrit GAPDH souris (136 pb)

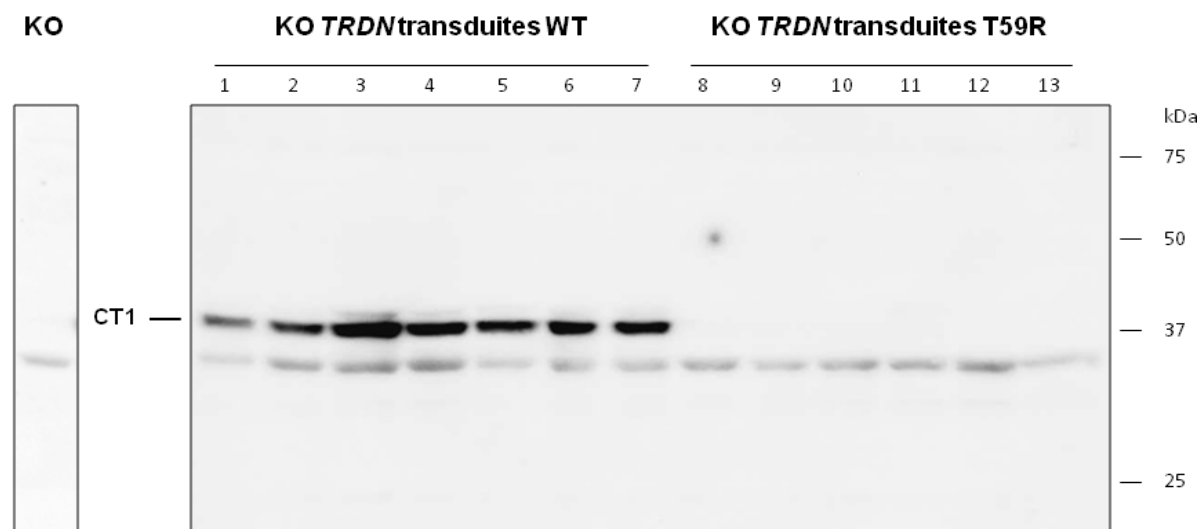


La présence du transcrit est détectée de manière équivalente, par RT-PCR semi-quantitative, dans les souris transduites avec la séquence de CT1 sauvage (WT) ou mutée (MT). La reverse transcription a été réalisée à partir de 500 ng d'ARN total extrait de préparation de cardiomyocytes isolés de souris KO *TRDN* transduites avec CT1 sauvage (WT) ou mutée (T59R). L'amplification du transcrit CT1 de rat a été réalisée avec des amorces spécifiques (T32ratF et R, 250 pb) à partir de l'ADNc pur, ou dilué au 1/10 ou 1/100. Une amplification du transcrit GAPDH de souris a été utilisée comme contrôle à l'aide des amorces GAPDH_F2 et R2 (136 pb). L'absence d'ADN contaminant est contrôlée par l'absence d'amplification d'un produit de 220 pb avec les amorces GAPDH_F2 et R2.

➤ Etude du niveau d'expression protéique de CT1

L'expression protéique a été étudiée par immunoblot à partir d'homogénats de cardiomyocytes. Les résultats ont montré que CT1 était présente dans les cardiomyocytes de souris KO *TRDN* transduites avec l'ADNc sauvage mais que la protéine était indétectable par cette méthode dans les cardiomyocytes transduites avec l'ADNc muté (Figure 65).

Figure 65. Etude du taux protéique de CT1 de rat dans les cardiomyocytes de souris KO *TRDN* transduites.



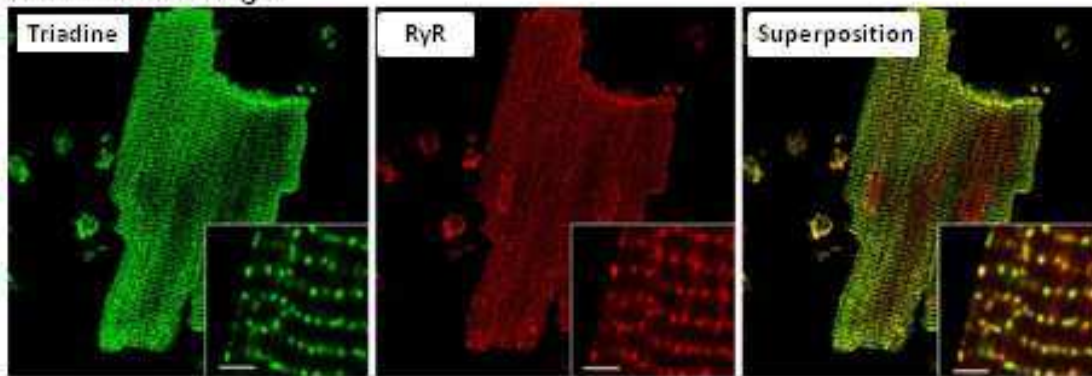
La protéine est détectée chez les souris transduites avec la séquence sauvage de CT1 (lignes 1 à 7) mais chez aucune souris transduite avec la séquence mutée (lignes 8 à 13). L'analyse en immunoblot de CT1 à partir de 100 µg d'homogénat de cardiomyocytes isolés de souris KO *TRDN* transduites avec CT1 sauvage (WT, lignes 1 à 7) ou mutée (T59R, lignes 8 à 13). La protéine CT1 est détectée à l'aide d'un anticorps dirigé contre la partie C-terminale de CT1 et apparaît sous la forme d'une simple ou d'une double bande aux alentours de 37 kDa. La bande supérieure, correspondant à la forme glycosylée de CT1, est présente en quantité moindre et visible en corrélation avec l'intensité du signal de la bande principale (Marty et al., 2009; Vassilopoulos et al., 2005). Une bande non spécifique est détectée, présente également dans les souris KO non transduites (ligne KO, à gauche).

➤ Etude de localisation

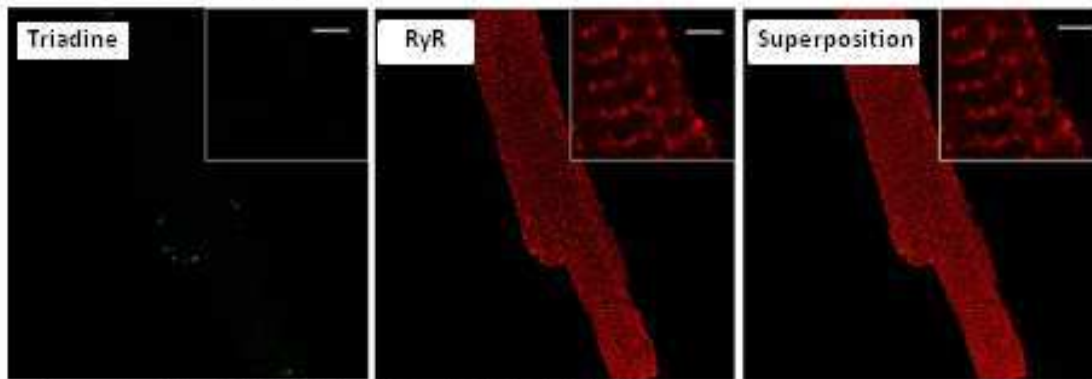
En immunofluorescence, dans les cellules de souris sauvage, CT1 apparaît sous forme d'une rangée de points parfaitement colocalisée avec le RyR au niveau des dyades (Figure 66, panneau a, souris sauvage). Dans la souris KO *TRDN*, le marquage de CT1 est nul tandis que le marquage du RyR est inchangé, toujours localisé à la dyade (panneau b). On peut voir que la transduction de l'ADNc de CT1 sauvage dans les souris permet la réexpression de la triadine et son adressage physiologique aux dyades, où elle co-localise avec le RyR (panneau c). Le marquage observé est strictement superposable à celui observé dans les cardiomyocytes de souris sauvage. Le marquage de la triadine observé dans les cardiomyocytes transduits avec la séquence mutée est négatif, équivalent à celui détecté dans les souris KO *TRDN* (panneau d). L'étude en immunofluorescence n'a donc pas mis en évidence de défaut de localisation de la protéine mutée mais une absence de celle-ci concordante avec les résultats observés en immunoblot.

Figure 66. Co-immunomarquage de la triadine CT1 et du RyR dans des cardiomyocytes isolés.

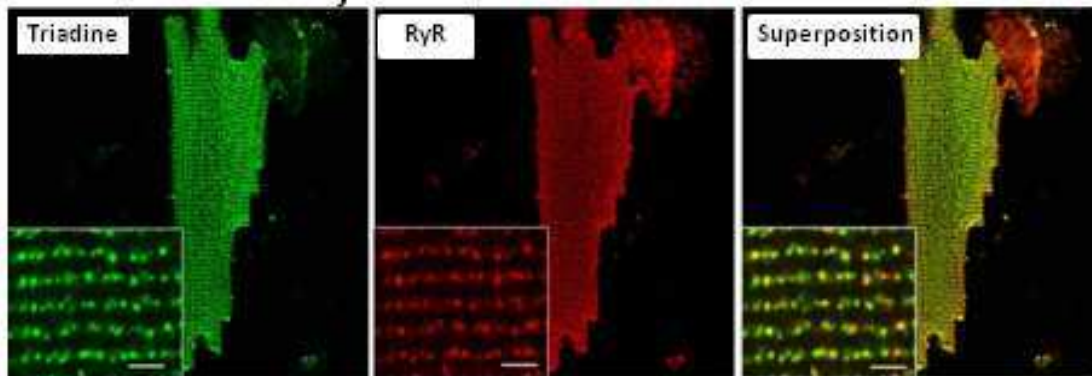
a. Souris sauvage



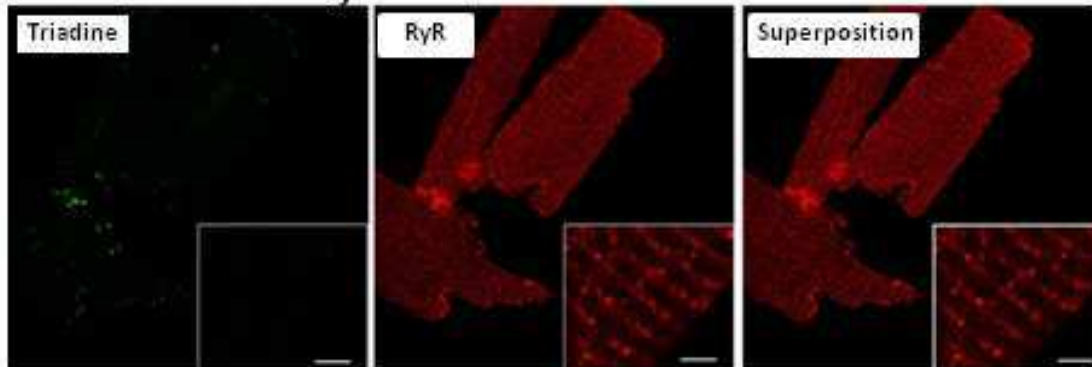
b. Souris KO *TRDN*



c. Souris KO *TRDN* injectée AAV9-CT1^{WT}



d. Souris KO *TRDN* injectée AAV9-CT1^{T59R}



Les cardiomyocytes ont été isolés à partir de a. souris sauvage, b. souris KO *TRDN*, c. souris KO transduite AAV9-CT1 sauvage, d. souris KO transduites CT1 mutée p.T59R. Les cardiomyocytes ont été marqués avec un anticorps anti Cter-CT1 de souris (a et b, vert, alexa 488) ou anti Cter CT1 rat (c et d, vert, alexa 488) et anti RyR (rouge, cyanine 3). Dans l'ensemble des cardiomyocytes, le marquage du RyR est typique d'une localisation à la dyade, avec des alignements de points (voir grossissements dans les encarts en bas à droite des images). Barre : 2µm

Les études sur cardiomyocytes ont donc permis de montrer que la transduction *in vivo* de l'ADNc de CT1 sauvage permet la réexpression de la protéine et sa localisation physiologique à la dyade alors que la mutation empêche sa réexpression à un taux détectable en immunofluorescence ou en western blot.

Les études d'immunofluorescence et d'immunoblot à partir des cardiomyocytes primaires ont été réalisées en collaboration avec Marine Cacheux, doctorante dans mon laboratoire.

3. Interprétation des résultats

Au total, la caractérisation fonctionnelle de la mutation faux-sens p.T59R, située dans le domaine transmembranaire de la triadine, montre que cette mutation entraîne, dans des cellules COS-7 d'une part, une différence d'adressage et une dégradation accrue de la protéine. D'autre part, lors d'études dans un modèle murin déficient en triadine, l'injection de la séquence codante sauvage permet la ré-expression de la triadine associée à une localisation physiologique. La protéine mutée est en revanche indétectable. La mutation induit donc dans un modèle murin une absence de protéine liée soit à un défaut de synthèse, soit plus vraisemblablement à une dégradation de la protéine si on se base sur les données obtenues à partir des COS-7.

Il a été réalisé dans la suite de ce projet des études de l'homéostasie calcique dans des cardiomyocytes isolés de souris sauvage, de souris KO *TRDN*, de souris KO *TRDN* réinjectées AAV9-CT1^{WT} et réinjectées AAV9-CT1^{T59R}. Les résultats obtenus ouvrent des perspectives intéressantes, montrant que les paramètres altérés dans la souris KO *TRDN* sont corrigés par la ré-expression de la protéine sauvage, alors qu'ils demeurent inchangés dans les cardiomyocytes ré-exprimant le transcrit muté (amplitude du transitoire calcique, durée à 50% du transitoire, vitesse de libération du Ca²⁺, charge calcique du RS). Ces données montrent que la mutation p.T59R induit des perturbations de l'homéostasie calcique, similaires à celles observées dans les modèles murins de TVPC (souris KI et KO *CASQ2*, souris KI *RYR2*, (Priori and Chen, 2011)). La correction du phénotype cellulaire par ré-expression de la triadine sauvage suggère une possibilité de perspectives thérapeutiques par transfert de gène à plus long terme. Ces travaux sont issus d'une collaboration entre les unités Inserm U836 et U1046.

III. Discussion-conclusion partie 2

Si la recherche de nouveaux gènes dans la TVPC n'a pas porté ces fruits pour *FKBP1B* et *ASPH*, elle a abouti à l'identification de mutations dans *TRDN*. Il s'agit des premières mutations du gène *TRDN* associées à une pathologie chez l'homme, la TVPC, pathologie héréditaire rare du rythme cardiaque.

On retiendra plusieurs observations :

- La prévalence du gène *TRDN* dans la TVPC est faible, avec deux probands porteurs de mutations sur 99 analysés.
- La transmission de la maladie associée aux mutations de la triadine suit un mode autosomique récessif. L'évaluation rythmologique des individus hétérozygotes permettra de voir si ce statut est éventuellement associé à une susceptibilité arythmogénique, comme cela est rapporté pour les mutations *CASQ2*. Pour note, il existe une suspicion de syncopes à l'effort chez un cousin maternel dans la famille 91, pour lequel aucun bilan n'a pu être réalisé, mais qui pourrait éventuellement être expliqué par l'existence d'un allèle muté.
- Sur un plan phénotypique, la présentation de la TVPC est assez typique dans la famille 91, où la pathologie s'est révélée par des syncopes récidivantes à l'effort dans la grande enfance (> 3 ans pour les deux individus atteints), et la mise en évidence d'ESV bidirectionnelles à l'épreuve d'effort. Il s'agit historiquement de la première famille où nous avons trouvé des mutations. Chez le proband de la famille 90, la pathologie s'est révélée par un arrêt cardiaque inaugural, survenu à 2 ans, ce qui est particulièrement jeune pour une TVPC. La possibilité d'un chevauchement phénotypique avec la mort inattendue du nourrisson serait peut-être à discuter.
- Nous nous sommes posé la question d'une atteinte musculaire éventuellement associée à l'atteinte cardiaque car les trois mutations que nous avons identifiées sont situées dans une région du gène commune aux isoformes cardiaque et musculaires squelettiques de la triadine. A l'interrogatoire, seul un patient (ind II:4, fam 91) a rapporté avoir présenté de manière transitoire une faiblesse musculaire. Le lien de causalité entre les mutations de la triadine et la symptomatologie musculaire n'a pas pu être étudié. Une analyse à partir d'une biopsie musculaire squelettique ou cardiaque d'un patient aurait été extrêmement intéressante pour rechercher des anomalies de

localisation ou d'expression de la triadine, voire pour réaliser de l'imagerie calcique sur cellules musculaire, mais aucun prélèvement n'a pu être obtenu (aucune autopsie réalisée chez l'individu décédé II:2, fam 90, pas de biopsie musculaire chez les ind II:2 et II:4, fam 91).

On peut se poser la question de savoir pour quelle raison l'absence de triadine n'induirait pas de symptomatologie musculaire. Si l'on se rappelle le modèle de souris KO *TRDN*, l'étude de l'expression des protéines du CRC en immunoblot a permis de montrer une chute de la junctine très importante dans le tissu cardiaque alors que son expression est très peu modifiée dans le muscle squelettique. Cet argument semble toutefois fragile puisque des anomalies de l'homéostasie calcique ont été objectivées autant dans les cardiomyocytes que dans les myocytes de muscle squelettique de souris KO *TRDN* et que le modèle murin présente au niveau clinique une faiblesse musculaire associée à des troubles du rythme déclenchés par une stimulation adrénergique.

- A ce jour, le nombre de cas est trop restreint pour tenter d'établir une corrélation génotype-phénotype. Toutefois, on notera que la pathologie s'est traduite de manière plus ou moins sévère selon les mutations portées par les individus atteints. La pathologie a été révélée par un arrêt cardiaque très précoce à 2 ans chez le proband porteur de la mutation homozygote p.D18Afs*13 qui est très probablement associée à une perte totale de la protéine. Par opposition, les deux individus porteurs hétérozygotes des mutations p.Q205* et p.T59R ont présenté une symptomatologie moins sévère et plus tardive. La sévérité moindre des symptômes pourrait éventuellement être liée à la présence de triadine résiduelle chez ces deux individus, soit liée à la mutation faux-sens incomplètement dégradée, soit éventuellement liée à la mutation non-sens qui pourrait échapper au NMD, le codon stop étant situé dans le dernier exon de la triadine cardiaque. On sait de toute manière qu'il existe une hétérogénéité clinique chez les patients porteurs d'une même mutation *RYR2*, ou *CASQ2*.
- La nature des mutations identifiées est hétérogène (microdélétion, mutation non-sens, mutation faux-sens) mais les trois mutations semblent entraîner un défaut quantitatif de triadine, qui serait à l'origine d'anomalie fonctionnelle du complexe de relâchement calcique et des arythmies observées dans les TVPC. La souris KO *TRDN* reproduit ainsi le défaut observé chez les patients et constitue un modèle animal intéressant pour étudier la physiopathologie de la TVPC associée aux mutations de la

triadine chez l'homme. Parmi les bases physiopathologiques de la TVPC, il a été proposé que l'altération de l'interaction de RyR2 avec FKBP12.6 induise un canal « fuyant », secondaire à des mutations de RyR2. Ce mécanisme pourrait être envisagé dans les mutations *TRDN* puisqu'il a été proposé que le déficit en triadine dans la souris KO *TRDN* puisse altérer l'interaction RyR1-FKBP12 dans le muscle squelettique (Eltit et al., 2010). Une telle hypothèse devrait être validée, quoi qu'il en soit, au niveau de l'interaction RyR2-FKBP12.6 dans le cœur. Un autre mécanisme à l'origine de la TVPC serait la diminution de calséquestrine fonctionnelle (diminution de la capacité à lier le Ca^{2+} ,...) ou diminution quantitative de la protéine, observée lors de mutation de *Casq2* (Rizzi et al., 2008; Song et al., 2007). Ce mécanisme pourrait également être envisagé lors de mutations de la triadine puisqu'une chute de l'expression de *Casq2* a été mise en évidence dans les souris KO *TRDN* (Chopra et al., 2009). Enfin, il a été proposé comme hypothèse physiopathologique des troubles du rythme cardiaques observés dans les souris KO *TRDN* que les changements dans la structure et la composition protéique du CRC entraîneraient une diminution du CICR et une altération du rétrocontrôle négatif de la libération de calcium par le RS sur le DHPR. Une entrée de calcium anormale par le DHPR contribuerait à la surcharge calcique du RS, et entraînerait une augmentation de la fréquence de libération calcique spontanée du RS, support connu des arythmies lors de stimulation adrénérgique. Enfin, on notera que la surexpression de la triadine dans un modèle murin provoque également des arythmies ventriculaires déclenchées, faisant évoquer la possibilité de différentes bases physiopathologiques proarythmogènes associées à la triadine (Kirchhefer et al., 2001; Kirchhof et al., 2007).

Il existe donc différents mécanismes physiopathologiques possibles qui peuvent potentiellement participer aux arythmies observées.

Dans les suites de ce projet, il est prévu :

1. d'évaluer la prévalence de la délétion c.53_56delACAG dans la population guadeloupéenne. Pour cela, le Centre Hospitalo-Universitaire de Pointe à Pitre sera contacté pour rechercher cette variation chez des individus contrôles d'origine guadeloupéenne. Il serait également intéressant de savoir s'il existe des patients d'origine guadeloupéenne présentant une histoire évocatrice de TVPC pour rechercher cette mutation.
2. de poursuivre l'étude du gène *TRDN* dans la TVPC. Son étude apparaît

particulièrement indiquée dans les formes récessives, les cas sporadiques négatifs pour *RYR2* et *CASQ2*, et éventuellement dans le cas de symptômes musculaires associés. Il sera intéressant de réaliser un bilan musculaire chez les individus porteurs de mutations du gène *TRDN* dans le cadre de TVPC.

3. Eventuellement d'envisager élargir, dans le cadre d'un protocole de recherche, l'analyse du gène *TRDN* à d'autres pathologies cardiaques héréditaires : mort inattendue du nourrisson, QT long atypique, voire des cardiomyopathies (CVDA, CMH (cardiomyopathie hypertrophique)).

CONCLUSION PERSPECTIVES

La tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique est un trouble du rythme cardiaque héréditaire rare et sévère, responsable de mort subite chez le sujet jeune en l'absence d'anomalie structurale cardiaque sous-jacente. La mortalité peut atteindre 50% avant l'âge de 40 ans. Compte-tenu du risque d'arrêt cardiaque inaugural et de l'existence de traitement préventif, l'intérêt de faire un diagnostic précoce est majeur. Le dépistage familial des individus à risque prend toute sa place dans ce contexte, combinant le bilan rythmologique et l'analyse génétique.

Dans la première partie de mon travail, l'analyse des gènes *RYR2* et *CASQ2* a permis de détecter des mutations chez 40% des probands analysés. Ce chiffre est inférieur aux données de la littérature sur l'analyse des probands montrant une tachycardie ventriculaire bidirectionnelle à l'épreuve d'effort en raison i) d'une moindre spécificité dans les critères d'inclusion des patients (ESV bidirectionnelles polymorphes isolée ou en doublet...) et ii) du fait que l'analyse du gène n'était pas exhaustive. Il est prévu dans ce sens d'améliorer la disponibilité des données cliniques, et surtout d'améliorer l'analyse génétique en analysant l'ensemble des régions codantes du gène *RYR2*, d'inclure la détection de la délétion de l'exon 3 par MLPA (particulièrement dans des tableaux associant des dysfonctions du nœud sinusal ou du nœud auriculo-ventriculaire, ou une cardiomyopathie), d'augmenter le nombre de gènes analysés systématiquement dans la TVPC, en collaboration avec les autres centres de biologie moléculaire (*KCNJ2* et *ANK2* particulièrement).

L'identification de mutations faux-sens dans *RYR2* peut rendre délicate l'interprétation du caractère pathogène de la variation identifiée. Plusieurs éléments aident toutefois grandement à l'interprétation du caractère pathogène ou polymorphe des variants :

- Le taux élevé de néo-mutations dont la probabilité délétère est importante
- L'existence de mutations récurrentes fonctionnellement caractérisées
- La pénétrance élevée des mutations *RyR2*
- Le développement de bases de variants sur de large cohorte de témoins (dont le caractère polymorphes est parfois à relativiser compte-tenu de l'absence de phénotype décrit des individus testés).

Sur un plan clinique, il serait intéressant de tenter de répondre aux différentes questions abordées dans cette thèse pouvant permettre l'ébauche d'une corrélation phénotype-génotype.

Dans un cadre de recherche clinique, il serait intéressant d'envisager, dans le contexte actuel de développement de séquençage haut-débit, l'analyse du gène *RYR2* pour découvrir, confirmer ou infirmer son implication dans d'autres pathologies cardiaques, la CVDA particulièrement, la mort subite inexpliquée de l'adulte jeune, la mort inattendue du nourrisson (Larsen et al., 2012; Mathur et al., 2009; Tester et al., 2007; Tiso et al., 2001). L'implication de *RYR2* dans ces pathologies est régulièrement débattue. La génétique de la CVDA reste complexe avec une faible pénétrance des mutations, des cas de digénisme ou de double mutation compliquant l'interprétation des résultats génétique. A ce jour, *RYR2* apparaît être un gène mineur de la pathologie, celle-ci étant principalement associée à des atteintes de protéines du desmosome. Dans le cas de mort subite avec autopsie négative, il apparaît intéressant de rechercher des mutations des gènes les plus souvent mis en cause (*RYR2*, *KCNQ1*, *KCNH2* et *SCN5A*) particulièrement lorsque les circonstances de survenue de la mort subite sont évocatrices de LQTS ou de TVPC (stress, effort, nage, stimuli sonore). Ces analyses seraient susceptibles de déterminer la cause du décès et de faciliter l'identification des apparentés à risque. Le taux d'identification de mutations de *RYR2* dans ce contexte atteint 15%. La recherche de mutations du gène *RYR2* dans la mort inattendue du nourrisson pourra également peut-être permettre de commencer à comprendre pourquoi les manifestations cliniques de la TVPC se manifeste dans la grande enfance et pas plus tôt.

On retiendra l'existence de mosaïcismes germinale et somatique du gène *RYR2*, à prendre en compte dans le cadre du conseil génétique et la prise en charge des patients. Pour rappel, la possibilité de mosaïcisme somatique constitue un risque théorique d'arythmies chez le patient porteur de la mutation en mosaïque dans ses cellules somatiques, même si la mutation paraît indétectable en PCR-séquençage sur l'ADN leucocytaire. La possibilité de mosaïque germinale chez l'un des parents du proband représente un risque théorique de transmettre l'allèle muté dans la fratrie du proband.

Le gène *CASQ2* est impliqué beaucoup plus rarement (5 %) avec un mode de transmission autosomique récessif de la maladie, classiquement reconnu. La possibilité de formes dominantes reste débattue. Il serait intéressant de rechercher de manière systématique la présence de deux mutations chez le proband dans le cas de présentation clinique typique, les variations ayant un effet incertain sur l'épissage pouvant être étudiées à l'aide de minigène.

Le second objectif de mon travail de thèse était d'identifier de nouveaux gènes dans la TVPC. Nous n'avons identifié aucune mutation retenue comme pathogène dans les gènes *FKBP1B* et *ASPH*. Nous avons en revanche identifié des mutations récessives dans le gène *TRDN*.

Notre travail rapporte les premières mutations du gène *TRDN* impliquées dans une pathologie humaine, la TVPC. Au préalable, nous avons identifié et déterminé la séquence codante de l'isoforme majoritaire cardiaque CT1, ainsi que son organisation sur le génome. Nous avons recherché des mutations au niveau de la séquence codante de CT1 dans le gène *TRDN*. Nous avons identifié trois mutations chez deux probands avec une TVPC. L'étude familiale montrait une transmission autosomique récessive de la maladie associée aux mutations du gène *TRDN*. La nature et la caractérisation des mutations sont en faveur d'un défaut quantitatif de triadine, qui serait à l'origine de la pathologie, conduisant à une dysfonction du CRC et à des arythmies.

Les mutations identifiées dans les arythmies cardiaques sont souvent trouvées dans des gènes codant pour des sous-unités de canaux ioniques. Les mutations identifiées dans d'autres gènes sont beaucoup plus rares et correspondent le plus souvent à des gènes codant pour des protéines régulatrices des canaux ioniques ou impliquées dans leur transport. Les canaux ioniques existent en fait sous forme de complexes macromoléculaires constitués de la, ou des, sous-unité(s) principale(s) formant le pore et de sous-unités auxiliaires. L'assemblage correct du complexe macromoléculaire permet une activité physiologique du canal. Ainsi, le canal RyR2 est au cœur d'un large assemblage multiprotéique, incluant de nombreuses protéines régulatrices cytosoliques comme la calmoduline, FKBP12.6, PKA, CaMKII, PP1, PP2A, PDE4D3 et la junctine, la triadine et la calséquestrine dans le RS (Mohler and Wehrens, 2007). Avec RyR2 et Casq2, CT1 constitue la troisième protéine du CRC impliquée dans la TVPC, soulignant l'importance de ce complexe dans la physiopathologie de la TVPC.

Les mutations des gènes *RYR2*, *CASQ2* et *TRDN* à l'origine de la TVPC montrent l'importance du CRC dans la physiopathologie de cette maladie. Les mutations observées dans *RYR2* sembleraient être associées à un effet « dominant négatif » tandis que les mutations *CASQ2* sont associées à une perte de fonction de la protéine. Les mutations du gène *TRDN* semblent également être associées à une perte de fonction de la protéine.

Au total, le canal calcique RyR2 présenterait une dysfonction associée à une mutation hétérozygote de RyR2 ou consécutive à la perte d'une protéine accessoire du CRC comme la calséquestrine ou la triadine. Les cibles thérapeutiques apparaissent donc les inhibiteurs de RyR2 ou des modulateurs sur les voies de d'inhibition/activation de RyR2, voire à beaucoup

plus long terme la correction de la protéine déficiente par transfert de gène.

Le gène majeur impliqué dans la TVPC reste donc le gène *RYR2*, retrouvé muté dans environ la moitié des cas, associé à une transmission autosomique dominante. Les gènes *CASQ2* et *TRDN* apparaissent beaucoup plus rarement impliqués, peut-être parce que la transmission est autosomique récessive. La poursuite de recherche de mutations du gène *TRDN* permettra de mieux comprendre son implication dans la pathologie et son étude est grandement facilitée au laboratoire par l'existence d'un modèle de souris KO *TRDN*.

La stratégie gène candidat utilisée ici a permis d'identifier un nouveau gène associé à la TVPC mais encore plus d'un quart de cas restent sans mutations identifiées. Cette stratégie ayant montré ses limites, nous nous sommes tournés vers une approche exomique pour poursuivre la recherche de nouveaux gènes impliqués dans cette pathologie. Ainsi, nous avons soumis un projet d'identification de nouveaux gènes impliqués dans la TVPC dans le cadre des appels d'offres « GIS Institut des Maladies Rares – Séquençage Haut débit Plateforme Mutations ». Ce projet est actuellement en cours de réalisation sur la plateforme TAGC à Marseille.

La poursuite des analyses, la découverte de nouveaux gènes, outre l'application directe au niveau diagnostique, permettra de progresser dans la compréhension fondamentale de la maladie, voire d'ouvrir la porte à de nouvelles cibles thérapeutiques.

Sites informatiques

- Bases de données de mutations associées à la TVPC :
- Inherited arrhythmias database : <http://www.fsm.it/.cardmoc/>

- Séquences génomiques, transcrits, séquences protéiques :
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>

- Bases de données de polymorphismes :
- NCBI SNP : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp>
- 1000 genomes project : <http://browser.1000genomes.org/index.html>
- Genome variation server : <http://gvs.gs.washington.edu/GVS/>
- Exome Variant Server : <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>

- Logiciels de prédiction du caractère délétère de variations faux – sens :
- SIFT : <http://sift.bii.aster.edu.sg/>
- Polyphen : <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>
- SNPs3D : <http://www.snps3d.org/>
- Pmut : <http://mmb.pcb.ub.es/PMut/>
- SNPsandGO : <http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/>
- SNAP : <http://www.rostlab.org/services/snap/submit>
- MutPred : <http://mutpred.mutdb.org/>

- Logiciels de prédiction d'épissage :
- NetGene2 : <http://www.cbs.dtu.dk/services/Netgene2/>
- Gene Splicer : http://www.tigr.org/tdb/GeneSplicer/gene_spl.html
- Automated Splice Site Analyses :
http://www.splice.uwo.ca/cgi-bin/protected/menu.cgi?menu_gene.html
- Human Splicing Finder : <http://www.umd.be/HSF/>

- Logiciel de prediction peptide signal :
- Signal IP : <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalIP/>

Bibliographie

- Ackerman, M.J., Priori, S.G., Willems, S., Berul, C., Brugada, R., Calkins, H., Camm, A.J., Ellinor, P.T., Gollob, M., Hamilton, R., *et al.* (2011). HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies: this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Europace* *13*, 1077-1109.
- Aizawa, Y., Mitsuma, W., Ikrar, T., Komura, S., Hanawa, H., Miyajima, S., Miyoshi, F., Kobayashi, Y., Chinushi, M., Kimura, A., *et al.* (2007). Human cardiac ryanodine receptor mutations in ion channel disorders in Japan. *Int J Cardiol* *116*, 263-265.
- Aizawa, Y., Ueda, K., Komura, S., Washizuka, T., Chinushi, M., Inagaki, N., Matsumoto, Y., Hayashi, T., Takahashi, M., Nakano, N., *et al.* (2005). A novel mutation in FKBP12.6 binding region of the human cardiac ryanodine receptor gene (R2401H) in a Japanese patient with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Int J Cardiol* *99*, 343-345.
- Alcalai, R., Wakimoto, H., Arad, M., Planer, D., Konno, T., Wang, L., Seidman, J.G., Seidman, C.E., and Berul, C.I. (2011). Prevention of ventricular arrhythmia and calcium dysregulation in a catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia mouse model carrying calsequestrin-2 mutation. *J Cardiovasc Electrophysiol* *22*, 316-324.
- Bal, N.C., Jena, N., Sopariwala, D., Balaraju, T., Shaikh, S., Bal, C., Sharon, A., Gyorke, S., and Periasamy, M. (2011). Probing cationic selectivity of cardiac calsequestrin and its CPVT mutants. *Biochem J* *435*, 391-399.
- Balser, J.R. (1999). Structure and function of the cardiac sodium channels. *Cardiovasc Res* *42*, 327-338.
- Beard, N.A., Laver, D.R., and Dulhunty, A.F. (2004). Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. *Prog Biophys Mol Biol* *85*, 33-69.
- Bers, D.M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* *415*, 198-205.
- Bezprozvanny, I., Watras, J., and Ehrlich, B.E. (1991). Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* *351*, 751-754.
- Bhat, M.B., and Ma, J. (2002). The transmembrane segment of ryanodine receptor contains an intracellular membrane retention signal for Ca(2+) release channel. *J Biol Chem* *277*, 8597-8601.
- Bhuiyan, Z.A., Hamdan, M.A., Shamsi, E.T., Postma, A.V., Mannens, M.M., Wilde, A.A., and Al-Gazali, L. (2007a). A novel early onset lethal form of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia maps to chromosome 7p14-p22. *J Cardiovasc Electrophysiol* *18*, 1060-1066.
- Bhuiyan, Z.A., van den Berg, M.P., van Tintelen, J.P., Bink-Boelkens, M.T., Wiesfeld, A.C., Alders, M., Postma, A.V., van Langen, I., Mannens, M.M., and Wilde, A.A. (2007b). Expanding spectrum of human RYR2-related disease: new electrocardiographic, structural, and genetic features. *Circulation* *116*, 1569-1576.
- Bokil, N.J., Baisden, J.M., Radford, D.J., and Summers, K.M. (2010). Molecular genetics of long QT syndrome. *Mol Genet Metab* *101*, 1-8.
- Boussy, T., Paparella, G., de Asmundis, C., Sarkozy, A., Chierchia, G.B., Brugada, J., Brugada, R., and Brugada, P. (2008). Genetic basis of ventricular arrhythmias. *Cardiol Clin* *26*, 335-353, v.
- Brugada, P., and Brugada, J. (1992). Right Bundle-Branch Block, Persistent ST Segment Elevation and Sudden Cardiac Death - a Distinct Clinical and Electrocardiographic Syndrome - a Multicenter Report. *Journal of the American College of Cardiology* *20*, 1391-1396.
- Burashnikov, A., and Antzelevitch, C. (2006). Late-phase 3 EAD. A unique mechanism contributing to initiation of atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol* *29*, 290-295.
- Caswell, A.H., Brandt, N.R., Brunschwig, J.P., and Purkerson, S. (1991). Localization and partial characterization of the oligomeric disulfide-linked molecular weight 95,000 protein (triadin) which binds the ryanodine and dihydropyridine receptors in skeletal muscle triadic vesicles. *Biochemistry* *30*, 7507-7513.
- Chen, S.R., and MacLennan, D.H. (1994). Identification of calmodulin-, Ca(2+)-, and ruthenium red-binding domains in the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* *269*, 22698-22704.

- Cheng, H., and Lederer, W.J. (2008). Calcium sparks. *Physiol Rev* 88, 1491-1545.
- Chopra, N., Yang, T., Asghari, P., Moore, E.D., Huke, S., Akin, B., Cattolica, R.A., Perez, C.F., Hlaing, T., Knollmann-Ritschel, B.E., *et al.* (2009). Ablation of triadin causes loss of cardiac Ca²⁺ release units, impaired excitation-contraction coupling, and cardiac arrhythmias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 7636-7641.
- Copello, J.A., Barg, S., Onoue, H., and Fleischer, S. (1997). Heterogeneity of Ca²⁺ gating of skeletal muscle and cardiac ryanodine receptors. *Biophys J* 73, 141-156.
- Coronado, R., Kawano, S., Lee, C.J., Valdivia, C., and Valdivia, H.H. (1992). Planar bilayer recording of ryanodine receptors of sarcoplasmic reticulum. *Methods Enzymol* 207, 699-707.
- Coronado, R., Morrissette, J., Sukhareva, M., and Vaughan, D.M. (1994). Structure and function of ryanodine receptors. *Am J Physiol* 266, C1485-1504.
- Cotton, R.G., and Scriver, C.R. (1998). Proof of "disease causing" mutation. *Hum Mutat* 12, 1-3.
- Coumel, P., Fidelle, J., Lucet, V., Attuel, P., and Bouvrain, Y. (1978). Catecholamine-induced severe ventricular arrhythmias with Adams-Stokes syndrome in children : report of four cases. *Br Heart J* 40, 28-37 (Supp).
- Crotti, L., Taravelli, E., Girardengo, G., and Schwartz, P.J. (2010). Congenital short QT syndrome. *Indian Pacing Electrophysiol J* 10, 86-95.
- de la Fuente, S., Van Langen, I.M., Postma, A.V., Bikker, H., and Meijer, A. (2008). A case of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia caused by two calsequestrin 2 mutations. *Pacing Clin Electrophysiol* 31, 916-919.
- di Barletta, M.R., Viatchenko-Karpinski, S., Nori, A., Memmi, M., Terentyev, D., Turcato, F., Valle, G., Rizzi, N., Napolitano, C., Gyorke, S., *et al.* (2006). Clinical phenotype and functional characterization of CASQ2 mutations associated with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 114, 1012-1019.
- Du, G.G., Sandhu, B., Khanna, V.K., Guo, X.H., and MacLennan, D.H. (2002). Topology of the Ca²⁺ release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum (RyR1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16725-16730.
- Eltit, J.M., Feng, W., Lopez, J.R., Padilla, I.T., Pessah, I.N., Molinski, T.F., Fruen, B.R., Allen, P.D., and Perez, C.F. (2010). Ablation of skeletal muscle triadin impairs FKBP12/RyR1 channel interactions essential for maintaining resting cytoplasmic Ca²⁺. *J Biol Chem* 285, 38453-38462.
- Felix, R. (2000). Channelopathies: ion channel defects linked to heritable clinical disorders. *J Med Genet* 37, 729-740.
- Feng, Y., Valley, M.T., Lazar, J., Yang, A.L., Bronson, R.T., Firestein, S., Coetzee, W.A., and Manley, J.L. (2009). SRp38 regulates alternative splicing and is required for Ca²⁺ handling in the embryonic heart. *Dev Cell* 16, 528-538.
- Feriotto, G., Finotti, A., Breveglieri, G., Treves, S., Zorzato, F., and Gambari, R. (2007). Transcriptional activity and Sp 1/3 transcription factor binding to the P1 promoter sequences of the human AbetaH-J-J locus. *FEBS J* 274, 4476-4490.
- Feriotto, G., Finotti, A., Volpe, P., Treves, S., Ferrari, S., Angelelli, C., Zorzato, F., and Gambari, R. (2005). Myocyte enhancer factor 2 activates promoter sequences of the human AbetaH-J-J locus, encoding aspartyl-beta-hydroxylase, junctin, and junctate. *Mol Cell Biol* 25, 3261-3275.
- Fernandez-Velasco, M., Ruiz-Hurtado, G., Rueda, A., Neco, P., Mercado-Morales, M., Delgado, C., Napolitano, C., Priori, S.G., Richard, S., Gomez, A.M., *et al.* (2011). RyRCa²⁺ leak limits cardiac Ca²⁺ window current overcoming the tonic effect of calmodulin mice. *PLoS One* 6, e20863.
- Ferrieres, J., Arveiler, D., Amouyel, P., Ruidavets, J.B., Haas, B., Montaye, M., Bingham, A., and Ducimetiere, P. (1997). [Epidemiology of sudden coronary death in France (1985-1982)]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 90, 483-487.
- Fill, M., and Copello, J.A. (2002). Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev* 82, 893-922.
- Folch, J., Ascoli, I., Lees, M., Meath, J.A., and Le, B.N. (1951). Preparation of lipide extracts from brain tissue. *J Biol Chem* 191, 833-841.

- Furuichi, T., Furutama, D., Hakamata, Y., Nakai, J., Takeshima, H., and Mikoshiba, K. (1994). Multiple types of ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels are differentially expressed in rabbit brain. *J Neurosci* *14*, 4794-4805.
- Gamez-Pozo, A., Palacios, I., Kontic, M., Menendez, I., Camino, I., Garcia-Miguel, P., Abelairas, J., Pestana, A., and Alonso, J. (2007). Pathogenic validation of unique germline intronic variants of RB1 in retinoblastoma patients using minigenes. *Hum Mutat* *28*, 1245.
- George, C.H., Jundi, H., Thomas, N.L., Fry, D.L., and Lai, F.A. (2007). Ryanodine receptors and ventricular arrhythmias: emerging trends in mutations, mechanisms and therapies. *J Mol Cell Cardiol* *42*, 34-50.
- Goonasekera, S.A., Beard, N.A., Groom, L., Kimura, T., Lyfenko, A.D., Rosenfeld, A., Marty, I., Dulhunty, A.F., and Dirksen, R.T. (2007). Triadin binding to the C-terminal luminal loop of the ryanodine receptor is important for skeletal muscle excitation contraction coupling. *J Gen Physiol* *130*, 365-378.
- Grunwald, R., and Meissner, G. (1995). Luminal sites and C terminus accessibility of the skeletal muscle calcium release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem* *270*, 11338-11347.
- Guo, W., and Campbell, K.P. (1995). Association of triadin with the ryanodine receptor and calsequestrin in the lumen of the sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* *270*, 9027-9030.
- Gussak, I., Brugada, P., Brugada, J., Wright, R.S., Kopecky, S.L., Chaitman, B.R., and Bjerregaard, P. (2000). Idiopathic short QT interval: a new clinical syndrome? *Cardiology* *94*, 99-102.
- Gyorke, I., Hester, N., Jones, L.R., and Gyorke, S. (2004). The role of calsequestrin, triadin, and junctin in conferring cardiac ryanodine receptor responsiveness to luminal calcium. *Biophys J* *86*, 2121-2128.
- Gyorke, S., and Terentyev, D. (2008). Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease. *Cardiovasc Res* *77*, 245-255.
- Hamilton, S.L., and Serysheva, II (2009). Ryanodine receptor structure: progress and challenges. *J Biol Chem* *284*, 4047-4051.
- Hayashi, M., Denjoy, I., Extramiana, F., Maltret, A., Buisson, N.R., Lupoglazoff, J.M., Klug, D., Takatsuki, S., Villain, E., Kamblock, J., *et al.* (2009a). Incidence and risk factors of arrhythmic events in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* *119*, 2426-2434.
- Hayashi, T., Martone, M.E., Yu, Z., Thor, A., Doi, M., Holst, M.J., Ellisman, M.H., and Hoshijima, M. (2009b). Three-dimensional electron microscopy reveals new details of membrane systems for Ca²⁺ signaling in the heart. *J Cell Sci* *122*, 1005-1013.
- Hong, C.S., Ji, J.H., Kim, J.P., Jung, D.H., and Kim, D.H. (2001). Molecular cloning and characterization of mouse cardiac triadin isoforms. *Gene* *278*, 193-199.
- Hong, C.S., Kwon, S.J., and Kim do, H. (2007). Multiple functions of junctin and junctate, two distinct isoforms of aspartyl beta-hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun* *362*, 1-4.
- Houle, T.D., Ram, M.L., McMurray, W.J., and Cala, S.E. (2006). Different endoplasmic reticulum trafficking and processing pathways for calsequestrin (CSQ) and epitope-tagged CSQ. *Exp Cell Res* *312*, 4150-4161.
- Huke, S., and Bers, D.M. (2008). Ryanodine receptor phosphorylation at Serine 2030, 2808 and 2814 in rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* *376*, 80-85.
- Ikemoto, N., and Yamamoto, T. (2000). Postulated role of inter-domain interaction within the ryanodine receptor in Ca(2+) channel regulation. *Trends Cardiovasc Med* *10*, 310-316.
- Jeanpierre, M. (1987). A rapid method for the purification of DNA from blood. *Nucleic Acids Res* *15*, 9611.
- Jiang, D., Wang, R., Xiao, B., Kong, H., Hunt, D.J., Choi, P., Zhang, L., and Chen, S.R. (2005). Enhanced store overload-induced Ca²⁺ release and channel sensitivity to luminal Ca²⁺ activation are common defects of RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death. *Circ Res* *97*, 1173-1181.

- Jiang, D., Xiao, B., Yang, D., Wang, R., Choi, P., Zhang, L., Cheng, H., and Chen, S.R. (2004). RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death reduce the threshold for store-overload-induced Ca²⁺ release (SOICR). *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 13062-13067.
- Johnson, J.N., Tester, D.J., Bass, N.E., and Ackerman, M.J. (2010). Cardiac channel molecular autopsy for sudden unexpected death in epilepsy. *J Child Neurol* *25*, 916-921.
- Jones, L.R., Suzuki, Y.J., Wang, W., Kobayashi, Y.M., Ramesh, V., Franzini-Armstrong, C., Cleemann, L., and Morad, M. (1998). Regulation of Ca²⁺ signaling in transgenic mouse cardiac myocytes overexpressing calsequestrin. *J Clin Invest* *101*, 1385-1393.
- Jones, L.R., Zhang, L., Sanborn, K., Jorgensen, A.O., and Kelley, J. (1995). Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26-kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* *270*, 30787-30796.
- Jung, C.B., Moretti, A., Mederos, Y.S.M., Iop, L., Storch, U., Bellin, M., Dorn, T., Ruppenthal, S., Pfeiffer, S., Goedel, A., *et al.* (2011). Dantrolene rescues arrhythmogenic RYR2 defect in a patient-specific stem cell model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *EMBO Mol Med*.
- Kapiloff, M.S., Jackson, N., and Airhart, N. (2001). mAKAP and the ryanodine receptor are part of a multi-component signaling complex on the cardiomyocyte nuclear envelope. *J Cell Sci* *114*, 3167-3176.
- Khajavi, M., Inoue, K., and Lupski, J.R. (2006). Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. *Eur J Hum Genet* *14*, 1074-1081.
- Kim, E., Youn, B., Kemper, L., Campbell, C., Milting, H., Varsanyi, M., and Kang, C. (2007). Characterization of human cardiac calsequestrin and its deleterious mutants. *J Mol Biol* *373*, 1047-1057.
- Kirchhefer, U., Klimas, J., Baba, H.A., Buchwalow, I.B., Fabritz, L., Huls, M., Matus, M., Muller, F.U., Schmitz, W., and Neumann, J. (2007). Triadin is a critical determinant of cellular Ca cycling and contractility in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* *293*, H3165-3174.
- Kirchhefer, U., Neumann, J., Baba, H.A., Begrow, F., Kobayashi, Y.M., Reinke, U., Schmitz, W., and Jones, L.R. (2001). Cardiac hypertrophy and impaired relaxation in transgenic mice overexpressing triadin 1. *J Biol Chem* *276*, 4142-4149.
- Kirchhefer, U., Wehrmeister, D., Postma, A.V., Pohlentz, G., Mormann, M., Kucerova, D., Muller, F.U., Schmitz, W., Schulze-Bahr, E., Wilde, A.A., *et al.* (2010). The human CASQ2 mutation K206N is associated with hyperglycosylation and altered cellular calcium handling. *J Mol Cell Cardiol* *49*, 95-105.
- Kirchhof, P., Klimas, J., Fabritz, L., Zwiener, M., Jones, L.R., Schafers, M., Hermann, S., Boknik, P., Schmitz, W., Breithardt, G., *et al.* (2007). Stress and high heart rate provoke ventricular tachycardia in mice expressing triadin. *J Mol Cell Cardiol* *42*, 962-971.
- Klopfenstein, D.R., Kappeler, F., and Hauri, H.P. (1998). A novel direct interaction of endoplasmic reticulum with microtubules. *EMBO J* *17*, 6168-6177.
- Knollmann, B.C. (2009). New roles of calsequestrin and triadin in cardiac muscle. *J Physiol* *587*, 3081-3087.
- Knollmann, B.C., Chopra, N., Hlaing, T., Akin, B., Yang, T., Etensohn, K., Knollmann, B.E., Horton, K.D., Weissman, N.J., Holinstat, I., *et al.* (2006). Casq2 deletion causes sarcoplasmic reticulum volume increase, premature Ca²⁺ release, and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Clin Invest* *116*, 2510-2520.
- Knudson, C.M., Stang, K.K., Moomaw, C.R., Slaughter, C.A., and Campbell, K.P. (1993). Primary structure and topological analysis of a skeletal muscle-specific junctional sarcoplasmic reticulum glycoprotein (triadin). *J Biol Chem* *268*, 12646-12654.
- Kobayashi, Y.M., Alseikhan, B.A., and Jones, L.R. (2000). Localization and characterization of the calsequestrin-binding domain of triadin 1. Evidence for a charged beta-strand in mediating the protein-protein interaction. *J Biol Chem* *275*, 17639-17646.

- Kobayashi, Y.M., and Jones, L.R. (1999). Identification of triadin 1 as the predominant triadin isoform expressed in mammalian myocardium. *J Biol Chem* *274*, 28660-28668.
- Koop, A., Goldmann, P., Chen, S.R., Thieleczek, R., and Varsanyi, M. (2008). ARVC-related mutations in divergent region 3 alter functional properties of the cardiac ryanodine receptor. *Biophys J* *94*, 4668-4677.
- Kushnir, A., and Marks, A.R. (2010). The ryanodine receptor in cardiac physiology and disease. *Adv Pharmacol* *59*, 1-30.
- Kushnir, A., Shan, J., Betzenhauser, M.J., Reiken, S., and Marks, A.R. (2010). Role of CaMKII δ phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in the force frequency relationship and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 10274-10279.
- Lacampagne, A., Fauconnier, J., and Richard, S. (2008). [Ryanodine receptor and heart disease]. *Med Sci (Paris)* *24*, 399-405.
- Lahat, H., Pras, E., Olender, T., Avidan, N., Ben-Asher, E., Man, O., Levy-Nissenbaum, E., Khoury, A., Lorber, A., Goldman, B., *et al.* (2001). 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* *69*, 1378-1384.
- Lai, F.A., Dent, M., Wickenden, C., Xu, L., Kumari, G., Misra, M., Lee, H.B., Sar, M., and Meissner, G. (1992). Expression of a cardiac Ca(2+)-release channel isoform in mammalian brain. *Biochem J* *288* (Pt 2), 553-564.
- Lai, F.A., Erickson, H.P., Rousseau, E., Liu, Q.Y., and Meissner, G. (1988). Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature* *331*, 315-319.
- Laitinen, P.J., Brown, K.M., Piippo, K., Swan, H., Devaney, J.M., Brahmbhatt, B., Donarum, E.A., Marino, M., Tiso, N., Viitasalo, M., *et al.* (2001). Mutations of the cardiac ryanodine receptor (RyR2) gene in familial polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* *103*, 485-490.
- Larsen, M.K., Berge, K.E., Leren, T.P., Nissen, P.H., Hansen, J., Kristensen, I.B., Banner, J., and Jensen, H.K. (2012). Postmortem genetic testing of the ryanodine receptor 2 (RYR2) gene in a cohort of sudden unexplained death cases. *Int J Legal Med*.
- Lavaissiere, L., Jia, S., Nishiyama, M., de la Monte, S., Stern, A.M., Wands, J.R., and Friedman, P.A. (1996). Overexpression of human aspartyl(asparaginyl)beta-hydroxylase in hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *J Clin Invest* *98*, 1313-1323.
- Leenhardt, A., Lucet, V., Denjoy, I., Grau, F., Dongoc, D., and Coumel, P. (1995). Catecholaminergic Polymorphic Ventricular-Tachycardia in Children - a 7-Year Follow-up of 21 Patients. *Circulation* *91*, 1512-1519.
- Lehnart, S.E., Ackerman, M.J., Benson, D.W., Jr., Brugada, R., Clancy, C.E., Donahue, J.K., George, A.L., Jr., Grant, A.O., Goff, S.C., January, C.T., *et al.* (2007). Inherited arrhythmias: a National Heart, Lung, and Blood Institute and Office of Rare Diseases workshop consensus report about the diagnosis, phenotyping, molecular mechanisms, and therapeutic approaches for primary cardiomyopathies of gene mutations affecting ion channel function. *Circulation* *116*, 2325-2345.
- Lehnart, S.E., Mongillo, M., Bellinger, A., Lindegger, N., Chen, B.X., Hsueh, W., Reiken, S., Wronska, A., Drew, L.J., Ward, C.W., *et al.* (2008). Leaky Ca²⁺ release channel/ryanodine receptor 2 causes seizures and sudden cardiac death in mice. *J Clin Invest* *118*, 2230-2245.
- Lehnart, S.E., Terrenoire, C., Reiken, S., Wehrens, X.H., Song, L.S., Tillman, E.J., Mancarella, S., Coromilas, J., Lederer, W.J., Kass, R.S., *et al.* (2006). Stabilization of cardiac ryanodine receptor prevents intracellular calcium leak and arrhythmias. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 7906-7910.
- Lerebours, G. (2007). [Sinus rhythm: mechanisms and function]. *Med Sci (Paris)* *23*, 657-662.
- Liu, N., Ruan, Y., and Priori, S.G. (2008a). Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Prog Cardiovasc Dis* *51*, 23-30.
- Liu, Q.Q., Oberti, C., Zhang, X.Q., Ke, T., Zhang, T., Scheinman, M., Hu, D.Y., and Wang, Q.K. (2008b). [A Novel mutation of F189L in CASQ2 in families with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* *25*, 334-337.

- Liu, Z., Zhang, J., Sharma, M.R., Li, P., Chen, S.R., and Wagenknecht, T. (2001). Three-dimensional reconstruction of the recombinant type 3 ryanodine receptor and localization of its amino terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 6104-6109.
- Lobo, P.A., and Van Petegem, F. (2009). Crystal structures of the N-terminal domains of cardiac and skeletal muscle ryanodine receptors: insights into disease mutations. *Structure* *17*, 1505-1514.
- Lompre, A.M., Hajjar, R.J., Harding, S.E., Kranias, E.G., Lohse, M.J., and Marks, A.R. (2010). Ca²⁺ cycling and new therapeutic approaches for heart failure. *Circulation* *121*, 822-830.
- Lorenzon, N.M., and Beam, K.G. (2008). Disease causing mutations of calcium channels. *Channels (Austin)* *2*, 163-179.
- Ludtke, S.J., Serysheva, II, Hamilton, S.L., and Chiu, W. (2005). The pore structure of the closed RyR1 channel. *Structure* *13*, 1203-1211.
- Marjamaa, A., Laitinen-Forsblom, P., Lahtinen, A.M., Viitasalo, M., Toivonen, L., Kontula, K., and Swan, H. (2009). Search for cardiac calcium cycling gene mutations in familial ventricular arrhythmias resembling catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *BMC Med Genet* *10*, 12.
- Marjamaa, A., Laitinen-Forsblom, P., Wronska, A., Toivonen, L., Kontula, K., and Swan, H. (2011). Ryanodine receptor (RyR2) mutations in sudden cardiac death: studies in extended pedigrees and phenotypic characterization in vitro. *Int J Cardiol* *147*, 246-252.
- Marty, I. (2004). Triadin: a multi-protein family for which purpose? *Cell Mol Life Sci* *61*, 1850-1853.
- Marty, I., Faure, J., Fourest-Lieuvin, A., Vassilopoulos, S., Oddoux, S., and Brocard, J. (2009). Triadin: what possible function 20 years later? *J Physiol* *587*, 3117-3121.
- Marty, I., Robert, M., Ronjat, M., Bally, I., Arlaud, G., and Villaz, M. (1995). Localization of the N-terminal and C-terminal ends of triadin with respect to the sarcoplasmic reticulum membrane of rabbit skeletal muscle. *Biochem J* *307 (Pt 3)*, 769-774.
- Marty, I., Thevenon, D., Scotto, C., Groh, S., Sainnier, S., Robert, M., Grunwald, D., and Villaz, M. (2000). Cloning and characterization of a new isoform of skeletal muscle triadin. *J Biol Chem* *275*, 8206-8212.
- Marty, I., Villaz, M., Arlaud, G., Bally, I., and Ronjat, M. (1994). Transmembrane orientation of the N-terminal and C-terminal ends of the ryanodine receptor in the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *Biochem J* *298 Pt 3*, 743-749.
- Marx, S.O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Rosembly, N., and Marks, A.R. (2000). PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* *101*, 365-376.
- Mathur, N., Sood, S., Wang, S., van Oort, R.J., Sarma, S., Li, N., Skapura, D.G., Bayle, J.H., Valderrabano, M., and Wehrens, X.H. (2009). Sudden infant death syndrome in mice with an inherited mutation in RyR2. *Circ Arrhythm Electrophysiol* *2*, 677-685.
- Medeiros-Domingo, A., Bhuiyan, Z.A., Tester, D.J., Hofman, N., Bikker, H., van Tintelen, J.P., Mannens, M.M., Wilde, A.A., and Ackerman, M.J. (2009). The RYR2-encoded ryanodine receptor/calcium release channel in patients diagnosed previously with either catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia or genotype negative, exercise-induced long QT syndrome: a comprehensive open reading frame mutational analysis. *J Am Coll Cardiol* *54*, 2065-2074.
- Merri, M., Benhorin, J., Alberti, M., Locati, E., and Moss, A.J. (1989). Electrocardiographic quantitation of ventricular repolarization. *Circulation* *80*, 1301-1308.
- Meur, G., Parker, A.K., Gergely, F.V., and Taylor, C.W. (2007). Targeting and retention of type 1 ryanodine receptors to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* *282*, 23096-23103.
- Milstein, M.L., McFarland, T.P., Marsh, J.D., and Cala, S.E. (2008). Inefficient glycosylation leads to high steady-state levels of actively degrading cardiac triadin-1. *J Biol Chem* *283*, 1929-1935.

- Milting, H., Lukas, N., Klauke, B., Korfer, R., Perrot, A., Osterziel, K.J., Vogt, J., Peters, S., Thieleczek, R., and Varsanyi, M. (2006). Composite polymorphisms in the ryanodine receptor 2 gene associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* *71*, 496-505.
- Mohler, P.J., and Wehrens, X.H. (2007). Mechanisms of human arrhythmia syndromes: abnormal cardiac macromolecular interactions. *Physiology (Bethesda)* *22*, 342-350.
- Mok, N.S., Lam, C.W., Fong, N.C., Hui, Y.W., Choi, Y.C., and Chan, K.Y. (2006). Cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) mutation underlying catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in a Chinese adolescent presenting with sudden cardiac arrest and cardiac syncope. *Chin Med J (Engl)* *119*, 2129-2133.
- Monnier, N., Kozak-Ribbens, G., Krivosic-Horber, R., Nivoche, Y., Qi, D., Kraev, N., Loke, J., Sharma, P., Tegazzin, V., Figarella-Branger, D., *et al.* (2005). Correlations between genotype and pharmacological, histological, functional, and clinical phenotypes in malignant hyperthermia susceptibility. *Hum Mutat* *26*, 413-425.
- Nagrani, T., Siyamwala, M., Vahid, G., and Bekheit, S. (2011). Ryanodine calcium channel: a novel channelopathy for seizures. *Neurologist* *17*, 91-94.
- Nakai, J., Imagawa, T., Hakamat, Y., Shigekawa, M., Takeshima, H., and Numa, S. (1990). Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel. *FEBS Lett* *271*, 169-177.
- Nakanishi, S., Kuwajima, G., and Mikoshiba, K. (1992). Immunohistochemical localization of ryanodine receptors in mouse central nervous system. *Neurosci Res* *15*, 130-142.
- Neylon, C.B., Richards, S.M., Larsen, M.A., Agrotis, A., and Bobik, A. (1995). Multiple types of ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels are expressed in vascular smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun* *215*, 814-821.
- Nori, A., Valle, G., Massimino, M.L., and Volpe, P. (2001). Targeting of calsequestrin to the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle upon deletion of its glycosylation site. *Exp Cell Res* *265*, 104-113.
- Oddoux, S., Brocard, J., Schweitzer, A., Szentesi, P., Giannesini, B., Faure, J., Pernet-Gallay, K., Bendahan, D., Lunardi, J., Csernoch, L., *et al.* (2009). Triadin deletion induces impaired skeletal muscle function. *J Biol Chem* *284*, 34918-34929.
- Ogawa, Y. (1994). Role of ryanodine receptors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* *29*, 229-274.
- Otsu, K., Willard, H.F., Khanna, V.K., Zorzato, F., Green, N.M., and MacLennan, D.H. (1990). Molecular cloning of cDNA encoding the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* *265*, 13472-13483.
- Park, H., Park, I.Y., Kim, E., Youn, B., Fields, K., Dunker, A.K., and Kang, C. (2004). Comparing skeletal and cardiac calsequestrin structures and their calcium binding: a proposed mechanism for coupled calcium binding and protein polymerization. *J Biol Chem* *279*, 18026-18033.
- Park, H., Wu, S., Dunker, A.K., and Kang, C. (2003). Polymerization of calsequestrin. Implications for Ca²⁺ regulation. *J Biol Chem* *278*, 16176-16182.
- Park, S.H., Zhu, P.P., Parker, R.L., and Blackstone, C. (2010). Hereditary spastic paraplegia proteins REEP1, spastin, and atlastin-1 coordinate microtubule interactions with the tubular ER network. *J Clin Invest* *120*, 1097-1110.
- Peng, M., Fan, H., Kirley, T.L., Caswell, A.H., and Schwartz, A. (1994). Structural diversity of triadin in skeletal muscle and evidence of its existence in heart. *FEBS Lett* *348*, 17-20.
- Perez, C.F. (2011). On the footsteps of Triadin and its role in skeletal muscle. *World J Biol Chem* *2*, 177-183.
- Perez, C.F., Mukherjee, S., and Allen, P.D. (2003). Amino acids 1-1,680 of ryanodine receptor type 1 hold critical determinants of skeletal type for excitation-contraction coupling. Role of divergence domain D2. *J Biol Chem* *278*, 39644-39652.
- Postma, A.V., Bhuiyan, Z.A., and Bikker, H. (2006). Molecular diagnostics of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia using denaturing high-performance liquid chromatography and sequencing. *Methods Mol Med* *126*, 171-183.

- Postma, A.V., Denjoy, I., Hoorntje, T.M., Lupoglazoff, J.M., Da Costa, A., Sebillon, P., Mannens, M.M., Wilde, A.A., and Guicheney, P. (2002). Absence of calstemon 2 causes severe forms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res* 91, e21-26.
- Postma, A.V., Denjoy, I., Kamblock, J., Alders, M., Lupoglazoff, J.M., Vaksman, G., Dubosq-Bidot, L., Sebillon, P., Mannens, M.M., Guicheney, P., *et al.* (2005). Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: RYR2 mutations, bradycardia, and follow up of the patients. *J Med Genet* 42, 863-870.
- Pourrier, M., and Nattel, S. (2004). [Anchoring proteins and cardiac sudden death: how and why?]. *Med Sci (Paris)* 20, 437-441.
- Priori, S.G., and Chen, S.R. (2011). Inherited dysfunction of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ handling and arrhythmogenesis. *Circ Res* 108, 871-883.
- Priori, S.G., Napolitano, C., Memmi, M., Colombi, B., Drago, F., Gasparini, M., DeSimone, L., Coltorti, F., Bloise, R., Keegan, R., *et al.* (2002). Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 106, 69-74.
- Priori, S.G., Napolitano, C., Tiso, N., Memmi, M., Vignati, G., Bloise, R., Sorrentino, V., and Danieli, G.A. (2001). Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 103, 196-200.
- Priori, S.G., Schwartz, P.J., Bardy, G.H., Bigger, J.T., Borggrefe, M., Camm, A.J., Cobb, L.A., Ewy, G.A., Hauer, R.N.W., Kuck, K.H., *et al.* (1997). Survivors of out-of-hospital cardiac arrest with apparently normal heart - Need for definition and standardized clinical evaluation. *Circulation* 95, 265-272.
- Priori, S.G., Schwartz, P.J., Napolitano, C., Bloise, R., Ronchetti, E., Grillo, M., Vicentini, A., Spazzolini, C., Nastoli, J., Bottelli, G., *et al.* (2003). Risk stratification in the long-QT syndrome. *N Engl J Med* 348, 1866-1874.
- Ran, Y., Chen, J., Li, N., Zhang, W., Feng, L., Wang, R., Hui, R., Zhang, S., and Pu, J. (2010). Common RyR2 variants associate with ventricular arrhythmias and sudden cardiac death in chronic heart failure. *Clin Sci (Lond)* 119, 215-223.
- Reid, D.S., Tynan, M., Braidwood, L., and Fitzgerald, G.R. (1975). Bidirectional tachycardia in a child. A study using His bundle electrography. *Br Heart J* 37, 339-344.
- Richards, C.S., Bale, S., Bellissimo, D.B., Das, S., Grody, W.W., Hegde, M.R., Lyon, E., and Ward, B.E. (2008). ACMG recommendations for standards for interpretation and reporting of sequence variations: Revisions 2007. *Genet Med* 10, 294-300.
- Rizzi, N., Liu, N., Napolitano, C., Nori, A., Turcato, F., Colombi, B., Biciato, S., Arcelli, D., Spedito, A., Scelsi, M., *et al.* (2008). Unexpected structural and functional consequences of the R33Q homozygous mutation in cardiac calstemon: a complex arrhythmogenic cascade in a knock in mouse model. *Circ Res* 103, 298-306.
- Roden, D.M., Balsler, J.R., George, A.L., Jr., and Anderson, M.E. (2002). Cardiac ion channels. *Annu Rev Physiol* 64, 431-475.
- Roux-Buisson, N., Egea, G., Denjoy, I., Guicheney, P., and Lunardi, J. (2011a). Germline and somatic mosaicism for a mutation of the ryanodine receptor type 2 gene: implication for genetic counselling and patient caring. *Europace* 13, 130-132.
- Roux-Buisson, N., Rendu, J., Denjoy, I., Guicheney, P., Goldenberg, A., David, N., Faivre, L., Barthez, O., Danieli, G.A., Marty, I., *et al.* (2011b). Functional analysis reveals splicing mutations of the CASQ2 gene in patients with CPVT: implication for genetic counselling and clinical management. *Hum Mutat*.
- Samso, M., Feng, W., Pessah, I.N., and Allen, P.D. (2009). Coordinated movement of cytoplasmic and transmembrane domains of RyR1 upon gating. *PLoS Biol* 7, e85.
- Sanchez, E.J., Munske, G.R., Criswell, A., Milting, H., Dunker, A.K., and Kang, C. (2011). Phosphorylation of human calstemon: implications for calcium regulation. *Mol Cell Biochem* 353, 195-204.
- Schimpf, R., Veltmann, C., Wolpert, C., and Borggrefe, M. (2009). Channelopathies: Brugada syndrome, long QT syndrome, short QT syndrome, and CPVT. *Herz* 34, 281-288.

- Schroder, M., and Kaufman, R.J. (2005a). ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 569, 29-63.
- Schroder, M., and Kaufman, R.J. (2005b). The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 74, 739-789.
- Serysheva, II, Schatz, M., van Heel, M., Chiu, W., and Hamilton, S.L. (1999). Structure of the skeletal muscle calcium release channel activated with Ca²⁺ and AMP-PCP. *Biophys J* 77, 1936-1944.
- Sharma, M.R., Jeyakumar, L.H., Fleischer, S., and Wagenknecht, T. (2000). Three-dimensional structure of ryanodine receptor isoform three in two conformational states as visualized by cryo-electron microscopy. *J Biol Chem* 275, 9485-9491.
- Sharp, A.H., McPherson, P.S., Dawson, T.M., Aoki, C., Campbell, K.P., and Snyder, S.H. (1993). Differential immunohistochemical localization of inositol 1,4,5-trisphosphate- and ryanodine-sensitive Ca²⁺ release channels in rat brain. *J Neurosci* 13, 3051-3063.
- Shen, X., Franzini-Armstrong, C., Lopez, J.R., Jones, L.R., Kobayashi, Y.M., Wang, Y., Kerrick, W.G., Caswell, A.H., Potter, J.D., Miller, T., *et al.* (2007). Triadins modulate intracellular Ca(2+) homeostasis but are not essential for excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J Biol Chem* 282, 37864-37874.
- Shin, D.W., Ma, J., and Kim, D.H. (2000). The asp-rich region at the carboxyl-terminus of calsequestrin binds to Ca(2+) and interacts with triadin. *FEBS Lett* 486, 178-182.
- Smith, J.S., Coronado, R., and Meissner, G. (1986). Single channel measurements of the calcium release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Activation by Ca²⁺ and ATP and modulation by Mg²⁺. *J Gen Physiol* 88, 573-588.
- Song, L., Alcalai, R., Arad, M., Wolf, C.M., Toka, O., Conner, D.A., Berul, C.I., Eldar, M., Seidman, C.E., and Seidman, J.G. (2007). Calsequestrin 2 (CASQ2) mutations increase expression of calreticulin and ryanodine receptors, causing catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Clin Invest* 117, 1814-1823.
- Stewart, R., Zissimopoulos, S., and Lai, F.A. (2003). Oligomerization of the cardiac ryanodine receptor C-terminal tail. *Biochem J* 376, 795-799.
- Swan, H., Piippo, K., Viitasalo, M., Heikkila, P., Paavonen, T., Kainulainen, K., Kere, J., Keto, P., Kontula, K., and Toivonen, L. (1999). Arrhythmic disorder mapped to chromosome 1q42-q43 causes malignant polymorphic ventricular tachycardia in structurally normal hearts. *J Am Coll Cardiol* 34, 2035-2042.
- Takekuma, H., Komazaki, S., Hirose, K., Nishi, M., Noda, T., and Iino, M. (1998). Embryonic lethality and abnormal cardiac myocytes in mice lacking ryanodine receptor type 2. *EMBO J* 17, 3309-3316.
- Terentyev, D., Cala, S.E., Houle, T.D., Viatchenko-Karpinski, S., Gyorke, I., Terentyeva, R., Williams, S.C., and Gyorke, S. (2005). Triadin overexpression stimulates excitation-contraction coupling and increases predisposition to cellular arrhythmia in cardiac myocytes. *Circ Res* 96, 651-658.
- Terentyev, D., Nori, A., Santoro, M., Viatchenko-Karpinski, S., Kubalova, Z., Gyorke, I., Terentyeva, R., Vedamoorthyrao, S., Blom, N.A., Valle, G., *et al.* (2006). Abnormal interactions of calsequestrin with the ryanodine receptor calcium release channel complex linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Circ Res* 98, 1151-1158.
- Tester, D.J., Dura, M., Carturan, E., Reiken, S., Wronska, A., Marks, A.R., and Ackerman, M.J. (2007). A mechanism for sudden infant death syndrome (SIDS): stress-induced leak via ryanodine receptors. *Heart Rhythm* 4, 733-739.
- Tester, D.J., Will, M.L., Haglund, C.M., and Ackerman, M.J. (2005). Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm* 2, 507-517.
- Thevenon, D., Smida-Rezgui, S., Chevessier, F., Groh, S., Henry-Berger, J., Beatriz Romero, N., Villaz, M., DeWaard, M., and Marty, I. (2003). Human skeletal muscle triadin: gene organization and cloning of the major isoform, Trisk 51. *Biochem Biophys Res Commun* 303, 669-675.
- Thomas, C., Guicheney, P., and Lunardi, J. (2006). [Molecular genetics of cardiac arrhythmias]. *Rev Med Interne* 27, 236-239.
- Timerman, A.P., Onoue, H., Xin, H.B., Barg, S., Copello, J., Wiederrecht, G., and Fleischer, S. (1996). Selective binding of FKBP12.6 by the cardiac ryanodine receptor. *J Biol Chem* 271, 20385-20391.

- Tiso, N., Salamon, M., Bagattin, A., Danieli, G.A., Argenton, F., and Bortolussi, M. (2002). The binding of the RyR2 calcium channel to its gating protein FKBP12.6 is oppositely affected by ARVD2 and VTSIP mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 299, 594-598.
- Tiso, N., Stephan, D.A., Nava, A., Bagattin, A., Devaney, J.M., Stanchi, F., Larderet, G., Brahmabhatt, B., Brown, K., Bauce, B., *et al.* (2001). Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2). *Hum Mol Genet* 10, 189-194.
- Towbin, J.A. (1995). New revelations about the long-QT syndrome. *N Engl J Med* 333, 384-385.
- Treves, S., Feriotto, G., Moccagatta, L., Gambari, R., and Zorzato, F. (2000). Molecular cloning, expression, functional characterization, chromosomal localization, and gene structure of junctate, a novel integral calcium binding protein of sarco(endo)plasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 275, 39555-39568.
- Tung, C.C., Lobo, P.A., Kimlicka, L., and Van Petegem, F. (2010). The amino-terminal disease hotspot of ryanodine receptors forms a cytoplasmic vestibule. *Nature* 468, 585-588.
- Uchinoumi, H., Yano, M., Suetomi, T., Ono, M., Xu, X., Tateishi, H., Oda, T., Okuda, S., Doi, M., Kobayashi, S., *et al.* (2010). Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia is caused by mutation-linked defective conformational regulation of the ryanodine receptor. *Circ Res* 106, 1413-1424.
- Vassilopoulos, S., Thevenon, D., Rezgui, S.S., Brocard, J., Chapel, A., Lacampagne, A., Lunardi, J., Dewaard, M., and Marty, I. (2005). Triadins are not triad-specific proteins: two new skeletal muscle triadins possibly involved in the architecture of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 280, 28601-28609.
- Viatchenko-Karpinski, S., Terentyev, D., Gyorke, I., Terentyeva, R., Volpe, P., Priori, S.G., Napolitano, C., Nori, A., Williams, S.C., and Gyorke, S. (2004). Abnormal calcium signaling and sudden cardiac death associated with mutation of calsequestrin. *Circ Res* 94, 471-477.
- Wang, S., Trumble, W.R., Liao, H., Wesson, C.R., Dunker, A.K., and Kang, C.H. (1998). Crystal structure of calsequestrin from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Nat Struct Biol* 5, 476-483.
- Watanabe, H., Chopra, N., Laver, D., Hwang, H.S., Davies, S.S., Roach, D.E., Duff, H.J., Roden, D.M., Wilde, A.A., and Knollmann, B.C. (2009). Flecainide prevents catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in mice and humans. *Nat Med* 15, 380-383.
- Wehrens, X.H., Lehnart, S.E., Huang, F., Vest, J.A., Reiken, S.R., Mohler, P.J., Sun, J., Guatimosim, S., Song, L.S., Rosembli, N., *et al.* (2003). FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell* 113, 829-840.
- Wehrens, X.H., Lehnart, S.E., Reiken, S.R., and Marks, A.R. (2004). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* 94, e61-70.
- Wehrens, X.H., and Marks, A.R. (2003). Altered function and regulation of cardiac ryanodine receptors in cardiac disease. *Trends Biochem Sci* 28, 671-678.
- Welch, W., Rheault, S., West, D.J., and Williams, A.J. (2004). A model of the putative pore region of the cardiac ryanodine receptor channel. *Biophys J* 87, 2335-2351.
- Wilde, A.A., and Ackerman, M.J. (2010). Exercise extreme caution when calling rare genetic variants novel arrhythmia syndrome susceptibility mutations. *Heart Rhythm* 7, 1883-1885.
- Wilde, A.A., Bhuiyan, Z.A., Crotti, L., Facchini, M., De Ferrari, G.M., Paul, T., Ferrandi, C., Koolbergen, D.R., Otero, A., and Schwartz, P.J. (2008). Left cardiac sympathetic denervation for catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *N Engl J Med* 358, 2024-2029.
- Xiao, B., Jiang, M.T., Zhao, M., Yang, D., Sutherland, C., Lai, F.A., Walsh, M.P., Warltier, D.C., Cheng, H., and Chen, S.R. (2005). Characterization of a novel PKA phosphorylation site, serine-2030, reveals no PKA hyperphosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in canine heart failure. *Circ Res* 96, 847-855.

- Yamaguchi, N., Xu, L., Pasek, D.A., Evans, K.E., and Meissner, G. (2003). Molecular basis of calmodulin binding to cardiac muscle Ca(2+) release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem* 278, 23480-23486.
- Yang, Y., Liang, B., Liu, J., Li, J., Grunnet, M., Olesen, S.P., Rasmussen, H.B., Ellinor, P.T., Gao, L., Lin, X., *et al.* (2010). Identification of a Kir3.4 Mutation in Congenital Long QT Syndrome. *Am J Hum Genet*.
- Yuan, Q., Fan, G.C., Dong, M., Altschafli, B., Diwan, A., Ren, X., Hahn, H.H., Zhao, W., Waggoner, J.R., Jones, L.R., *et al.* (2007). Sarcoplasmic reticulum calcium overloading in junctin deficiency enhances cardiac contractility but increases ventricular automaticity. *Circulation* 115, 300-309.
- Zhang, L., Franzini-Armstrong, C., Ramesh, V., and Jones, L.R. (2001). Structural alterations in cardiac calcium release units resulting from overexpression of junctin. *J Mol Cell Cardiol* 33, 233-247.
- Zhang, L., Kelley, J., Schmeisser, G., Kobayashi, Y.M., and Jones, L.R. (1997). Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 272, 23389-23397.
- Zhao, M., Li, P., Li, X., Zhang, L., Winkfein, R.J., and Chen, S.R. (1999). Molecular identification of the ryanodine receptor pore-forming segment. *J Biol Chem* 274, 25971-25974.
- Zhou, Q., Xiao, J., Jiang, D., Wang, R., Vembaiyan, K., Wang, A., Smith, C.D., Xie, C., Chen, W., Zhang, J., *et al.* (2011). Carvedilol and its new analogs suppress arrhythmogenic store overload-induced Ca²⁺ release. *Nat Med* 17, 1003-1009.
- Zimanyi, I., and Pessah, I.N. (1991). Comparison of [3H]ryanodine receptors and Ca⁺⁺ release from rat cardiac and rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Pharmacol Exp Ther* 256, 938-946.
- Zipes, D.P., and Wellens, H.J. (1998). Sudden cardiac death. *Circulation* 98, 2334-2351.
- Zorzato, F., Fujii, J., Otsu, K., Phillips, M., Green, N.M., Lai, F.A., Meissner, G., and MacLennan, D.H. (1990). Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 265, 2244-2256.

Annexes

Annexe 1. Formulaire de consentement éclairé.

Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire
Institut de Biologie et Pathologie
CHU de Grenoble

Laboratoire agréé (arrêté 01-243)

Identification du patient
prélevé (étiquette)

CONSENTEMENT EN VUE D'UN EXAMEN A FINALITE MEDICALE DES CARACTERISTIQUES GENETIQUES CHEZ UNE PERSONNE

Article 16-11 du Code civil et articles L.1131-1, L.1131-3 et L.1111-2 du Code de la Santé Publique, modifiés selon la Loi de Bioéthique n°2004-800 du 6 août 2004, mis en application par les articles R1131-3 et R1131-4 (décret n°2008-321 du 4 avril 2008)

Je soussigné (e) Né(e) le

patient majeur parent ou représentant légal de Né(e)le

- Déclare avoir reçu les informations nécessaires du Docteur.....

- Accepte que soit réalisée sur ma personne mon enfant la personne sus-nommée

une analyse génétique concernant le diagnostic de

Je déclare être conscient(e) de la signification de l'anomalie éventuellement détectée, pour moi-même et mes apparentés et de l'importance de transmettre le cas échéant cette information à mes apparentés et aux personnes concernées si celle-ci peut leur être utile et permettre d'assurer une prévention.

• Je souhaite / je ne souhaite pas (1) connaître les résultats le jour où cette étude aboutira. Le cas échéant, les résultats de l'analyse me seront transmis et expliqués par le médecin qui me l'a prescrite.

• J'autorise / je n'autorise pas (1) la conservation des échantillons biologiques prélevés à des fins de diagnostics ultérieurs. Le médecin prescripteur des examens assure la responsabilité de l'utilisation de ces échantillons. Je garde la liberté de demander à tout moment la destruction du matériel biologique conservé sans avoir à me justifier.

• J'autorise/ je n'autorise pas (1) la conservation et l'utilisation de manière anonyme des échantillons biologiques prélevés à des fins de recherche médicale.

• Je consens / je ne consens pas (1) au recueil, à la saisie et au traitement des données contenues dans mon dossier médical par des personnes tenues au secret professionnel. Les données qui me concernent resteront strictement confidentielles. Je n'en autorise la consultation qu'aux personnes qui collaborent à l'analyse. Je pourrai à tout moment demander à être retiré de l'analyse sans aucune conséquence. Les données concernant mon dossier devront être détruites.

Conformément à la loi N°2002-303 du 4 mars 2002 (art L.1111-7), je peux exercer mon droit d'accès aux données qui me concernent directement ou par l'intermédiaire d'un médecin de mon choix.

Fait à le

Signature

(1) rayer la mention inutile

Annexe 2. Conditions PCR, dHPLC et séquençage utilisées dans l'étude.

➤ Conditions d'analyse du gène *RYR2* en dHPLC

- Synthèse des amplifiats

Mix PCR :

2µl d'ADN du patient (ADN à 50 ng/µl)
 0.2 µl amorces sens
 0.2 µl amorces antisens
 5µl tampon 10 x
 5 µl dNTP
 0.1 µl Taq Gold Roche
 37.5 µl H₂O

Programme PCR :

Dénaturation initiale : 96°C 10min

Amplification (35 cycles) : 94°C 30sec, X°C 30sec, 72°C 1 min (X est la température d'hybridation des amorces)

Elongation finale : 72°C 5 min

- Conditions PCR et dHPLC

Exons	Amorces	Taille (pb)	Cycles PCR (nombre de cycles et température d'hybridation en °C)	dHPLC Tp (°C) / TS	
9	9 F/R	282	32x54	59.4 / 0 61.4 / +0.3 63.0 / +0.8	
12	12 F/R	254	30x56	57.3 / 0.2 58 / 0.4 59.4 / 0.6	
13	13 F/R	349	32x56	54.4 / -0.2 56.7 / +0.5 57.7 / +0.9	
14	14 F/R	202	32x60	54.5 / -0.2 57.6 / 0 59.4 / +0.2 61.0 / +0.6	
17	17 F/i3	395	32x58	56.2 / 0 57.6 / +0.3 58.8 / +0.9	
18	18 F1/R1	230	30x56	53.9 / 0.2 55.4 / 0.5	
19	19 F/R	241	32x58	57.8 / -0.1 59.6 / 0.2 60.8 / 0.8	
21	21 F/R	341	30x56	56.9 / 0 57.6 / +0.2 58.1 / +0.3	
26	26 F/R	320	30x56	56.3 / 0 57 / +0.1 59.3 / +0.6 61.4 / +1	
37	A	37A i5/i3	358	32x60	57.8 / 0 60.8 / 0.4 62.2 / 0.7
	B	37B F/R	570	32x60	58.7 / -0.4 59.5 / -0.4 60.4 / -0.2
	C	37C F/R	397	32x58	56.5 / -0.2 59.0 / +0.3 62.5 / +0.6
40	40 F/R	263	30x56	55.3 / -0.1 56.2 / 0	
41	41 AF/BR	477	32x56	55.8 / +0.1 58.0 / +0.4 60.6 / +0.5 61.5 / +0.6	
42	42 F/R	261	32x54	56.8 / +0.1 58.3 / 0.3	

				60.5 / +0.9	
44	44 F/R	209	32x60	60.0 / 0.2	
45	45 F/R	276	32x60	56.0 / -0.2 56.9 / 0 59.5 / +0.6	
46	46 i5/i3	519	32x56	55.8 / +0.5 57.5 / +1 59.8 / +1.2	
47	47 F/R	282	30x56	56.7 / -0.2 60.0 / +0.4	
48	48 F/R	296	32x60	55.7 / -0.2 57.2 / 0 59.2 / +0.5	
49	49 F/R	239	32x60	56.5 / -0.4 59.9 / 0 60.8 / +0.2	
50	50 i5/R	300	32x58	56.5 / -0.1 57.8 / 0.1 58.7 / 0.3 60.7 / 0.5	
72	72 F/R	242	32x56	58.8 / -0.2 60 / -0.1 61.3 / +0.4	
86	86 F/R	241	32x56	55.7 / -0.3 56.1 / -0.2	
88	88 F/R	300	32x54	57.1 / +0.2 59.7 / +0.4 61.2 / +0.6	
89	89 F/R	213	32x54	55.3 / -0.2 56.5 / +0.3	
90	AB	Séquençage			
	C	90C F/R	293	32x62	58.0 / -0.4 61.0 / -0.3
	D	90D F/R	256	32x60	55.5 / -0.4 59.1 / -0.2 62.7 / +0.2
	E	90E F/R	255	32x58	55.5 / -0.5 59.5 / -0.3 62.0 / +0.2
	F	90F F/R	300	32x62	56.0 / -0.4 60.3 / 0 62.0 / +0.5
93	93 F/R	273	32x54	55.7 / -0.5 56.5 / -0.2	
94	94 F/R	328	32x54	56.8 / -0.4 59.5 / 0 60.4 / +0.3	
96	96 F/R	294	32x56	53.0 / 0 53.9 / 0.2	
97	97 F/R	265	32x58	56.0 / -0.2 58.5 / 0.4 59.7 / +0.8	
100	100 F/R	283	32x60	56.0 / -0.5 56.8 / -0.5 57.7 / -0.1	
101	101 F/R	231	32x58	56.0 / -0.6 56.9 / -0.3 60.1 / +0.8	
102	102 F/R	199	32x60	56.4 / -0.3 57.5 / +0.2	
103	103 F/R	237	32x62	58.3 / -0.4 59.5 / 0	
104	104 F/R	304	32x60	55.4 / -0.4	
105	105 F/R	249	32x62	56.9 / -0.2 57.4 / -0.1 58.4 / +0.5	

- Conditions d'analyse des gènes *RYR2*, *CASQ2*, *TRDN*, *ASPH* et *FKBP1B* en séquençage
- Synthèse des amplifiats

Mix PCR :

1µL d'ADN du patient (ADN à 50ng/µL)
0,1µL amorce sens (100pM)
0,1µL amorce antisens (100pM)
2,5µL tampon 10X
2,5µL dNTPs (2mM)
0,05µL Taq Qiagen
18,75µL H₂O

Programme PCR :

Dénaturation initiale : 95°C 5min
Amplification (35 cycles) : 94°C 30sec, X°C 30sec, 72°C 1 min (X est la température d'hybridation des amorces)
Elongation finale : 72°C 5 min

- Conditions PCR et séquençage du gène *RYR2*

Exons	Amorces	Taille (pb)	Cycles PCR	Amorce SEQ
9	9 F/R	282	30 x 54°	9R
42	42 F/R	261		42F
43	43 F/R	311		43R
89	89 F/R	213		89R
93	93 F/R	273		93R
94	94 F/R	328		94F
95	95 F/R	274		95R
12	12 i5/i3	790	30 x 56°	12Rs
13	13 F/R	349		13F
21	21 F/R	341		21F ou 21R
26	26 i5/i3	626		26i5 (433) ou 26i3 (353 pb)
40	40 F/R	263		40F
41	41 AF/BR	477		41BR
46	46 i5/i3	519		46i3
47	47 F/R	282		47F
73	73 F/R	268		73R
83	83 F/R	205		83F
86	86 F/R	241		86F
87	87 F/R	316		87F ou 87R
90 EF	90 E F/Fi3	596		90Fi3
92	92 F/R	416		92F
96	96 F/R	294		96F
101	101 F/i3	310	101i3	
8	8 F/R	229	30 x 58°	8F
17	17 F/i3	395		17F
48	48 F/R	296		48R
50	50 i5/i3	449		50i3
72	72 i5/i3	337		72i5
97	97 F/R	265		97R
3	3 AF/BR	264	30 x 60°	3BR
10	10 i5/i3	357		10i5
14	14 i5/i3	389		14i5
15	15 F/R	349		15F
18	18 i5/i3	474		18i3
19	19 i5/i3	401		19i3
37	37 Ai5/CR	1100		37i5 et 37CR
44	44 Fs/Rs	261		44Rs
45	45 F/R	276		45R
49	49 i5/i3	373		49i5
88	88 i5/i3	483		88i5
90 AB	90A Fs/Rs	674		90Br
90 CD	90 C F/i3	560		90CF et 90Ci3
91	91 F/R	345		91F ou 91R
98	98 F/R	235		98R
99	99 i5/i3	331		99i3 et 99i5
100	100 F/R	283		100F
102	102 F/R	199	102F	
103	103 F/R	237	103F	
104	104 i5/i3	677	104i5	
105	105 F/R	249	105F	

- Conditions PCR et séquençage du gène *CASQ2*

Exon	Amorces	Taille (pb)	Nb Cycles PCR	Tp (°C) PCR	Amorce séquençage
1	1 F/R	599	30	60	1R
2	2 eF/Rb	329	30	60	2eF
3	3 eF/eR	304	30	60	3eF
4	4 F/R	298	30	60	4F
5	5 eF/eR	483	30	60	5eF
6	6 Fe/R	319	30	60	6eF
7	7 Fb/Rb	374	30	60	7Rb
8	8 F/R	260	30	60	8F
9	9 Fe/Re	508	30	60	9Fe
10	10 F/R	361	30	60	10F
11a	11 F/R	476	30	60	11F

- Conditions PCR et séquençage du gène *TRDN*

Exon	Amorces	Conditions PCR (nb cycles T° d'hybridation)	Taille Fragment (bp)	Amorce Séquençage
1	TRDN 01i5 / 01i3	32 x 55	347	01i5
2	TRDN 02i5 / 02i3	32 x 55	398	02i5
3-4	TRDN 03i5 / 04i3	30 x 55	1493	03i3 et 04i5
5	TRDN 05i5 / 05i3	35 x 50	375	05i5
6	TRDN 06i5 / 06i3	32 x 55	224	06i3
7	TRDN 07i5 / 07i3	32 x 55	358	07i5
8	TRDN 08F / 08R	32 x 55	547	08F

- Conditions PCR et séquençage du gène *ASPH*

Exon	Amorces	Conditions PCR (nb cycles et T° d'hybridation)	Taille Fragment (bp)	Amorce séquençage
2	JCN 01F / 01R	30X60	348	JCN 01R
3	JCN 02F / 02R	30X60	500	JCN 02R
4	JCN 03F / 03R	30X60	298	JCN 03F
5	JCN 04F / 04R	30X58	684	JCN 04F
6	JCN 05F / 05R	30X60	398	JCN 05R
7	JCN 06F / 06R	30X60	717	JCN 06F et 06R

- Conditions PCR et séquençage du gène *FKBP1B*

Exon	Amorces	Conditions PCR	Taille Fragment (bp)	Amorce séquençage
1	1Fc/1Rc	30x66°C + 5% DMSO + 5% glycérol	276	1Fc
2	2F/2R	30X60	298	2F
3	3F/3R	30X60	392	3F
3b/4	4F/4R	30x60	382	4R

Annexe 3. Amorces utilisées.

➤ RYR2

nom	amorce
RYR2 003AF	TGA TGC TGC TGA CTG CTC TT
RYR2 003AR	ATT GGG TAC TTG CCC CTT CT
RYR2 003BF	TGG AGC AGT CCC TCT CTG TC
RYR2 003BR	ATT CCA ACT GAA AGG CAT GG
RYR2 008F	TTG TGT GTT GGG AAT CAT TG
RYR2 008R	AGC AGA TAC ATG ATC CTA CTT TCC
RYR2 009F	ACT TAC ATG TTA CAG CTT ACC AGA
RYR2 009R	TTA CAG AAT ATT TAG ACA CAG ACA
RYR2 010F	GGC TAT CAG CAC CTG ACA CT
RYR2 010i3	GCC CAT CTT GTA TGA TGC TAC TGG
RYR2 010i5	GCA CTG TCT ATC TCT GTG ACC TTG G
RYR2 010R	ACA TCA AGG CAA AAG AGT GC
RYR2 012F	GTG GGT GCT ATT GGA TCA AG
RYR2 012i3	AGC ACT GTG AAA ATG GAC GA
RYR2 012i5	TGA TTG TGG GTG CTA TTG GA
RYR2 012R	TCA AAG GAA ATA TGA CCG GG
RYR2 012Rs	GAA ATA CAC ATA AGA CAT AC
RYR2 013F	AGG GCT GAA TTT TTC AAG GA
RYR2 013R	GCC AAT TAT TTT TGA CTT GTG C
RYR2 014F	GGA AAA GAG ACG TTG GGA GT
RYR2 014i3	ACT TCC TAA CGT TTC TGC TGA CTT
RYR2 014i5	AGT CCC CTG TAC CTG CCT TTT G
RYR2 014R	TCA AAC AAC TAC GCC TAC AAA A
RYR2 015F	GGG AGA GAG ATT AAT GCC TGA
RYR2 015R	AAT TTT CCC AAC CAA GAA GC
RYR2 017F	GAT CCA ATA TTT TAG GGC TGC
RYR2 017i3	GGA TAC GAA GCA AAG AAA AAT AGG AG
RYR2 017i5	CCG AAA TTA CAT TCC TTC TAA TGA GC
RYR2 017R	CCA CCA CAC CTC ACT CAA A
RYR2 018F	AGA CAC TGG TCA TTG TAC ACC A
RYR2 018F1	AGA CAC TGG TCA TTG TAC ACC AA
RYR2 018i3	CAG GAG AAT GCT TGA ACC CTA GAG
RYR2 018i5	GCC TTG TAA CAG TCA CAT TGA GCA C
RYR2 018R	TTT GAG AAT TCA TTC AGG GAA
RYR2 018R1	AAA GGA TTT GAG AAT TCA TTC AGG
RYR2 019F	GAG GGA GGA TCA GCT GAA AG
RYR2 019i3	GAC CAT ATA GTA TCA GCT ACA GGG CAA G
RYR2 019i5	GCT ATG ATC GCA TCA CTG CAC TTC
RYR2 019R	CAG CTA CAG GGC AAG AAC AT
RYR2 021F	TTT GAC TTT GGC TCT GAA GC
RYR2 021R	GGC AGT GCA GAG TCT TCT GT
RYR2 026F	GTA CTT CAC CAC TGG TTA CCA CTG TG
RYR2 026i3	CAC GAT CAC AGC CAG AAC TAA GG
RYR2 026i5	TGA CAG GTC CTT TTC ATC TCT GAG AG
RYR2 026R	AGT CTC AGA CCA AAT GCT AAT TCC C
RYR2 037AF	TCT GGT CCC AAG CAT TTC AGA
RYR2 037Ai3	GGG ACA ATG TAC TCG TTG TTC ATC

RYR2 037Ai5	ACA GTG CAT ACT GAT TTC TCC TCT G
RYR2 037AR	TGT TCT CAT CAG GGA ACA GG
RYR2 037BF	GTT TGC TGC GTG CTG GCT ACT ATG
RYR2 037BR	CCC CCT TGG CTT CTT CCT CAC
RYR2 037CF	TGG GCA TCT TTC ACA ACG AGG ACT
RYR2 037CR	TGG CTA ATG AAT AAG AGG GAA AAG
RYR2 040F	AGG CCT CAG AAT TAT TTG CC
RYR2 040R	AGT GTC AGC AGT TGG GTC AT
RYR2 041AF	TTG GGG GTA CAG GAT ATG GAC TTG
RYR2 041AR	CAC ACT CAG CAG GGA CCG AAT CT
RYR2 041BF	GCC CTG CCA AAG ACC TA
RYR2 041BR	TAA TCG TAT AAT CCA GAC AAT
RYR2 042F	TGC TTT TAC TTT TCA ACT CAC AT
RYR2 042R	TAC TAA ATA GCA TCT CAG GAA TCA
RYR2 043F	CGT TTG CTT TCA GCA GCT A
RYR2 043R	ACC TAT TGG CCA ACT ATC TGT C
RYR2 043Rs	AAA TGT GCA ATG GAC CTG AA
RYR2 044F	GTT ACA GCA CGA TCC AGG TT
RYR2 044Fs	GGA GTT TAT AGT TAC AGC ACG ATC CAG G
RYR2 044R	GAG AAA ACC GTG AAA AAG CA
RYR2 044Rs	CAC AAT GAC TTC TGC ACC AAC CTT AC
RYR2 045F	AAT GAG TTT TCA GCC AAG GG
RYR2 045R	TTC CTT CAT GAA AGT GCT GAG
RYR2 046F	TTT GTT TAC TTA TCT TCC CCA TTC
RYR2 046i3	TCT CTT TGT TCA TTC GAC CTA TTC
RYR2 046i5	TAG GAT TAC ATT TTG GCT TTA TTA
RYR2 046R	TAT GGA TCA CTC GTG AGG GT
RYR2 047A	ATG CAT CTC AGG AGC ACG GT
RYR2 047Aq	ATG CAT CTC AGG AGC ACA GT
RYR2 047C	AGT TCC TCC TTT TCC CCT CA
RYR2 047Cq	CCC ATT TGC TTT CTC TTT CTT TT
RYR2 047F	GTC CCT TTC CTC GGA GAG AT
RYR2 047G	ATG CAT CTC AGG AGC ACG GC
RYR2 047Gq	ATG CAT CTC AGG AGC ACA GC
RYR2 047i3	TGG AGC ATG AAG ATT ATT GGT TT
RYR2 047i5	TGA CAC AGA GGA GGA GGA AGA
RYR2 047R	GGT TTT GGA TGC TGT TAT GC
RYR2 048F	GGA TTC CAA TAC TTC AGA TTT CC
RYR2 048R	AGG TTG GGA TGT TGA GTA CG
RYR2 049F	ACA GCC ATT GAC ACC AAA AT
RyR2 049i3	AAA AGA ACA TCA TAA GGC ACA GAG
RYR2 049i5	TTG AGG GTA GTC GAA GAA CAG AA
RYR2 049R	AGA GAG GAG GAA GTC CAT CG
RYR2 050F	ATG TCC CCA TGT TAA TCC CT
RYR2 050i3	GAA CTT GAC TGG GAG CAA G
RYR2 050i5	TCT ACT GCC AAA CAC AAA TG
RYR2 050R	AAG AAG CCG GAA TAG AAT TTG
RYR2 072F	TTC AGA TCC CAG CAC TTC TC
RYR2 072i3	CAT AGG GCA GTG AGA CAA AGG AAT C
RYR2 072i5	GTG ACA AGT TAG GGA AGA GTC ATA GTG G
RYR2 072R	TCA GAT GAT CAT TAC CGC TG
RYR2 073F	TTG ACT TGT GAC AGT TGA TGC

RYR2 073R	CAA AAG GCT TTG CAA GTA GG
RyR2 083F	AAT GGA AAG CCT GTT TTG GT
RYR2 083i3	AGT AGA ACC CCC AAG AAG GAA GTG
RYR2 083i5	GAA TGG AAA GCC TGT TTT GGT TG
RYR2 083i5	GAA TGG AAA GCC TGT TTT GGT TG
RYR2 083R	AAC CAC TGA GTA GAA CCC CC
RYR2 086F	TAG AAA GCA TTT GCC TTT GG
RYR2 086R	AAC TCT GCC GTA TTG TTT CAA
RYR2 087F	CTT CTC AGG CAT AAA GTC CAA GAC TG
RYR2 087R	CAG AAA GGG GTC AAT AGG AGA TAT GG
RYR2 088F	TGA GGA ATA ATT GCC GTT TG
RYR2 088i3	AAT GTT TGG GGA CTC GAC TG
RYR2 088i5	CAC TAA GTC AAC TTT TCC CCT GTT
RYR2_088Fa	GCT GTG GGA TGC TGT GGT CA
RYR2 088R	AAT GAG CAA AAG AGG CAT GA
RYR2 089F	TCC TGC TGC ATA GTT TTC TTG
RYR2 089R	ACA CTC TGA TTC CAT AAG CCC
RYR2 090AF	ACA AAT GCA ACT GCT TTA CC
RYR2 090AFp	ACA AAT GCA ACT GCC TTA CC
RYR2 090AFs	AGA GTG AGA GAT AAA CAG GGA CAT ATC C
RYR2 090Ai3	ACG TTG AAG CCG ATG TCC
RYR2 090Ai5	TCC TTG ATT CAG ATG TTA TTA
RYR2 090AR	TTT CAT TCT CAT CCG TCT CC
RYR2 090ARs	GTC TTT TGG ACT CCT TGA CCT GG
RYR2 090BF	GAG CCA TAA GCA CTA CAC GC
RYR2 090BR	ATA GAC CCT CTC GAT GCG TT
RYR2 090CF	ATT AGC AGA GAG CGT CCT GA
RYR2 090Ci3	GGA AAA AGC CTC TGA AAA CGC TG
RYR2 090Ci5	GAA ATC AGT GAG TCC AGC CGA AC
RYR2 090CR	TAT TCG CTG ACC TCT CGT TC
RYR2 090DF	GGA CAC CAT CTT TGA AAT GC
RYR2 090DR	CAT GTC CTT CAC GGT CAT CT
RYR2 090EF	GAG CCT GAA GAA GCA GAT GA
RYR2 090ER	TCC CCA TCT CCT CTA ACC TC
RYR2 090FF	AAC ATG CCA GAC CCC ACT
RYR2 090Fi3	TGG AAA TTC AAG TCA CAT AGG TAA
RYR2 090Fi5	CTC GTC GAA GGT GCT AAA AAG AT
RYR2 090FR	CAG AGA GAA TGC TGC TGT GAC
RYR2 091F	CAG TAG GTC AGT GTG CAG AAG AAG C
RYR2 091R	GCA GCT CCC AAA GAC AGA GTA CAA G
RYR2 092F	GAT CAA CAG AAA ATC CTA CCC CTG A
RYR2 092R	GGA GAG GTC AGC AAA CAT TTA CTG AG
RYR2 093F	AGG TTT CAA GCC TGT TGA TTC
RYR2 093R	GCC TAG GCA CCA GTA TTT CA
RYR2 094F	AGG CTG TAT TTC TTT TGT CTT TT
RYR2 094R	CAG GTA CCT TGG TGC CTT ACT
RYR2 095F	TGA CCA CAA GAT ATG CCA GTA A
RYR2 095R	ACA AAT CTG CAG GAA CTC CA
RYR2 096F	TCA TTG TAA GTT TAC GTG GCA G
RYR2 096R	AAA TGG AGA CAT TAA TAG GCA GA
RYR2 097F	AAT GGT TGA AGC CAA CAA AA
RYR2 097R	GGA AAG GAA ATC AAT GCA CA

RYR2 097Rs	AAA GGA AAT CAA TGC ACA AG
RYR2 098F	TGT CCA AGT CTT GTC CCA TT
RYR2 098R	CTG CAG AAC TCC CAC AGT CT
RYR2 099F	TTC TGA CAT GTT CTT TCC CC
RYR2 099i3	GCA GTT TAG AAC AGG TGC AGA CCC
RYR2 099i5	TCC CCA ATC TCT AGT GTC CTC TCT CC
RYR2 099R	TCC CTG CAG TTT AGA ACA GG
RYR2 100F	TTC TCA CTA GAG CAC TCG CC
RYR2 100R	CTG CAG AAG CAG GAG ACA TT
RYR2 101F	AAA ATG GGT AAT GTC CCT CC
RyR2 101i3	TTG CCA GGA AAC ACT TGA
RyR2 101i5	CCA GAG TGA GGA TTA GGA AC
RYR2 101R	TCA GCT TCA GTG AGG AGG AT
RYR2 102F	TGT ACA TCT CCC CTT TCC CT
RYR2 102R	CCA GGA CAA CAA AGA AGC TG
RYR2_103Fa	TCT TGC TGC TGG TAC CTG TG
RYR2_103Ra	TCC GGG AGT CTC AGA AGA AA
RYR2 103F	AAC CAA ATA ATA GCT GCC CC
RYR2 103i5	ATG GCG AGT TGT GTT TTC CT
RYR2 103R	CGT CTA CTG GAG AGG TGG AA
RYR2 104F	GCC TTT CCT CTT TCT GGT ACA CTA A
RYR2 104i3	ACT ACT AAC AAT CTG CAC AGT GGA AGA G
RYR2 104i5	AGC CTC TAG GGT CAA ATA GCA ACA
RYR2 104R	GCC TCA CTG TTT AAT GCA CAC AT
RYR2 105F	GAC TTC TCT ATT CCG TGC GA
RYR2 105i3	TTC CGA AAC AGA GCT TCG AT
RYR2 105R	GAG AGA GGG GTA GGG TTT TG

➤ *CASQ2*

- Séquençage génomique

nom	amorçe
Exon 01F	TGT AAG GTA TCT GGG GCT TG
Exon 01R	TGG CCA AAG GCA TTC CCT CGG
CASQ_2eF	CTGAATCATCCTTCCCCTGA
Exon 02Rb	TTTTCTTTTGCAAGACACATTC
CASQ_3eF	AATCCTGACCCCACTGTGAC
CASQ_3eR	CAGGTTCTCCAGCTTGTCTT
Exon 04F	TAC AAC TTC CCT CCA ATG CAC TCT
Exon 04R	AGA GGT GCT GAA GAC CCA TC
CASQ_5eF	GGGGGAACTATGGGCTTAAA
CASQ_5eR	GGGTCATCACTTTTCTTGG
CASQ_6eF	GCTCTTGGCAGGTCTGAAAT
Exon 06R	GTT CTG TAC TGC TGG GGT ACT
Exon 7bF	AGA GCA GGT CTG TTT CCT TAG
Exon 7bR	TGA GCC GTC GTA CCC AAT CTG TC
Exon 08F	CAT TCC AGC TTC TGA GTC CCT GTC
Exon 08R	CCA ATA TCT TGC AGT TGC ATT G
exon 09Fe	CAA GAG ATC GCA CAG GAT CA
exon 09Re	ACG CAA TCA TGA GGT TGT GA
Exon 10F	CCA AGT CTT CAA TTT GCT AAG T
Exon 10R	CTG GCA AGT TTC CTT GAG CAG
Exon 11F	GGG CAC TCA GCA TAG CTA TTC
Exon 11R	GCT AAG TGG GAT TGC TGC AT

- Etude sur minigène

nom	amorçe
CASQ2mini3F	GGG ACG CGT GGA ATT GTT CTG GAC TAT TTC CAA
CASQ2mini3R	GGG GTC GAC GGC TTA AAG ATC ACT TTC CCA GT
pClneoF	GTT CAA TTA CAG CTC TTA AG
T3R	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG

➤ *TRDN*

- Séquençage génomique

nom	amorçe
TRDN 01I3	GCT CCT AAA TCC ACT TCT CAG ATC C
TRDN 01I5	AGA GGC AAA GTT CAA CAG GAC AAC
TRDN 02I3	CTA AGA TGA AAC AGA AAC CAA GCA GG
TRDN 02I5	CAG GTT CAG CAC TCA TAT AGT CAG TGT T
TRDN 03I5	CGC AAA AAA TTG TAG CCA GGA GA
TRDN 04I3	TTT GAA CCA TGC TGA AAA CCA A
TRDN 05I3	ACA CAA AAA TGT ATA TCT AAA TGA AGA AT
TRDN 05I5	TGA CAA CAT AGC TCT GTC TAT TAA ATG
TRDN 06I3	TGC GTG GTC ATC TAA AAT CTG AAT G
TRDN 06I5	TGC CGT GCA AAC ATC TCC TC
TRDN 07I3	CAA ATA TCC AAC TAT CTG TTA CCC A
TRDN 07I5	GCT TGC TAA GTC TTA ATG CCT AGA
TRDN 08F	TTT CTT CCC TCT TTC TTT TCC A
TRDN 08R	GAT TTC GGA TGC TAC CTC CA

- Séquençage et clonage de CT1 humain

nom	amorçe
T32rna 1I5	TGC AGA GGA GAG GCA AAG TT
T32rna 1R	GAT TTC GGA TGC TAC CTC CA

- Etude indirecte (microsatellites)

nom	amorçe
D6S1639F_6FAM	TCT CAA GGA AGT CTG CCC C
D6S1639R	GGA GAA ACA TTT AGA CCA TTG CAG T
D6S1712F_6FAM	ACG TTA TTC ATC TTT GCT ACT GGC
D6S1712R	TAG GTG TTA TGT ATT CCC AAC CC
D6S408F_6FAM	GCA GAA GCA GAC TGA GG
D6S408R	TTA CTG GAT GTC ATC TCT GTG
D6S979F_6FAM	GCC TAG GTG ATA GAG CAA AAC
D6S979R	CCC GCC TTT CTG CCT CTC
D6S988F_6FAM	CTC AGA TAA CAG ATT AGG GTG C
D6S988R	TTC ACG CAT ACA TAG AAA TTG

- Etude fonctionnelle

a. Séquence murine

nom	amorçe
GAPDH_F2_souris	CGT GCC GCC TGG AGA AAC
GAPDH_R2_souris	TGG GAG TTG CTG TTG AAG TCG

b. Séquence de rat

nom	amorçe
T32_F_rat	AGC CAA AGA AAC TCC GAA AA
T32_R_rat	TCC AGT GGC CGT ATG TAC TTC

➤ *ASPH*

nom	amorce
JCN_1F	AGT TTG TAG TCA GGT CCA ATT TCA G
JCN_1R	AGT CAG TAT CTC CAG GAG TTC AAA A
JCN_2F	AGG AGT TTA TTT CCT GCA CTA CTT C
JCN_2R	CTA TTG AGA ACC ACT GAA AGG CTA T
JCN_3F	TCT GAG TAG ATC TAT GCT TTG ACT G
JCN_3R	CCA TAA TGG GAA ATT GGT CCT A
JCN_4F	ACA CTG CTT TGC AGG ATT AAA AGA G
JCN_4R	CTA CCG TTA AAA TAT GCA TGG GAC
JCN_5F	GTG AAG TTG GTT AAA TCA TAG GCT G
JCN_5R	AAG CAA GAC CCA AAA GCA ATA G
JCN_6F	TGC ACC TAT TTT TAG CCA CCA
JCN_6R	TGT TTT TAC ATT TAG AAG TAT GAG ACG

➤ *FKBP1B*

nom	amorce
FKBP_1F	CAGTGGGTTAATGTCGTCAGG
FKBP_1Fb	GGC CAG GCT CGC TAA CAG
FKBP_1Fc	AGG TCC CGA CTC CAG CCG CA
FKBP_1R	TCCTAGACCCCAAGAATCC
FKBP_1Rb	GCC ACC TCC GAA TCA GAC
FKBP_1Rc	TCA GCA CCC TCC ACG CCA CC
FKBP_2F	GCATGGAGGGGAATGCAG
FKBP_2R	TAGAGGATGGCTGGTCACAG
FKBP_3F	TGTCCAGATTTCTGCTTGG
FKBP_3R	GCCCTGGCTGTAGAGTCAAA
FKBP_4F	TTGAGGATGGTTTGGGAAAA
FKBP_4R	AGCAACTTGGGCAGAGAGAA

Publications

Manuscrit 1

“Germline and somatic mosaicism for a mutation of the ryanodine receptor type 2 gene: implication for genetic counselling and patient caring.”

**ROUX-BUISSON, N., G. EGEE, I. DENJOY, P. GUICHENEY and J. LUNARDI
2011 Europace 13: 130-132.**

Germline and somatic mosaicism for a mutation of the ryanodine receptor type 2 gene: implication for genetic counselling and patient caring

Nathalie Roux-Buisson^{1*}, Grégory Egéa¹, Isabelle Denjoy^{2,3,4}, Pascale Guicheney^{3,4}, and Joel Lunardi^{1,5}

¹Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, Grenoble, France; ²AP-HP, Hôpital Lariboisière, Service de Cardiologie, Centre de Référence Maladies Rythmiques Héréditaires, Paris, France; ³INSERM, U956, Faculté de médecine Pierre et Marie Curie, site Pitié-Salpêtrière, Paris, France; ⁴UPMC Univ Paris 06, UMR_S956, IFR14, Paris, France; and ⁵INSERM, U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, France

* Corresponding author. Tel: +33 4 76 76 55 73; fax: +33 4 76 76 58 37, Email: nrrouxbuisson@chu-grenoble.fr

We identified a heterozygous p.Arg2401His mutation of *RYR2* by sequencing the DNA of a 7-year-old girl who was referred for catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT). Using high-resolution melting assay, we have demonstrated a mosaicism for this mutation in her asymptomatic mother which illustrates the benefit of extensive genetic analysis in CPVT, in particular regarding genetic counselling.

Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT) is a rare familial arrhythmogenic disease, characterized by syncope or sudden death induced by emotional or physical stress. The mortality rate in untreated individuals ranges from 30 to 50% by the age of 40. Since β -blockers and/or implantable cardioverter-defibrillator (ICD) can partially prevent arrhythmias and sudden death, early diagnosis through clinical and genetic screening is therefore essential. Mutations in the cardiac isoform of the ryanodine receptor gene (*RYR2*) have been associated with autosomal dominant forms of CPVT.¹

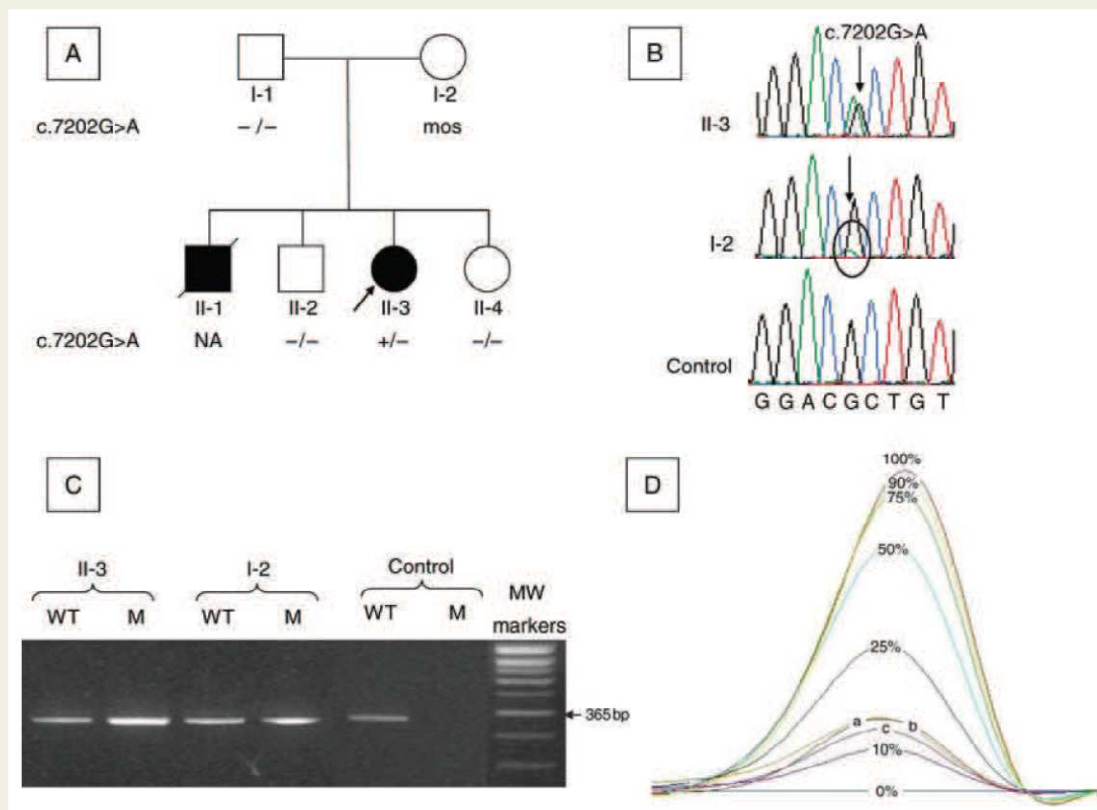


Figure 1 (A) Pedigree of the family. Black symbols indicate CPVT phenotype, +/- the heterozygous mutation carrier, -/- the non-mutation carrier, mos, the mosaicism, and NA not analysed. (B) Sequencing analysis. Arrows position the nucleotide variation at position c.7202 in the mother and proband's DNA. Circle highlights the mosaicism in mother's DNA. (C) ARMS-PCR. Primers were designed to generate a 365 bp amplification product (arrow). Lane M refers to the ARMS-PCR specific of the mutant allele and lane WT to the ARMS-PCR specific of the wild-type allele. (D) High-resolution melting. Profiles from maternal buccal (a), urinary (b), and leucocyte (c) DNA are compared with the indicated dilutions of the p.Arg2401His mutant DNA (proband DNA heterozygous for the mutation) with normal homozygous DNA to obtain a semi-quantitative estimation of the mosaicism.

We report here the case of a 7-year-old girl referred for CPVT after recurrent syncope and positive exercise stress test. Ventricular salvos, initially suppressed by nadolol, recurred at age 13, despite an increased dosage and an ICD were implanted. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia was also strongly suspected in her youngest brother who died suddenly at age 10 while running during a soccer game. All other family members were asymptomatic and had negative stress tests (Figure 1A).

After written informed consent, *RYR2* genetic analysis was performed by direct sequencing in patient's DNA and a heterozygous c.7202G>A; p.Arg2401His mutation in exon 47 was identified (Figure 1B). This mutation occurred in a highly conserved amino acid position, was not observed among 300 control chromosomes, and has been already reported in association with CPVT.²

The mutation was absent from the father's and the living sibling's DNA. However, direct sequencing of the mother's DNA suggested the presence of a somatic mosaicism, because a very small amount of an adenylic residue at position c.7202 was detectable, although the signal was too weak to be considered as a heterozygous mutation (Figure 1B). Using an amplification refractory mutation system (ARMS)-polymerase chain reaction (PCR) assay, we demonstrated the presence of the mutated allele in the mother's DNA (Figure 1C). We estimated the level of the mosaicism between 10 and 25% in mother's buccal swab, urinary cells, and leukocytes DNA by high-resolution melting assay (Figure 1D). The somatic maternal mosaicism demonstrated by DNA analysis and the existence of two children presenting with a CPVT phenotype were strong evidence for a germline maternal mosaicism.

Our work, as well as a recent *RYR2* mutation mosaicism report,³ highlights the potential risk of recurrence of CPVT in the case of *de novo* mutation. Sporadic cases of CPVT are usually thought to be caused by the occurrence of a *de novo* mutation in the proband but can also arise through the existence of mosaicism in the germ cells of one of the asymptomatic parents, leading to transmission of a mutated allele. In sporadic cases, the recurrence risk due to germline mosaicism is thought to be <1% but might be underestimated. Two possible origins can account for germline mosaicism: either the mutation occurs in a dividing germ cell and will strictly be germinal, or the mutation occurs very early during development and is therefore present in both somatic and germinal cells. The phenomenon of germline mosaicism justifies the systematic genetic screening of the siblings of a sporadic proband, even if standard methods failed to clearly detect the mutation in the parents. In the case of a germline and somatic mosaicism, and depending on the level of mosaicism in heart tissue, the patient concerned would also be at risk for CPVT. This study illustrates the potential benefits of extensive genetic analysis in these families, not only in terms of genetic counselling but also for clinical management.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the collaboration of the patient's family. We thank Myriam Berthet, Florence Berthoin, and Jonathan Trapani for their technical assistance.

Conflict of interest: none declared.

Funding

This work was supported by a Programme Hospitalier de Recherche Clinique (P040411, AOR 04070).

References

1. Laitinen PJ, Brown KM, Plippo K, Swan H, Devaney JM, Brahmabhatt B *et al*. Mutations of the cardiac ryanodine receptor (*RyR2*) gene in familial polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 2001;**103**:485–90.
2. Aizawa Y, Ueda K, Komura S, Washizuka T, Chinushi M, Inagaki N *et al*. A novel mutation in FKBP12.6 binding region of the human cardiac ryanodine receptor gene (R2401H) in a Japanese patient with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Int J Cardiol* 2005;**99**:343–5.
3. Medeiros-Domingo A, Bhuiyan ZA, Tester DJ, Hofman N, Bikker H, van Tintelen JP *et al*. The *RYR2*-encoded ryanodine receptor/calcium release channel in patients diagnosed previously with either catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia or genotype negative, exercise-induced long QT syndrome: a comprehensive open reading frame mutational analysis. *J Am Coll Cardiol* 2009;**54**:2065–74.

Manuscrit 2

“Functional analysis reveals splicing mutations of the *CASQ2* gene in patients with CPVT: implication for genetic counselling and clinical management.”

**ROUX-BUISSON, N., J. RENDU, I. DENJOY, P. GUICHENEY, A. GOLDENBERG
et al.,**

2011 Human Mutation 32: 995-999.

Functional Analysis Reveals Splicing Mutations of the *CASQ2* Gene in Patients with CPVT: Implication for Genetic Counselling and Clinical Management

Nathalie Roux-Buisson,^{1,2} John Rendu,^{1,3} Isabelle Denjoy,^{4,5} Pascale Guicheney,^{5,6} Alice Goldenberg,⁷ Nadine David,⁸ Laurence Faivre,⁹ Olivier Barthez,¹⁰ Gian Antonio Danielli,¹¹ Isabelle Marty,³ Joel Lunardi,^{1,2*} and Julien Fauré^{1,2}

¹Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, France; ²CNRS UMR 5525, Equipe AGIM3, Université Joseph-Fourier, Grenoble, France; ³Inserm U836, Grenoble Institut Neurosciences, La Tronche, France; ⁴Service de Cardiologie, Hôpital Lariboisière, AP-HP, Paris, France; ⁵Inserm, U956, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, Paris, France; ⁶UMR S956, IFR14, UPMC-Université Paris VI, Paris, France; ⁷Service de Génétique Clinique, Centre Hospitalier Universitaire de Rouen, France; ⁸Unité de Cardiopédiatrie, Centre Hospitalier Universitaire de Rouen France; ⁹Centre de Génétique, Hôpital d'Enfants, Centre Hospitalier Universitaire de Dijon, France; ¹⁰Service de Cardiologie, Centre Hospitalier Universitaire de Dijon, France; ¹¹Department of Biology, University of Padua, Italy

Communicated by Claude Ferec

Received 10 March 2011; accepted revised manuscript 4 May 2011.

Published online 25 May 2011 in Wiley Online Library (www.wiley.com/humanmutation). DOI 10.1002/humu.21507

ABSTRACT: Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT) is a rare and severe arrhythmogenic disorder. Although usually transmitted in a recessive form, few cases of dominant mutations have been reported. Thirteen mutations in the *CASQ2* gene have been reported so far in association with CPVT. We performed molecular analysis of the *CASQ2* gene in 43 probands with CPVT and identified eight mutations in five patients. Six mutations were novel: one was a single nucleotide deletion, three affected consensus splice sites, and two had unknown consequences: the c.939+5G>C and the synonymous c.381C>T variations. We demonstrated that these two variations affected *CASQ2* splicing using a splicing minigene assay. These data increased significantly the number of *CASQ2* mutations described in association with CPVT, revealed the high prevalence of splicing and truncating mutations in this gene and brought new insight regarding the dominant inheritance of the disease. Moreover, our report of the first splicing abnormalities in *CASQ2* caused by intronic mutation or synonymous change underlines the absolute necessity to perform extensive molecular analysis for genetic diagnosis and counseling of CPVT.

Hum Mutat 32:995–999, 2011. © 2011 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: CPVT; calsequestrin 2; minigene; synonymous variations

Introduction

Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT) is a rare inherited arrhythmogenic disorder with a

*Correspondence to: Joel Lunardi, Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, 217X, 38043 Grenoble Cedex, France. E-mail: jlunardi@chu-grenoble.fr

Contact grant sponsors: a DRCI grant from the CHU de Grenoble; a PHRC grant from APHP; Contract grant number: ADR04007/P040411; Contract grant sponsor: CNRS (to N. Roux-Buisson).

prevalence estimated at 1/10,000. Manifestations of CPVT include syncope, seizure, or sudden death induced by emotional or physical stress. A positive family history is present in at least 30% of cases. The resting electrocardiogram is usually normal and exercise stress test and/or electrocardiogram (ECG) Holter recording are mandatory to detect arrhythmias [Liu et al., 2007]. Whereas the mortality rate of CPVT reaches up to 50% by the age of 30 in untreated individuals [Laitinen et al., 2001], the disease can be effectively treated by beta adrenergic blockers and/or implantable cardioverter defibrillator (ICD) [Fisher et al., 1999]. New therapeutic approaches have been also recently proposed such as flecainide treatment [Watanabe et al., 2009] and cardiac sympathetic denervation [Wilde et al., 2008]. The early diagnosis of CPVT with clinical and genetic screening is thus of major interest.

CPVT is a genetically heterogeneous pathology with two genetic forms identified so far: an autosomal dominant form associated with mutations in the gene encoding the cardiac ryanodine receptor (*RyR2*), and a recessive form associated with mutations in the gene encoding the cardiac isoform of calsequestrin (*CASQ2*; MIM#114251) [Lahat et al., 2001; Priori et al., 2001]. The cardiac ryanodine receptor (*RyR2*) is an intracellular Ca²⁺ channel located in the membrane of the sarcoplasmic reticulum (SR) responsible for calcium release during cardiac excitation-contraction (E-C) coupling. Calsequestrin 2 is the major calcium storage protein in the SR of cardiomyocytes. *RyR2* and *Casq2* proteins interact together and are major regulators of calcium release during E-C coupling [Bers, 2002; Herzog et al., 2000].

Mutations in the *RyR2* gene associated with CPVT have been identified in 50 to 70% of cases [Liu et al., 2007]. *CASQ2* mutations are less frequently reported, probably because of their recessive mode of inheritance, and only 13 mutations in the *CASQ2* gene have been so far reported for CPVT (<http://www.fm.it/cardmoc>) [Hayashi et al., 2009].

In this work, we report eight recessive mutations of *CASQ2*, six being novel, that were identified in five patients after the screening of 43 CPVT probands. The patients enrolled for molecular investigations of CPVT were probands referred to the clinical centres for symptoms such as syncope with or without seizures, palpitations, or cardiac arrest ($n = 71$). Patients underwent

a 12-lead ECG, 24-hr Holter ECG, and an exercise stress test. The diagnosis of CPVT was made on clinical observation and electrocardiographic records. Five additional patients who died from cardiac arrest under effort or emotional stress were also included in the study. Blood samples used for genetic evaluation were obtained after a written informed consent was signed by patients according to the French regulation. In case of dominant transmission or sporadic cases ($n = 41$), a targeted mutational analysis of the *RyR2* gene was performed by dHPLC or direct sequencing. The molecular screening concerned exons encoding RyR2 domains of known function and that harbored 98% of the published *RyR2* mutations (exons 3, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 21, 26, 37, 40 to 50, 72, 73, 83, and 86–105). When no mutation was detected in the *RyR2* gene, *CASQ2* screening was performed by sequencing the entire coding sequence plus intron–exon junctions (GenBank NM_001232.3). Nucleotide numbering reflects cDNA numbering with +1 corresponding to the A of the ATG translation initiation codon in the reference sequence, according to journal guidelines (www.hgvs.org/mutnomen). The initiation codon is codon 1. As recessive transmission was suspected, *CASQ2* was analyzed without previous *RyR2* screening in two consanguineous families. When mutations were identified in probands, family members were screened, and ECG, 24-hr ECG Holter recordings and/or exercise stress test were performed when possible.

We identified eight *CASQ2* mutations in five families after screening of the *CASQ2* gene in 43 probands (Fig. 1). The diagnosis was made after cardiac arrest in the proband of families 1 and 5 that led to the death of the proband in the family 1. The three other probands experienced syncope and/or seizure (families 2, 3, and 4). The age at diagnosis ranged between 4 and 20 (Supp. Table S1). Homozygous *CASQ2* mutations were identified in the proband's DNA of families 1 and 2 that showed consanguinity, whereas the probands of families 3, 4, and 5 showed compound heterozygosity for distinct *CASQ2* mutations (Supp. Table S1). The identified mutations were two single nucleotide deletions *c.546delT*; *p.Phe182LeufsX209*, *c.603delA*; *p.Val1203LeufsX209* [Hayashi et al., 2009]; three single nucleotide substitution modifying a consensus acceptor or a donor splice site *c.320–2A>G* (intron 2), *c.737+1G>A* (intron 6),

c.1014+1G>A (intron 10); one synonymous *c.381C>T*, *p.Gly127Gly* variation (exon 3); one intronic variation *c.939+5G>C* (intron 9) and a missense mutation *c.164A>G*, *p.Tyr55Cys* [De La Fuente et al., 2008]. As shown presented in Figure 1, all affected patients were homozygous or compound heterozygous for *CASQ2* mutations with the two mutations transmitted under a recessive mode of inheritance. The eight variations identified were not found among 300 control chromosomes screened by dHPLC or sequencing. The frameshift deletions *c.546delT* and *c.603delA* resulted in the occurrence in both situations of a premature terminating codon (PTC) at the very same amino acid position 209. The three mutations *c.320–2A>G*, *c.737+1G>A*, *c.1014+1G>A* were predicted to induce respectively skipping of exons 3, 6, and 10. The skipping of the exons 3 and 6 would be associated with a frameshift leading to a PTC at positions 143 and 215, respectively. Introduction of PTC would lead either to synthesis of a non functional truncated protein or more likely to a nonsense mediated mRNA decay. At contrast, skipping of exon 10 resulted in an in frame deletion that corresponded to the loss of amino acids 314 to 338 and would alter the third thioredoxin domain of Casq2 spanning amino acids 247–370 [Kim et al., 2007]. Such a deletion is likely to cause a conformational change that would result either in the synthesis of a non functional Casq2 protein or in an abnormal degradation of the protein through the unfolded protein response [Rizzi et al., 2008].

Because the synonymous *c.381C>T* and intronic *c.939+5G>C* variations had unpredictable consequences we investigated their effect on splicing. We first used three splicing analyses softwares to evaluate their potential effects on splicing: NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>), Gene Splicer (http://www.tigr.org/tdb/GenSplicer/gene_sp1.html), and Automated Splice Site Analyses (https://splice.uwo.ca/cgi-bin/protected/menu.cgi?menu_gene.html) (Supp. Table S2). The variant *c.939+5G>C* was predicted to abolish or weaken the normal donor splice site of exon 9 at position *c.939+1_2* when using all three softwares. GeneSplicer and ASSA softwares indicated moreover the potential activation of a cryptic donor splice site 73bp downstream of the 3' end of exon 9. The synonymous *c.381C>T* variation in exon 3 was predicted to create a new donor site at position *c.380_381* by the three softwares, whereas the physiological donor splice site at

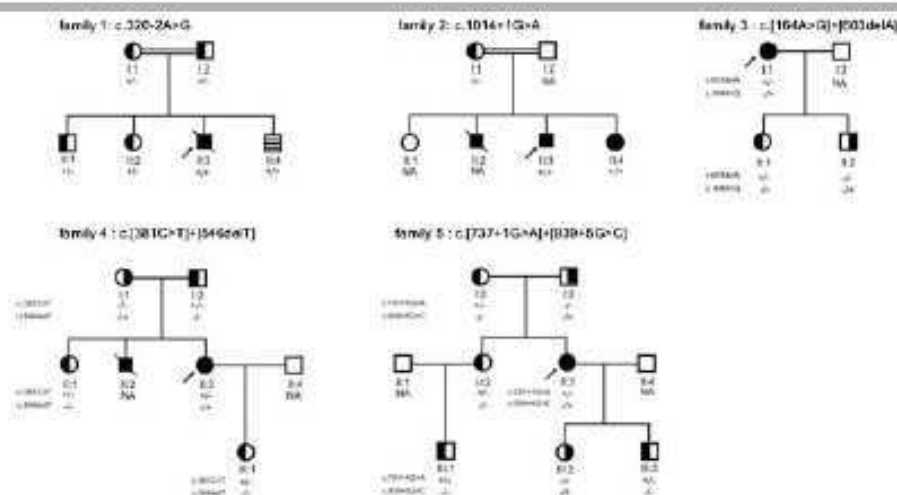


Figure 1. Pedigrees of the *CASQ2* families. Black symbols indicated affected individuals. Half-filled symbols indicated heterozygous individuals for a single mutation. Lined square indicated asymptomatic homozygous carrier. Arrows indicated the family proband. Double horizontal relationship lines indicated a degree of consanguinity. NA, not analyzed.

position c.420+1_2 was not recognized by the GeneSplicer and NetGene2 softwares. It was therefore plausible that a donor site resulting from the c.381C>T mutation might compete with a weak physiological splice site. *In silico* studies thus strongly argued in favor of an impact of the c.381C>T and c.939+5G>C variations on CASQ2 splicing.

Because cardiac mRNA from patients were not available, we tested the consequences of the c.381C>T and c.939+5G>C variations using a splicing minigene assay [Gamez-Pozo et al., 2007]. Briefly, each variation was introduced in a plasmid consisting in the succession of three exons each flanked by 200bp of intronic sequences. The wild-type and mutant minigenes were then cloned into the expression plasmid pCIneo and expressed in HEK293 cells (see Supp. Fig. S1). Effect of the mutations on splicing was assessed through sequencing analysis of RT-PCR products obtained from mRNAs expressed after transfection of the minigenes.

As shown Figure 2A, transfection of the pCI_WT9 minigene in HEK293 cells resulted in the production of one major mRNA product (band a). Sequencing analysis evidenced that this product consisted of the succession of the coding sequences of exons 8, 9, and 10. This result indicated that cells transfected with the wild-type minigene were able to produce completely processed mRNA encoded by the minigene. In contrast, the analysis of the RT-PCR product of the pCI_MT9 minigene designed to reproduce the c.939+5G>C variation revealed the presence of a single band with lower molecular weight (band b). Sequencing of the cDNA material

corresponding to this band evidenced the succession of exons 8 and 10 coding sequences only, thus providing evidence that the c.939+5G>C variant generated a skipping of exon 9 during *in vitro* splicing. Such skipping of exon 9 would result *in vivo* in the apparition of a PTC at position 291. As the PTC caused by the c.939+5G>C mutation occurred in the 3' portion of the gene, less than 55 bp from the final intron, the resulting transcript might be nevertheless stably translated into truncated protein [Khajavi et al., 2006]. Interestingly, Song et al. [2007] have generated a mice lacking exon 9 of CASQ2 and showed that the Casq2 protein was not detectable. Young mice had structurally normal hearts but stress-induced ventricular arrhythmias, and the authors concluded that the homozygous deletion of exon 9 cause CPVT phenotype in this murine model [Alcalai et al., 2010; Song et al., 2007]. Our data thus showed that the c.935+5G>C mutation leading to the same molecular defect, that is, skipping of exon 9, which causes an absence of Casq2 synthesis in mice, is also associated with CPVT in humans.

Likewise, and as shown in Figure 2B, RT-PCR and sequencing analysis carried out after transient transfection of the wild-type minigene pCI_WT3 showed a correct splicing event (band c). The analysis of the RT-PCR product of the pCI_MT3 minigene designed to reproduce the c.381C>T variation revealed the presence of a unique band of lower molecular weight (band d). Sequencing of this band evidenced a deletion of the last 40 nucleotides of exon 3 as a consequence of the creation of the donor cryptic splice donor site at position c.380_381. Furthermore, the absence of a band corresponding to the correctly spliced

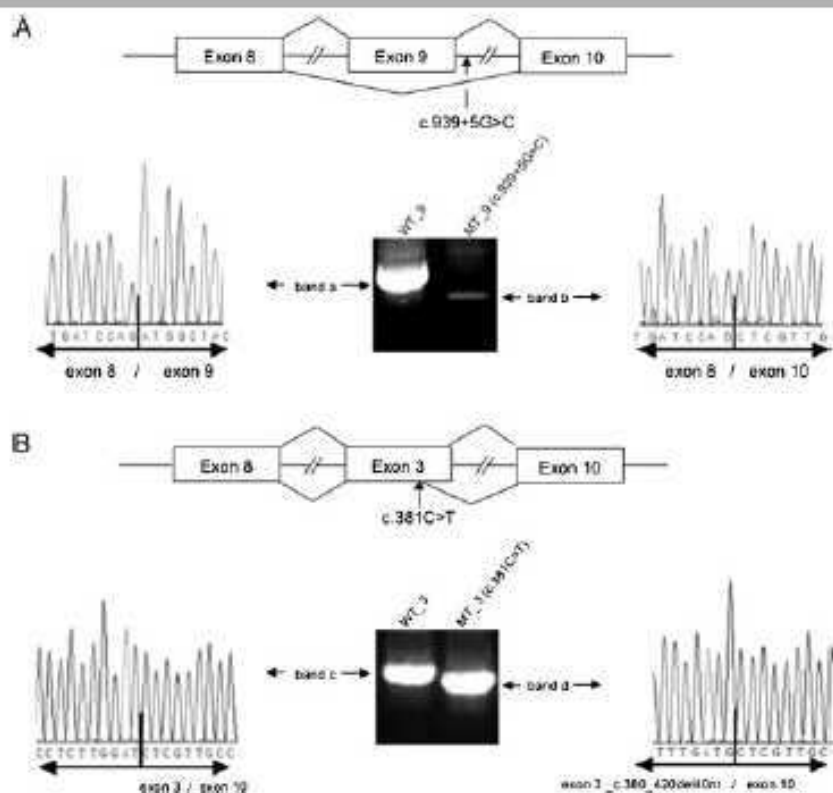


Figure 2. RNA splicing alteration caused by the c.381C>T and c.939+5G>C variants. **A:** Agarose gel analysis and sequences of the RT-PCR products obtained from cells transfected by pCI_WT9 and pCI_MT9. RT-PCR product from the wild-type minigene corresponded to the normal mRNA of 594 nt (band a), whereas the mutant minigene c.939+5G>C generated an abnormal mRNA product of 493 nt where the exon 9 was completely skipped (band b). The electropherogram obtained after sequencing of the band b shows the exon 9 skipping. **B:** Agarose gel analysis and sequences of the RT-PCR products obtained from cells transfected by pCI_WT3 and pCI_MT3. The wild-type minigene produced a correctly spliced mRNA of 594 nt (band c), whereas the mutant minigene produced a mature mRNA of 554 nt, deleted from the last 40 nucleotides of exon 3 (band d). Nucleotide numbering reflects cDNA numbering according to journal guidelines (www.hgvs.org/mutnomen).

transcript showed that the c.381C>T variant abolished in vitro the physiological splice site of exon 3, and replaced it by a new site 40bp 3' inside the exon as predicted by in silico analysis. This aberrant splicing would induce in cardiac cells a PTC at position 128, revealing the highly pathological impact on splicing of this synonymous substitution. Among the eight mutations identified in this study, six were novel frameshift or splicing mutations that resulted in the absence of Casq2 as a consequence of the occurrence of PTC that led either to nonsense-mediated mRNA decay (NMD) or protein degradation.

In family 1, we identified a homozygous c.320-2A>G mutation in a still asymptomatic 1-year-old child (patient II:4) who was thus preventively treated by acebutolol, and then nadolol. Clinical and genetic investigations confirmed CPVT diagnosis in individual II:4 of family 2, sister of the proband. She showed numerous polymorphic ventricular extrasystoles on exercise stress test and 24-hr Holter recording and was homozygous for the familial mutation c.1014+1G>A. She is currently treated by nadolol 80mg/day. Cascade screening of family members investigated in this report identified either nonmutation carriers ($n = 1$) or single heterozygous mutation carriers ($n = 16$). Clinical investigations of the families showed that the presence of a single heterozygous mutation could represent a potential susceptibility for ventricular arrhythmias [De La Fuente et al., 2008; Postma et al., 2002]. Indeed, individuals I:1 and I:2 in family 4, respectively, heterozygous for the c.546delT and the c.381C>T mutations, had respectively premature ventricular contraction and nonsustained ventricular tachycardia during stress test. On the other hand, no abnormalities were detected in individual II:1 of the same family who also harbored the heterozygous c.381C>T variation, underlying the complexity of correlating phenotype to genotype in CASQ2-linked CPVT. When CPVT diagnosis is suspected, genetic analysis is used along with clinical evaluation to confirm CPVT diagnosis and is therefore crucial for the screening of the family presymptomatic members. When CASQ2 variants are identified in CPVT cases, precise evaluation of the pathogenicity of the variation is therefore essential to provide reliable genetic counselling. All mutations identified were in accordance with an autosomal recessive mode of inheritance. Although apparently dominant forms of CPVT associated with CASQ2 have been reported [Liu et al., 2008; Postma et al., 2002], our data indicated that specific mutations can escape detection and that extensive analysis of the transcript has to be performed whenever possible, especially when only one variant had been identified. This will likely help to clarify the nature of the recessive or dominant transmission of CASQ2-associated CPVT and the question of the variable penetrance of mutations. Furthermore, and because CASQ2 is the unique gene associated yet with recessive forms of CPVT, we suggest that the screening of CASQ2 must be performed first line in case of consanguinity or of documented recessive inheritance, before the screening of RYR2.

In the present study, we found a prevalence of CASQ2 mutations of 7% among CPVT patients (5 out of 76 patients), in line with the previous reports [Liu et al., 2007]. To our knowledge, only 13 CASQ2 mutations have been yet reported (Supp. Fig. S2). Eight were missense mutations, one a nonsense mutation, three were frame-shift deletions, and one was a splice-site mutation. Noticeably, truncating and splicing mutations frequency appeared relatively high in our work (7 out of 8), whereas missense mutations seemed predominant so far in the literature. Moreover, this is the first report of splicing abnormalities in CASQ2 caused by an exonic synonymous substitution (c.381C>T) and an intronic variation outside the consensus

splice site (c.939+5G>C). Substitutions affecting the fifth nucleotide of 5' splice site are the most common substitution reported in the 5' splice site after substitution in the unvariant dinucleotide GT, suggesting an important role of this nucleotide in the splicing process [Buratti et al., 2007]. Translationally silent variations are usually classified as allelic polymorphisms and are considered to be neutral. However, beside possible subtle effects on translation efficiency owing to codon preference, these variations can alter splicing as demonstrated above. It is likely that such mutations are generally underreported, because they might be incorrectly assumed to be neutral polymorphisms that do not deserve further characterization. Our study therefore illustrates the usefulness of minigene assay for characterization of variants, especially for variants with no obvious consequences on splicing and a cardiac-specific gene expression like CASQ2, when mRNA is not available.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the collaboration of the patient's families. We thank Mr. J. Trapani and Mrs. E. Berthoin for their technical assistance, and Dr. P. Ray for critical reading of the manuscript.

References

- Alcalá R, Wakimoto H, Arad M, Planer D, Konno T, Wang L, Seidman KG, Seidman CE, Beral CI. 2010. Prevention of ventricular arrhythmia and calcium dysregulation in a catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia mouse model carrying calsequestrin-2 mutation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. [Epub ahead of print].
- Bers DM. 2002. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415:198-205.
- Buratti E, Chivers M, Kralowcova J, Romano M, Baralle M, Kainer AR, Vorechovsky I. 2007. Aberrant 5' splice sites in human disease genes: mutation pattern, nucleotide structure and comparison of computational tools that predict their utilization. *Nucleic Acids Res* 35:4250-4263.
- De la Fuente S, Van Langen IM, Postma AV, Blikker H, Meijer A. 2008. A case of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia caused by two calsequestrin 2 mutations. *Pacing Clin Electrophysiol* 31:916-919.
- Fisher JD, Knicker D, Halliday-Smith KA. 1999. Familial polymorphic ventricular arrhythmias: a quarter century of successful medical treatment based on serial exercise-pharmacologic testing. *J Am Coll Cardiol* 34:2015-2022.
- Gomez-Poco A, Palacios I, Kontic M, Menendez I, Camino I, Garcia-Miguel P, Abelairas J, Pestana A, Alonso J. 2007. Pathogenic validation of unique germline intronic variants of RB1 in retinoblastoma patients using minigenes. *Hum Mutat* 28:1243.
- Hayashi M, Denjoy I, Extramiana P, Maltret A, Buisson NR, Lupoglazoff JM, Klug D, Hayashi M, Takayuki S, Villain E, Kamblock J, Messali A, Guicheney P, Lunardi J, Leenhardt A. 2009. Incidence and risk factors of arrhythmic events in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 119:2426-2434.
- Herzig A, Szegedi C, Jona L, Herberg FW, Varsanyi M. 2000. Surface plasmon resonance studies prove the interaction of skeletal muscle sarcoplasmic reticular Ca²⁺ release channel/ryanodine receptor with calsequestrin. *FEBS Lett* 472:73-77.
- Khajavi M, Irone K, Lupski JR. 2006. Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. *Eur J Hum Genet* 14:1074-1080.
- Kim E, Youn B, Kemper L, Campbell C, Milting H, Varsanyi M, Kang C. 2007. Characterization of human cardiac calsequestrin and its deleterious mutants. *J Mol Biol* 373:1047-1057.
- Labat H, Pras E, Olander T, Avdan N, Ben-Asher E, Man O, Levy-Nissenbaum E, Khoury A, Lorber A, Goldman B, Lancel D, Eldor M. 2001. 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* 69:1378-1384.
- Laitinen PJ, Brown KM, Pilippo K, Swan H, Devaney JM, Brahmabham B, Donarum EA, Marino M, Tiso N, Viitasalo M, Toivonen L, Stephan DA, Kontala K. 2008. Mutations of the cardiac ryanodine receptor (RYR2) gene in familial polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 118:485-490.
- Liu N, Colombi B, Raychev-Buono EV, Bloise R, Priori SG. 2007. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Herz* 32:212-217.
- Liu QQ, Oberoi C, Zhang XQ, Ke T, Zhang T, Scheinman M, Hu DY, Wang QK. 2008. A novel mutation of P189L in CASQ2 in families with catecholaminergic

- polymorphic ventricular tachycardia. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 25:334-337.
- Postma AV, Denjoy I, Hoorntje TM, Lupoglazoff JM, Da Costa A, Sebillon P, Mannens MM, Wilde AA, Guicheney P. 2002. Absence of calyestrin 2 causes severe forms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res* 91:e21-e26.
- Priori SG, Napolitano C, Tiso N, Memmi M, Vignati G, Bloise R, Sorrentino V, Danieli GA. 2001. Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 103:196-200.
- Rizzi N, Liu N, Napolitano C, Noè A, Turcato F, Colombi B, Biciato S, Arcelli D, Spedino A, Scelsi M, Villani L, Esposito G, Boncompagni S, Pavesi F, Volpe P, Priori SG. 2008. Unexpected structural and functional consequences of the R33Q homozygous mutation in cardiac calyestrin: a complex arrhythmogenic cascade in a knock in mouse model. *Circ Res* 103:298-306.
- Song L, Alcalá R, Arad M, Wolf CM, Toka O, Conner DA, Beral CI, Eldar M, Seidman CE, Seidman JG. 2007. Calyestrin 2 (CASQ2) mutations increase expression of calyestrin and ryanodine receptors, causing catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Clin Invest* 117:1814-1823.
- Tourneris I, Vézain M, Martins A, Charbonnier F, Baert-Desarmont S, Olschwang S, Wang Q, Buisson MP, Soret J, Tazi I, Frébourg T, Tosi M. 2008. A large fraction of undclassified variants of the mismatch repair genes MLH1 and MSH2 is associated with splicing defects. *Hum Mutat* 29:1412-1424.
- Watanabe H, Chopra N, Laver D, Hwang HS, Davies SS, Roach DE, Duff HI, Roden DM, Wilde AA, Knollmann BC. 2009. Flecainide prevents catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in mice and humans. *Nat Med* 15:380-383.
- Wilde AA, Bhuiyan ZA, Crotti L, Facchini M, De Ferrari GM, Paul T, Ferrandi C, Koolbergen DR, Odero A, Schwartz PJ. 2008. Left cardiac sympathetic denervation for catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *N Engl J Med* 358:2024-2029.

SUPPLEMENTAL DATA

Table S1. Clinical data of *CASQ2* probands

Family	Age at first symptom	Symptoms	Treatment	Sporadic cases	Familial context
1	4	Cardiac arrest after emotion, Deceased during reanimation		Yes	Parents first cousins, origin turkey
2	7	Syncope and seizure at effort	Nadolol + ICD		Brother suddenly deceased at age 11, sister with positive stress test and Holter rhythm, parents consanguineous, origin Algeria
3	3	Syncope and seizure at effort or emotion	Nadolol 120 mg/d	Yes	None
4	10	Recurrent syncope at effort or emotion	Nadolol 240 mg/d + ICD		Brother deceased after cardiac arrest at age 4
5	7	Reccurent syncope, Cardiac arrest	ICD	Yes	None

Table S2. Predicted effect of the c.381C>T and c.939+5G>C variants by bioinformatics

Exon	Variant	Prediction Software	Score for natural donor site ^a		Predicted effect of the mutation
			Reference sequence	Variant sequence	
3	c.381C>T	GeneSplicer	0	0	Creation of a cryptic donor site at position 380_381 (score at 2.28)
		NetGene2	0	0	Creation of a cryptic donor site at position 380_381 (score at 0.76)
		ASSA	8.3	8.3	Creation of a cryptic donor site at position 380_381 (score at 9.5)
9	c.939+5G>C	GeneSplicer	9.84	0	Natural donor site abolished, activation of a donor splice site 73 bp downstream (score at 6.67)
		NetGene2	0.93	0	Natural donor site abolished
		ASSA	10.6	6.7	Natural donor site abolished, activation of a donor splice site 73 bp downstream (score at 5.5)

^a Threshold for recognition of a donor site: GeneSplicer : 0,46 / NetGene2 : 0,5 / ASSA : 0

Figure S1. Splicing minigene assay

A minigene splicing assay was performed to assess the pathogenic effect on exon 9 splicing of the unknown intronic variant c.939+5G>C of the *CASQ2* gene identified in patient 5. A wild type minigene was constructed by the juxtaposition of reference sequences of exons 8, 9 and 10 with 200 base pairs of the 5' and 3' intronic flanking sequences of each exon (S1 panel A). A c.939+5G>C mutant minigene was obtained by PCR site-directed mutagenesis carried out on the synthetic wild type minigene. The two minigenes were synthesized and cloned into pUC57 by the Genscript company (Piscataway, USA). The pUC57 minigene plasmids were subcloned into the expression vector pCIneo (Promega, Madison, USA), leading to a wild type minigene vector (pCI_WT9) and a mutant minigene vector (pCI_MT9).

The effect of the synonymous c.381C>T variation on exon 3 splicing was also assessed using a minigene assay (S1 panel B). The exon 3 with 200 bp intronic 5' and 3' flanking sequences was amplified from patient genomic DNA. Wild type (c.381C) and mutated (c.381T) amplified sequences were isolated and subcloned in the pCI_WT9 vector instead of exon 9 in order to obtain two minigenes: one with the nucleotide 381C (pCI_WT3) and one included the mutation 381C>T (pCI_MT3).

The splicing minigene assay was performed by transfecting each minigene plasmid in HEK 293 cells ($3 \cdot 10^5$ cells in single well of a six-well-plate) using ExGen 500 transfecting reagent according to the manufacturer's protocol (Euromedex, Souffelweyersheim, France).

Forty-eight hours after transfection, cells were collected by trypsination and centrifugation. The cell pellets were solubilized by addition of 30 μ l TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) and total RNA was extracted. cDNA was then synthesized from 500ng to 1 μ g of RNA followed by a targeted cDNA amplification obtained with primers on both sides of the

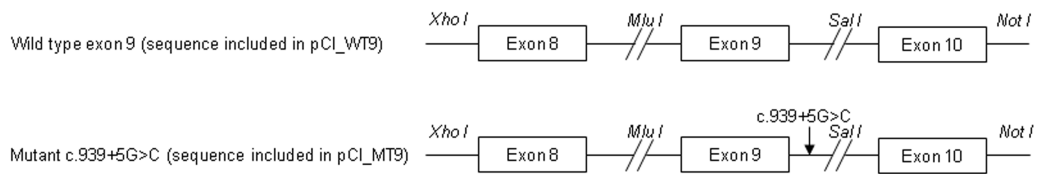
minigene sequence (Gamez-Pozo et al., 2007). The amplified fragments were separated on a 0.8% agarose gel and purified using Qiaquick gel extraction kit (Qiagen, Venlo, Holland). All RT-PCR products were then fully sequenced.

Figure S2. Schematic representation of the 19 mutations detected in *CASQ2* gene

Mutations reported in this work are written in bold characters. * indicates the previously found mutations also identified in this report. Missense mutations are indicated in the upper part of the figure whereas nonsense, frameshift and splicing mutations are indicated in the lower part. The references for all mutations cited as already published are available at <http://www.fsm.it/cardmoc>, except c.546delT (Hayashi et al., 2009).

Figure S1. Splicing minigene assay

A



B

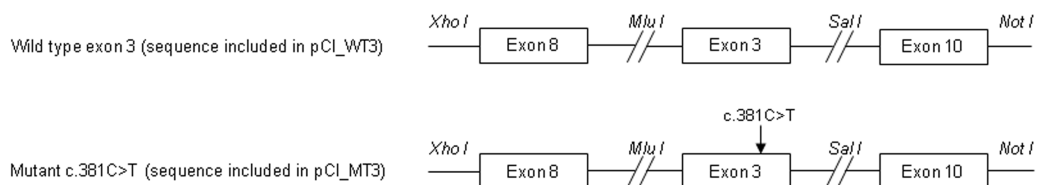
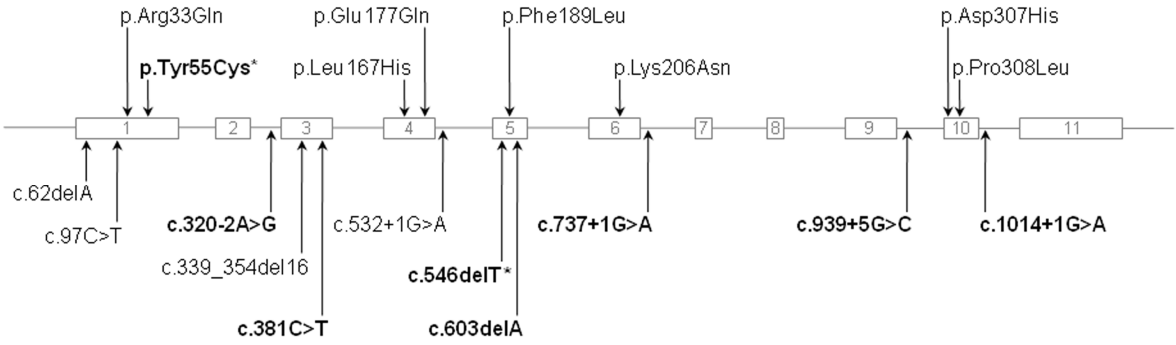


Figure S2. Schematic representation of the 19 mutations detected in *CASQ2* gene



Manuscrit 3

“Absence of Triadin, a Protein of the Calcium Release Complex, is Responsible for Cardiac Arrhythmia with Sudden Death in Human.”

NATHALIE ROUX-BUISSON, N., M. CACHEUX., A. FOUREST-LIEUVIN, J. FAUCONNIER, J. BROCARD, et al.,

Human Molecular Genetics, sous presse

Absence of Triadin, a Protein of the Calcium Release Complex, is Responsible for Cardiac Arrhythmia with Sudden Death in Human

Journal:	<i>Human Molecular Genetics</i>
Manuscript ID:	HMG-2012-D-00074.R1
Manuscript Type:	2 General Article - UK Office
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Roux-Buisson, Nathalie; CHRU de Grenoble, Biochimie et Génétique Moléculaire Cacheux, Marine; INSERM U836, Grenoble Institut des Neurosciences Fourest-Lieuvin, Anne; INSERM U836, Grenoble Institut des Neurosciences Fauconnier, Jeremy; INSERM U1046, Physiologie et Médecine Experimentale du Coeur et des Muscles Brocard, Julie; INSERM U836, Grenoble Institut des Neurosciences Denjoy, Isabelle; Centre de Référence Maladies Cardiaques Héritaires, Hôpital Bichat Durand, Philippe; Service de Réanimation Pédiatrique et Médecine Néonatale, Hôpital du Kremlin Bicêtre Guicheney, Pascale; Inserm, U956; UPMC, IFR14 Kyndt, Florence; INSERM, UMR915, Institut du thorax Leenhardt, Antoine; Centre de Référence Maladies Cardiaques Héritaires, Hôpital Bichat Le Marec, Hervé; INSERM, UMR915, Institut du thorax Lucet, Vincent; Unité de rythmologie et de cardio-pédiatrie, Château des Côtes Mabo, Philippe; Service de Cardiologie et Maladies Vasculaires, CHU Rennes Probst, Vincent; CHU de Nantes, Service de Cardiologie; INSERM, UMR 915; Université de Nantes, l'institut du thorax Monnier, Nicole; CHRU de Grenoble, Biochimie et Génétique Moléculaire Ray, Pierre; CHRU de Grenoble, Biochimie et Génétique Moléculaire Santoni, Elodie; CHRU de Grenoble, Biochimie et Génétique Moléculaire Trémeaux, Pauline; CHRU de Grenoble, Biochimie et Génétique Moléculaire Lacampagne, Alain; INSERM U1046, Université Montpellier1, Physiology and experimental Medicine Fauré, Julien; INSERM U836, Grenoble Institut des Neurosciences Iunardi, joel; CHRU de Grenoble, Biochimie et Génétique Moléculaire Marty, Isabelle; Inserm U836, Grenoble Institut des Neurosciences
Key Words:	genetic disease, cardiac arrhythmia, mouse model, mutation, viral transduction

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

For Peer Review

1
2
3 **Absence of Triadin, a Protein of the Calcium Release Complex, is Responsible for**
4 **Cardiac Arrhythmia with Sudden Death in Human**
5
6
7
8
9

10 Nathalie Roux-Buisson^{1,1,2,3,4}, Marine Cacheux^{1,1,4}, Anne Fourest-Lieuvin^{1,4,5}, Jeremy
11 Fauconnier⁶, Julie Brocard^{1,4}, Isabelle Denjoy⁷, Philippe Durand⁸, Pascale Guicheney⁹,
12 Florence Kyndt¹⁰, Antoine Leenhardt⁷, Hervé Le Marec¹¹, Vincent Lucet¹², Philippe Mabo¹³,
13 Vincent Probst¹¹, Nicole Monnier^{1,2}, Pierre F. Ray^{2,3,4}, Elodie Santoni², Pauline Trémeaux²,
14 Alain Lacampagne⁶, Julien Faure^{1,2,4}, Joël Lunardi^{1,2,4}, Isabelle Marty*^{1,4},
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

25 ¹INSERM U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Equipe Muscle et Pathologies,
26 Grenoble, France
27
28

29 ²CHRU de Grenoble, Hopital Michallon, Biochimie et Génétique Moléculaire, Grenoble,
30 France
31
32

33 ³Laboratoire AGIM, FRE 3405 CNRS-UJF, Equipe Génétique Infertilité et Thérapeutique,
34 Domaine de la Merci, La Tronche, France
35
36

37 ⁴Université Joseph Fourier, Grenoble, France
38
39

40 ⁵Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, Direction des Sciences du
41 Vivant, CEA Grenoble, France.
42
43

44 ⁶INSERM U1046; Université Montpellier 1; Université Montpellier 2; CHU de Montpellier,
45 Montpellier, France.
46
47

48 ⁷Centre de Référence Maladies Cardiaques Héritaires, Université Paris Diderot, Sorbonne
49 Paris Cité, Service de Cardiologie, AP-HP, Hôpital Bichat, Paris, France.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

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

⁸ Service de Réanimation Pédiatrique et Médecine Néonatale, Hôpital du Kremlin Bicêtre, AP-HP, France

⁹ INSERM, UMR S 956, Paris, France; and Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, IFR14, Paris, France

¹⁰ INSERM, UMR915, l'institut du thorax, Nantes ; CHU Nantes, Service de Génétique Médicale; CHU Nantes, l'institut du thorax, Nantes, France

¹¹ INSERM, UMR915, l'institut du thorax, Nantes; Université de Nantes, Nantes; CHU Nantes, l'institut du thorax, Nantes, France

¹² Unité de rythmologie et de cardio-pédiatrie, Château des Côtes, Les loges en Josas, France

¹³ Service de Cardiologie et Maladies Vasculaires, CHU Rennes, Rennes, France

[‡]These two authors contributed equally to this work.

*Correspondence should be addressed to:

Isabelle Marty

GIN - Inserm U836 –Eq Muscle et Pathologies

Bat EJ Safra – Chemin Fortuné Ferrini

38700 La Tronche - FRANCE

Tel : 33 4 56 52 05 71

Fax : 33 4 56 52 05 72

isabelle.marty@ujf-grenoble.fr

The sequence of human Trisk 32 indentified in this work is accessible in GenBank database under accession number JN900469

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

Abstract

Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT) is an inherited arrhythmogenic disease so far related to mutations in the cardiac ryanodine receptor (*RYR2*) or the cardiac calsequestrin (*CASQ2*) genes. Because mutations in *RYR2* or in *CASQ2* are not retrieved in all CPVT cases, we searched for mutations in the physiological proteins partners of RyR2 and CSQ2 in a large cohort of CPVT patients with no detected mutation in these two genes. Based on a candidate gene approach, we focused our investigations on triadin and junctin, two proteins that link RyR2 and CSQ2. Mutations in the triadin (*TRDN*) and in the junctin (*ASPH*) genes were searched in a cohort of 97 CPVT patients. We identified three mutations in triadin which cosegregated with the disease on a recessive mode of transmission in two families, but no mutation was found in junctin. Two *TRDN* mutations, a 4-bp deletion and a nonsense mutation, resulted in premature stop codons; the third mutation, a p.T59R missense mutation was further studied. Expression of the p.T59R mutant in COS-7 cells resulted in intracellular retention and degradation of the mutant protein. This was confirmed after *in vivo* expression of the mutant triadin in triadin KO mice by viral transduction. In this work, we identified *TRDN* as a new gene responsible for an autosomal recessive form of CPVT. The mutations identified in the two families lead to the absence of the protein, thereby demonstrating the importance of triadin for the normal function of the cardiac calcium release complex in humans.

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

Introduction

Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT; MIM #604772), a potentially fatal cardiac arrhythmia, is a genetic disorder characterized by stress induced syncope and/or sudden death in juveniles and young adults in the absence of structural alteration of the heart (1, 2). The two genes currently associated with CPVT, *RYR2* and *CASQ2*, encode proteins responsible for sarcoplasmic reticulum (SR) calcium release during cardiac muscle contraction. They belong to the macromolecular calcium release complex (CRC), composed mainly of following proteins: the SR calcium release channel ryanodine receptor (RyR2); the calsequestrin (CSQ2), which acts as a calcium buffer inside the SR; triadin and junctin, two proteins that have been implicated in anchoring calsequestrin to RyR2, at the terminal cisternae of SR (3, 4). Mutations have been identified in *RYR2* and *CASQ2* in only 70 % of the patients affected by CPVT, indicating that other genes are involved in this disease. Therefore the genes encoding triadin or junctin, the two linkers between RyR2 and CSQ2, naturally appeared as interesting candidate genes for CPVT.

Triadin is a multiprotein family arising from the alternative splicing of a single *TRDN* gene (MIM #603283) localized on Chr6 and containing 41 exons (5). Two isoforms, Trisk 95 and Trisk 51 are exclusively expressed in skeletal muscle. A third one, Trisk 32 (also called CT1) is expressed mainly in cardiac muscle (6). Two triadin knock-out (KO) mouse models have been developed, presenting with cardiac arrhythmia and skeletal muscle weakness (7-9). Therefore the presence of triadin seems essential for normal cardiac and skeletal muscle function.

Junctin, a 26 kDa protein expressed both in skeletal and cardiac muscle (10) (MIM #600582), is an alternative splice product of the aspartyl- β -hydroxylase gene on Chr8 (*ASPH*, (11)). Two junctin isoforms are expressed in human cardiac muscle (12). Junctin is involved in regulation

1
2
3 of the calcium homeostasis, and deletion of junctin in a mouse model results in fatal
4
5 arrhythmia (13).

6
7 This study presents the molecular investigations performed in a large panel of well
8
9 characterized CPVT patients in which mutations in *RYR2* and *CaSQ2* genes had been
10
11 excluded. Pathophysiological and clinical consequences of the mutations identified in the
12
13 *TRDN* gene in two families have been analyzed and will be discussed.
14
15

16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60

Clinical phenotype

The proband of Family 1 (ind II:1, Figure 1) originated from French West Indies. He was a two-year-old boy who experienced syncope followed by cardiac arrest after a shock while playing with his 7-year-old brother. Resting electrocardiogram following cardiac resuscitation showed numerous polymorphic or bidirectional ventricular extra beats and runs of polymorphic ventricular tachycardia (Supplementary Figure S1a). He died in the hospital 3 weeks following the initial cardiac arrest after a severe post-anoxic coma. There was no positive family history. The parents and the brother of the proband were considered as healthy as their resting ECG, Holter recordings and exercise stress tests did not show any abnormality.

The proband of Family 2 (ind II:2, Figure 1) originated from Western France. He was a 26-year-old man who presented with recurrent syncopes at exercise since the infancy. Resting ECG was normal with no prolongation of the QT interval. Exercise testing showed numerous bidirectional ventricular extra beats (Supplementary Figure S1b). The patient also presented with proximal muscle weakness. CPVT was also diagnosed in his dizygotic twin-brother (ind

1
2
3 II:3) after clinical examination. They were both treated by nadolol 40 mg/day, a non selective
4
5 β -blocker. Clinical evaluation, Holter recording and exercise testing did not show any
6
7 abnormalities among other family members investigated (ind II:1 and III:1).
8
9

10 11 Genetic analysis

12
13
14 Molecular analysis of *TRDN* gene in Family 1 identified a c.del53_56ACAG homozygous
15
16 deletion in exon 2. This deletion of 4 nucleotides resulted in a frameshift in the amino acid
17
18 sequence from amino acid 18 leading to a premature termination codon (PTC) at position 31,
19
20 designed p.D18Afs*13 according to the nomenclature proposed by the Human Genome
21
22 Variation Society (14) (<http://www.hgvs.org/mutnomen/recs-prot.html>). This mutation was
23
24 identified at a heterozygous state in the three unaffected relatives tested (Figure 1a).
25
26 Haplotype analyses were performed in the family using polymorphic markers flanking the
27
28 *TRDN* gene (cen-D6S1712-D6S979-TRDN-D6S1639-D6S408-tel) and were suggestive of a
29
30 remote common ancestor.
31
32

33
34
35 Molecular analysis in Family 2 revealed that the two affected individuals II:2 and II:3 were
36
37 compound heterozygous for a c.176C>G missense mutation in exon 2 that led to the
38
39 substitution of a threonine by an arginyl residue at position 59 (p.T59R) and a c.613C>T
40
41 nonsense mutation in exon 8 that introduced a premature termination codon at position 205 in
42
43 the amino acid sequence (p.Q205*). Unaffected individuals tested carried one (ind III:1) or no
44
45 variant (ind II:1) (Figure 1a).
46
47

48
49 In both families, the phenotype-genotype analysis was in favor of a recessive form of CVPT.
50
51 The frameshift deletion c.del53_56delACAG; p.D18Afs*13 inducing a stop codon in position
52
53 31 would result in deletion of the major part of the protein, and the production of a short
54
55 cytosolic peptide as the stop was located before the transmembrane helix (Figure 1b). The
56
57

1
2
3 nonsense variation c.613C>T; p.Q205* generated a stop codon in position 205, just before the
4
5 KEKE motif (15) located in position 210-224 responsible for interaction of Trisk 32 with
6
7 RyR2 and CSQ2 (16, 17). These two mutations resulting into a PTC were clearly pathogenic
8
9 because they would lead either to an absence of protein synthesis via nonsense mediated
10
11 mRNA decay (18), or to the production of a non functional protein. The p.T59R variation
12
13 affected a well conserved position in Trisk 32 and resulted in the introduction of a positively
14
15 charged amino-acid in the transmembrane domain of the protein. The deleterious effect of the
16
17 substitution within the transmembrane domain of this conserved threonine at position 59 by
18
19 an arginine was less predictable and was thus further studied.
20
21
22
23
24

25 Localization of the mutant p.T59R in a model cell line

26
27 The effect of the p.T59R mutation on the behavior of Trisk 32 was first studied by expression
28
29 in the non muscle COS-7 cell line, and analysis of the localization of the wild type (T32) or
30
31 mutant protein (T32-T59R) by confocal microscopy. When expressed in COS-7 cells the wild
32
33 type Trisk 32 was localized in the plasma membrane of 83% of the cells (Figure 2a, panel
34
35 PM) and in the endoplasmic reticulum for the remaining 17% of the cells (Figure 2a, panel
36
37 ER) (n=500 cells). The p.T59R mutation induced the exclusive localization of Trisk 32 in an
38
39 intracellular compartment (100%, n=500 cells), identified as endoplasmic reticulum by co-
40
41 localization with the ER resident protein calnexin (Supplementary Figure S2a). This
42
43 observation was confirmed by differential immunofluorescent labeling before and after
44
45 permeabilization of the cells (Figure 2b). Whereas Trisk 32 was labeled both on intact and
46
47 permeabilized cells, confirming its plasma membrane localization, the mutant Trisk 32-T59R
48
49 was accessible only after permeabilization thus indicating an intracellular retention. This
50
51 intracellular retention was also confirmed by biotinylation of cell surface proteins
52
53 (Supplementary Figure S2b).
54
55
56
57
58
59
60

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

Stability of the mutant Trisk 32-T59R in a model cell line

As a lower level of expression of Trisk 32-T59R was observed in COS-7 cells compared to the wild type Trisk 32, the stability of the mutant protein was evaluated. After transfection in COS-7 cells, Trisk 32 and Trisk 32-T59R appeared as a triple band of centered on 37kDa, due to post-translational modification (glycosylation), as observed previously (19, 20). Transfected cells were incubated with cycloheximide (CHX), a protein synthesis inhibitor, and the amounts of Trisk 32 and Trisk 32-T59R were analyzed by quantitative Western blotting after various incubation times. The relative amount of Trisk 32-T59R decreased faster than the relative amount of Trisk 32 (Figure 3a), indicating a faster turnover of the mutant Trisk 32-T59R compared to the wild type Trisk 32. This suggested that the abnormal localization observed for Trisk 32-T59R could result in protein instability and degradation. This degradation was further analyzed by proteasome inhibition by MG132. Proteasome inhibition did not increase the total amount of the wild type Trisk 32, but it raised the amount of the mutant Trisk 32-T59R by 148% (Figure 3b). This showed that Trisk 32-T59R was targeted for proteasome-mediated degradation. Altogether results in COS-7 cells showed that mutant Trisk 32-T59R was unable to exit ER after synthesis and was prone to degradation most probably via the proteasomal pathway.

Stability and localization of the mutant Trisk 32-T59R after *in vivo* expression

The behavior of the mutant Trisk 32-T59R was further studied after re-expression in triadin KO mouse. The triadin KO mouse, a mouse line devoid of any triadin isoform, has been previously shown to present both cardiac arrhythmia (8) and muscle weakness (9). Viruses (AAV2/9, which preferentially target the heart in adult mice (21, 22)) were developed to induce *in vivo* expression of the wild type and mutant Trisk 32 proteins in the heart of triadin

1
2
3 KO mice. One month after systemic injection of the viral vectors, the cardiomyocytes were
4
5 isolated and characterized by different methodological approaches. The mRNA expression
6
7 levels studied by semi-quantitative RT-PCR of the wild type Trisk 32 and the mutant Trisk
8
9 32-T59R were similar (Figure 4a), showing that the mutation did not affect transcript stability.
10
11 In contrast, the determination of the protein expression levels by quantitative Western blot on
12
13 cardiomyocytes homogenates (Figure 4b) showed that no mutant protein could be detected in
14
15 any of the 6 transduced mice, whereas the transduced wild type Trisk 32 was detected in all
16
17 the mice (Figure 4b and Supplementary Figure S3). This difference in expression was
18
19 confirmed by immunofluorescence labeling on fixed cardiomyocytes (Figure 5). In wild type
20
21 cardiomyocytes (Figure 5, panels a-c), Trisk 32 presented a typical dyad labeling, a row of
22
23 dots co-localized with RyR2. In the triadin KO cardiomyocytes (Figure 5, panels d-f), Trisk
24
25 32 labeling was absent and RyR2 labeling was not modified. After transduction of Trisk 32 or
26
27 Trisk 32-T59R in the triadin KO mice, only the transduced wild type Trisk 32 was detected,
28
29 in the dyads of cardiomyocytes, where it perfectly colocalized with RyR2 (Figure 5, panels g-
30
31 i) while the transduced mutant Trisk 32-T59R was not detectable (Figure 5, panels j-l). This
32
33 suggests although the mRNA of Trisk 32-T59R is expressed in the cardiomyocytes of the
34
35 mice, the protein is absent.
36
37
38
39
40
41
42

43 Discussion

44
45 Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia is a life-threatening inheritable
46
47 disease that predisposes young individuals with normal cardiac structure to cardiac arrest. Pre-
48
49 symptomatic genetic screening is of major importance for CPVT families, since life-saving
50
51 preventive treatments are available. Therefore the identification of causative mutations
52
53 constitutes a major issue for CPVT families. Up to now, two genes have been involved in this
54
55 disease. They encode proteins which constitute the core of the cardiac calcium release
56
57
58
59
60

1
2
3 complex: RyR2 in the dominant forms of CPVT and CSQ2 in the recessive forms. However,
4
5 almost 1/3 of the patients remained without an identified molecular defect. In the present
6
7 work, we searched for mutations in other genes in a panel of 97 CVPT patients without
8
9 mutations in the *RYR2* and *CASQ2* genes. We focused our screening on triadin and junctin
10
11 which are the physiological partners of RyR2 and CSQ2 in the calcium release complex. No
12
13 mutation was identified in junctin, whereas 3 mutations were identified in triadin. The
14
15 characterization of the physiopathological mechanisms is of uppermost importance for a
16
17 better understanding of the disease and for the development of new therapies, as the current
18
19 therapies are not fully satisfying (1). Along this line, we searched for the functional
20
21 consequences of the *TRDN* mutations. Two of these mutations resulted in a premature stop
22
23 codon, and the corresponding proteins are most probably not produced as a consequence of
24
25 NMD (18). Thus we focused our investigation on the third mutation, the missense p.T59R.
26
27

28
29 To study the consequences of this mutation, we analyzed the localization and the stability of
30
31 the mutant protein in COS-7 cells and in cardiomyocytes. All the experiments we performed,
32
33 either in transfected COS-7 cells or in cardiomyocytes from triadin KO mice transduced *in*
34
35 *vivo*, showed that the p.T59R mutation resulted in instability of the protein, leading to its
36
37 degradation. It would be interesting in this context to assay the ability of blockers of ER
38
39 quality control or of molecular chaperones to restore the folding of Trisk 32 –T59R and its
40
41 correct targeting instead of its degradation, as done for α -sarcoglycan mutations in Limb
42
43 Girdle Muscular Dystrophy type 2D (23, 24). The likely absence of protein as a result of the
44
45 mutation in patient's heart could only be further confirmed by Western blot on a cardiac
46
47 biopsy, which was not available. As the two other mutations (p.D18Afs*13, homozygous
48
49 mutation in Family 1 and p.Q205*, compound heterozygous mutation associated to p.T59R in
50
51 Family 2) most likely resulted in the absence of protein, all the affected patients in this study
52
53 can be considered as natural triadin KO cases. The severe CPVT phenotype observed in these
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 patients thus highlights the role of triadin in the regulation of the calcium release during
4 cardiac contraction. In addition, the identified mutations mapped to a region of the *TRDN*
5 gene which is common to all triadin isoforms including the skeletal muscle Trisk 95 and Trisk
6 51. Thus, these 3 mutations would also lead to an absence of triadin in the skeletal muscle.
7
8 This would give a possible explanation for the associated muscle weakness that was clinically
9 observed in individual II:2 in Family 2. The affected patient in Family 1 died so young (2
10 years) that muscle weakness couldn't have been detected, but it could be envisaged that CPVT
11 related to triadin mutation systematically affect both cardiac and skeletal muscle. Therefore,
12 when a CPVT patient presents also with a moderate muscle weakness, screening of *TRDN*
13 gene should be performed at first. In this context, the triadin KO mouse is a good model to
14 study the consequences of triadin deletion in human, as it presents with the same disease
15 hallmarks: muscle weakness (9) and cardiac arrhythmia induced by β -adrenergic stimulation
16 (8). Different mechanisms have been proposed to explain the cardiac arrhythmia resulting of
17 *RYR2* or *CASQ2* mutations (2, 25). Among the possible mechanisms, one is related to the
18 dissociation of FKBP12.6 from RyR2 in the case of *RYR2* mutation, which would result in a
19 leaky Ca^{2+} channel (26). This mechanism could be envisaged for the triadin deletion resulting
20 from the mutations identified in the present study, as it has been proposed in the triadin KO
21 mouse that triadin ablation could impair FKBP12/RyR1 interaction in skeletal muscle (27).
22 Such a hypothesis should nevertheless be confirmed in the heart for FKBP12.6/RyR2
23 interaction. Another mechanism proposed as a result of *CASQ2* mutations is a reduction in the
24 amount of CSQ2 or in the calcium binding capacity of the mutant CSQ2. Such a mechanism
25 could also be proposed in the case of the identified triadin mutations, as a CSQ2 reduction has
26 been observed in triadin KO mouse heart (8). Therefore the triadin mutations identified in the
27 present study, and the characterization of the triadin KO mice lines performed previously (8,
28 9) confirmed the hypothesis that CPVT could be more generally the result of a functional

1
2
3 defect in the calcium release complex (2, 28). Our study clearly showed that mutations in the
4 *TRDN* gene are responsible for CPVT in human and is therefore a gene to systematically
5 investigate when screening familial CPVT. Nevertheless, the absence of mutation in *RYR2*,
6 *CASQ2*, *ASPH* and *TRDN* in the 94 remaining patients of this cohort points to the limitation
7 of the gene candidate approach. To search for other genes that might be involved, a large
8 scale screening should be performed in these patients. Finally, this paper described for the
9 first time an involvement of the *TRDN* gene in human pathology, and interestingly, although
10 this gene encodes for cardiac and muscle triadins, the pathology is mainly a cardiac one.
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

26 **Materials and Methods**

27 **Ethics Statement**

28 Investigations of patient population reported in the paper received a formal approval from the
29 Regional Medical Ethical Committee (Comité de Protection des Personnes, CHU de Saint-
30 Etienne, France). All procedures using animals were approved by the Institutional ethics
31 committee and followed the guidelines of the National Research Council Guide for the care
32 and use of laboratory animals.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

47 **Clinical evaluation of probands**

48 The patient population consisted in 97 CPVT probands carefully characterized after clinical
49 examination and electrocardiographic records. Referred to the clinical centres for syncope
50 with or without seizures, or cardiac arrest, they have been diagnosed on the basis of typical
51 polymorphic ventricular arrhythmia recorded on 12-lead ECG, and after 24-hour Holter ECG
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 and exercise stress test. Family members were evaluated at least by resting ECG, and when
4
5 possible a 24-hour ECG Holter recordings and exercise stress test were performed.
6
7

8 9 10 **Genetic Analysis**

11 Blood samples used for genetic evaluation were obtained after a written informed consent was
12 signed by patients according to the French regulation for genetic studies. Molecular screening
13 of *RYR2* and *CASQ2* genes has been performed as described before (29). Screening of the two
14 junctin isoforms was performed by sequencing the 6 exons (NM_02164.4) corresponding to
15 the longest isoform. Molecular analysis of the *TRDN* gene was performed by sequencing all
16 the exons that encode the cardiac human isoform Trisk 32. Because of the large number of
17 triadin transcripts described in the cardiac tissue originating from different species (19, 30-31)
18 without the experimental evidences for the existence of the corresponding proteins, we first
19 characterized the human Trisk 32 sequence both at the cDNA and at the protein level using
20 human cardiac tissue (Supplementary Figure S4 and Supplementary methods). The presence
21 of the corresponding protein was confirmed using an antibody developed against the specific
22 C-terminal end of the identified sequence (Supplementary Figure S4c). The sequence of
23 human Trisk 32 identified in this study is accessible in GenBank database under accession
24 number JN900469. Primers sequences used for molecular investigation of the *TRDN* and
25 *ASPH* genes are listed in Supplementary Table 1. Family members were screened for the
26 mutation(s) identified in probands. A panel of 300 control chromosomes was screened for
27 each novel variant reported in this study.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

53 **Plasmids, viruses and antibodies**

54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Full length cDNA coding for rat Trisk 32 (accession number: EMBL AJ812276), with or
4 without c.176C>G mutation, corresponding to p.T59R change in the protein, was inserted into
5 pcDNA3.1 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) for cell transfection, or in pZac2.1 for AAV
6 development. The rat Trisk 32 nucleotide sequence used in this study has 84% identity with
7 the human sequence and 92% with the mouse sequence, and was chosen because of the
8 availability of efficient antibodies (29) developed in different species and necessary for the
9 double immunofluorescent labeling. All viruses were engineered and produced by the Penn
10 Vector Core (Philadelphia, USA). Two recombinant adeno-associated viruses of serotype 2/9,
11 encoding respectively the WT and the mutant T59R-Trisk32 were used in this study: AAV-
12 Trisk 32 and AAV-Trisk 32-T59R. All the transgenes were under the control of a CMV
13 promoter.

14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Rabbit anti-RyR antibodies have been described previously (30), as well as rabbit anti-peptide
antibodies against the N-terminal end of triadins (31), and anti-peptide antibodies against the
rat Trisk 32 C-terminal end (29), developed in rabbit or guinea pig. We also used anti-peptide
antibodies against the mouse Trisk 32 (9), and an anti-RyR developed in guinea pig by
immunization with the C-terminal peptide of RyR1, as described before (32). The rabbit
polyclonal antibody to calnexin (SPA-860) is from Stressgen (Victoria, Canada).

Cell culture, transfection and treatment

COS-7 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and 1%
penicillin/streptomycin (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Cells were transfected using
Exgen 500 (Euromedex, Mundolsheim, France) for 28 hours for immunofluorescent labeling
experiments and for 20 h for Western blot analysis after cycloheximide (CHX) or MG132
treatment.

1
2
3 For triadin stability experiment, transfected COS-7 cells were treated with 50 µg/ml of CHX
4 for 0-6 h, or with 50 µM MG132 for 6 h, or with 0.2% DMSO for 6 h (control). Cells were
5 then lysed with RIPA buffer (25 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium
6 deoxycholate, 0.1% SDS), centrifuged and proteins in the supernatant were precipitated by
7 chloroform/methanol for further analysis by quantitative Western blot.
8
9

10 11 12 13 14 15 16 **Immunofluorescent labeling on COS-7 cells and on cardiomyocytes**

17 Transfected COS-7 cells were fixed either 6 min in cold methanol at -20°C, or 10 min in 4%
18 paraformaldehyde (PFA). For detection of Trisk 32 at the cell surface, cells fixed with PFA
19 were incubated with a guinea pig antibody against the C-terminus of rat Trisk 32. After
20 permeabilization with 0.05% saponin, cells were incubated with a rabbit antibody against the
21 N-terminus of rat Trisk 32 and then with secondary antibodies against both species.
22
23

24 Primary cardiomyocytes were seeded 1h on laminin-coated glass coverslip, fixed 15 min in
25 4% PFA, permeabilized for 30 min in PBS- 0.5% Triton X100, then saturated 1h in PBS –
26 0.1% Triton X100- 0.5% BSA – 2% goat serum, and incubated with primary antibodies.
27

28 The cells were observed under a LEICA SPE confocal microscope.
29
30

31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 **Mice and *in vivo* transduction**

42 Triadin KO mice developed on C57B16 background were described previously (9). Two
43 months old triadin KO male mice (19-24g) were anesthetized with Xylazine (10µg/g) and
44 Ketamine (100µg/g), and injected with $2 \cdot 10^{11}$ viral genome copy diluted in 100µl of 150mM
45 NaCl, by a single injection in the tail vein.
46
47
48
49
50

51 52 53 54 **Cardiomyocytes preparation**

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

One month after virus injection the hearts of transduced KO mice, of non transduced KO mice or of WT littermate mice were collected and cardiac ventricular myocytes were enzymatically dissociated as previously reported (35). Briefly, mice were euthanized by cervical dislocation, the heart rapidly excised and retrogradely perfused at 37°C for 6-8 min with a modified tyrode solution (in mM: NaCl 113, KCl 4.7, KH₂PO₄ 0.6, Na₂HPO₄ 0.6, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 12, KHCO₃ 10, HEPES 10, Taurine 30, pH =7.4) containing 0.1 mg/ml liberase (Roche, France). Isolated cardiomyocytes were then transferred to the same solution, free of enzyme, containing 1mM CaCl₂.

RT-PCR

mRNA expression levels in transduced cardiomyocytes were determined by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Briefly, total RNA was extracted from isolated cardiomyocytes using TRIzol Reagent and PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). First strand cDNA was synthesized from 500ng of total RNA using specific primer mixes followed by cDNA amplification. Primer sequences were as follows: rat Trisk 32: forward, 5'-AGCCAAAGAAACTCCGAAAA-3'; reverse, 5'-TCCAGTGGC CGTATGTACTTC-3'; mouse GAPDH: forward, 5'-CGTGCCGCTGGAGAAAC-3'; reverse, 5'-TGGGAGTTGCTGTTGAAGTCG-3'. Equal amounts of cDNA were used in each reaction sample.

Western blot

Cardiomyocytes or transfected cells were homogenized by 15 s sonication at 0°C in presence of 1mM DFP and 200µM PMSF as proteases inhibitors. One hundred µg of cardiomyocyte homogenates were analyzed by quantitative Western blot analysis as described previously (9), with antibodies against rat Trisk 32 (20) or mouse Trisk 32 (9). Secondary antibodies used for

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

Western blot were labeled with HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Immunotech S.A.S., Marseille, France). The quantification was performed with a Chemidoc and the Quantity One software (BioRad, Marnes la Coquette, France).

Statistics

Statistics were performed using either Fisher's test (Fig.2a and 3a) or Mann and Whitney's test (Fig.3b) on Prism 4.0 software (GraphPad, San Diego, USA).

For Peer Review

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

Acknowledgments: We thank all family members for their contribution to this study. We thank Mrs F. Berthoin, D. Martinez and Mr J. Trapani for their technical assistance. We thank Dr Jacques Brocard for his help in the statistical analysis of the data, the Penn Vector Core (Philadelphia, USA) for viruses production, and the Myocastor study group (MSG) for fruitful discussions. This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Association Française contre les Myopathies (AFM), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Fondation Daniel Ducoin, the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC), the Direction de la Recherche Clinique du CHU Grenoble, and the Société Française de Myologie (SFM).

Conflict of interest: None

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

References

1. Hayashi, M., Denjoy, I., Extramiana, F., Maltret, A., Buisson, N.R., Lupoglazoff, J.M., Klug, D., Hayashi, M., Takatsuki, S., Villain, E., *et al.* (2009) Incidence and risk factors of arrhythmic events in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation*, **119**, 2426-2434
2. Priori, S.G., Chen, S.R. (2011) Inherited dysfunction of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ handling and arrhythmogenesis. *Circ. Res.*, **108**, 871-883.
3. Guo, W., Campbell, K.P. (1995) Association of triadin with the ryanodine receptor and calsequestrin in the lumen of the sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, **270**, 9027-9030
4. Zhang, L., Kelley, J., Schmeisser, G., Kobayashi, Y.M., Jones, L.R. (1997) Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.*, **272**, 23389-23397
5. Thevenon, D., Smida-Rezgui, S., Chevessier, F., Groh, S., Henry-Berger, J., Romero, N.B., Villaz, M., De Waard, M., and Marty, I. (2003) Human skeletal muscle triadin: gene organization and cloning of the major isoform, Trisk 51. *Biochem. Biophys. Research Com.*, **303**, 669-675

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

6. Marty, I., Fauré, J., Fourest-Lieuvin, A., Vassilopoulos, S., Oddoux, S., Brocard, J. (2009) Triadin: What possible function 20 years later? *J. Physiol.*, **587**, 3117-3121
7. Shen, X., Franzini-Armstrong, C., Lopez, J.R., Jones, L.R., Kobayashi, Y.M., Wang, Y., Kerrick, W.G., Caswell, A.H., Potter, J.D., Miller, T., *et al.* (2007) Triadins modulate intracellular Ca²⁺ homeostasis but are not essential for excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, **282**, 37864-37874
8. Chopra, N., Yang, T., Asghari, P., Moore, E.D., Huke, S., Akin, B., Cattolica, R.A., Perez, C.F., Hlaing, T., Knollmann-Ritschel, B.E., *et al.* (2009) Ablation of triadin causes loss of cardiac Ca²⁺ release units, impaired excitation-contraction coupling, and cardiac arrhythmias. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 7636-7641
9. Oddoux, S., Brocard, J., Schweitzer, A., Szentesi, P., Giannesini, B., Brocard, J., Fauré, J., Pernet-Gallay, K., Bendahan, D., Lunardi, J., *et al.* (2009) Triadin deletion induces impaired skeletal muscle function. *J. Biol. Chem.*, **284**, 34918-34929
10. Jones, L.R., Zhang, L., Sanborn, K., Jorgensen, A.O., Kelley, J. (1995) Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26-kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum *J. Biol. Chem.*, **270**, 30787-30796
11. Dinchuk, J.E., Henderson, N.L., Burn, T.C., Huber, R., Ho, S.P., Link, J., O'Neil, K.T., Focht, R.J., Scully, M.S., Hollis, J.M., *et al.* (2000) Aspartyl beta-hydroxylase (Asph) and

- 1
2
3 an evolutionarily conserved isoform of Asph missing the catalytic domain share exons with
4
5 junctin. *J. Biol. Chem.*, **275**, 39543-39554
6
7
8
9
10 12. Lim, K.Y., Hong, C.S., Kim, D.H. (2000) cDNA cloning and characterization of human
11
12 cardiac junctin. *Gene*, **255**, 35-42
13
14
15
16 13. Yuan, Q., Fan, G.C., Dong, M., Altschaf, B., Diwan, A., Ren, X., Hahn, H.H., Zhao, W.,
17
18 Waggoner, J.R., Jones, L.R., *et al.* (2007) Sarcoplasmic reticulum calcium overloading in
19
20 junctin deficiency enhances cardiac contractility but increases ventricular automaticity.
21
22 *Circulation*, **115**, 300-309
23
24
25
26
27 14. den Dunnen, J.T., Antonarakis, S.E. (2000) Mutation Nomenclature Extensions and
28
29 Suggestions to Describe Complex Mutations: A Discussion. *Hum. Mutat.*, **15**, 7-12
30
31
32
33
34 15. Realini, C., Rogers, S.W. and Rechsteiner, M. (1994) KEKE motifs. Proposed roles in
35
36 protein-protein association and presentation of peptides by MHC class I receptors. *FEBS*
37
38 *Lett.*, **348**, 109-113
39
40
41
42
43 16. Kobayashi, Y.M., Alseikhan, B.A. and Jones, L.R. (2000) Localization and
44
45 characterization of the calsequestrin-binding domain of triadin 1. Evidence for a charged
46
47 beta-strand in mediating the protein-protein interaction. *J. Biol. Chem.*, **275**, 17639-17646
48
49
50
51 17. Lee, J.M., Rho, S.H., Shin, D.W., Cho, C., Park, W.J., Eom, S.H., Ma, J., Kim, D.H.
52
53 (2004) Negatively charged amino acids within the intraluminal loop of ryanodine receptor
54
55 are involved in the interaction with triadin. *J. Biol. Chem.*, **279**, 6994-7000
56
57
58
59
60

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

18. Bhuvanagiri, M., Schlitter, A.M., Hentze, M.W. and Kulozik, A.E. (2010) NMD: RNA biology meets human genetic medicine. *Biochem. J.*, **430**, 365-377
19. Kobayashi, Y.M., Jones, L.R. (1999) Identification of triadin 1 as the predominant triadin isoform expressed in mammalian myocardium. *J. Biol. Chem.*, **274**, 28660-28668
20. Vassilopoulos, S., Thevenon, D., Smida Rezgui, S., Urbani-Brocard, J., Chapel, A., Lacampagne, A., Lunardi, J., DeWaard, M., and Marty, I. (2005) Triadins are not triad specific proteins: two new skeletal muscle triadins possibly involved in the architecture of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, **280**, 28601-28609
21. Pacak, C.A., Mah, C.S., Thattaliyath, B.D., Conlon, T.J., Lewis, M.A., Cloutier, D.E., Zolotukhin, I., Tarantal, A.F., Byrne, B.J. (2006) Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo. *Circ. Res.*, **99**, e3-9
22. Inagaki, K., Fuess, S., Storm, T.A., Gibson, G.A., Mctiernan, C.F., Kay, M.A., Nakai, H. (2006) Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol. Ther.*, **14**, 45-53
23. Bartoli, M., Gicquel, E., Barrault, L., Soheili, T., Malissen, M., Malissen, B., Vincent-Lacaze, N., Perez, N., Udd, B., Danos, O., Richard, I. (2008) Mannosidase I inhibition rescues the human alpha-sarcoglycan R77C recurrent mutation. *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 1214-1221

- 1
2
3 24. Soheili, T., Gicquel, E., Poupiot, J., N'Guyen, L., Le Roy, F., Bartoli, M., Richard, I.
4
5 (2012) Rescue of sarcoglycan mutations by inhibition of endoplasmic reticulum quality
6
7 control is associated with minimal structural modifications. *Hum. Mutat.*, **33**, 429-439
8
9
10
11
12 25. Liu, N., Rizzi, N., Boveri, L., Priori, S.G. (2009) Ryanodine receptor and calsequestrin in
13
14 arrhythmogenesis: what we have learnt from genetic diseases and transgenic mice. *J. Mol.*
15
16 *Cell. Cardiol.*, **46**, 149-159
17
18
19
20
21 26. Wehrens, X.H., Lehnart, S.E., Huang, F., Vest, J.A., Reiken, S.R., Mohler, P.J., Sun, J.,
22
23 Guatimosim, S., Song, L.S., Rosembly, N. *et al.* (2003) FKBP12.6 deficiency and
24
25 defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced
26
27 sudden cardiac death. *Cell*, **113**, 829-840
28
29
30
31
32 27. Eltit, J.M., Feng, W., Lopez, J.R., Padilla, I.T., Pessah, I.N., Molinski, T.F., Fruen, B.R.,
33
34 Allen, P.D., Perez, C.F. (2010) Ablation of skeletal muscle triadin impairs FKBP12/RyR1
35
36 channel interactions: essential for maintaining resting cytoplasmic Ca²⁺. *J. Biol. Chem.*,
37
38 **285**, 38453-38462
39
40
41
42
43 28. MacLennan, D.H., Zvaritch, E. (2011) Mechanistic models for muscle diseases and
44
45 disorders originating in the sarcoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta*, **1813**, 948-964
46
47
48
49
50 29. Roux-Buisson, N., Rendu, J., Denjoy, I., Guicheney, P., Goldenberg, A., David, N.,
51
52 Faivre, L., Barthez, O., Danielli, G.A., Marty, I. *et al.* (2011) Functional Analysis Reveals
53
54 Splicing Mutations of the CASQ2 Gene in Patients with CPVT: Implication for Genetic
55
56 Counselling and Clinical Management. *Hum. Mutat.*, **32**, 995-999
57
58
59
60

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

30. Guo, W., Jorgensen, A.O., Jones, L.R., Campbell, K.P. (1996) Biochemical characterization and molecular cloning of cardiac triadin. *J. Biol. Chem.*, **271**, 458-465
31. Hong, C.S., Ji, J.H., Kim, J.P., Jung, D.H., Kim, D.H. (2001) Molecular cloning and characterization of mouse cardiac triadin isoforms. *Gene*, **278**, 193-199
32. Marty, I., Robert, M., Villaz, M., Lai, Y., De Jongh, K.S., Catterall, W.A., and Ronjat M. (1994) Biochemical Evidence for a complex involving Dihydropyridine Receptor and Ryanodine Receptor in Triad Junctions of Skeletal Muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 2270-2274
33. Marty, I., Robert, M., Ronjat, M., Bally, I., Arlaud, G., and Villaz, M. (1995) Localization of the N-terminal and C-terminal ends of triadin with respect to the sarcoplasmic reticulum membrane of rabbit skeletal muscle. *Biochem. J.*, **307**, 769-774
34. Marty, I., Villaz, M., Arlaud, G., Bally, I., and Ronjat, M. (1994) Transmembrane Orientation of the N-terminal and C-terminal Ends of the Ryanodine Receptor in the Sarcoplasmic Reticulum of Rabbit Skeletal Muscle. *Biochem. J.*, **298**, 743-749
35. Fauconnier, J., Thireau, J., Reiken, S., Cassan, C., Richard, S., Matecki, S., Marks, A.R., and Lacampagne, A. (2010) Leaky RyR2 trigger ventricular arrhythmias in Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 1559-1564

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

Legends to Figures:

Figure 1: Triadin mutations in two CPVT families

(a) Pedigrees of the two CPVT families. Filled squares indicated affected individuals and half filled symbols individuals heterozygous for a mutation. The proband in each Family is indicated by the black arrow. The genotype for each individual concerning the identified mutation is indicated as follow: "+" in the presence of the mutation and "-" in the absence of the mutation. (b) Membrane topology of cardiac isoform of triadin, Trisk 32, in the sarcoplasmic reticulum membrane with the localization of the 3 identified mutations. The "KEKE" region is the interaction domain with RyR2 and CSQ2. Trisk 32 has a C-terminal specific region from amino-acid 264 to 286.

Figure 2: Trisk 32 and Trisk 32 - T59R cell localizations are different

(a) Trisk 32-T59R is located only at the endoplasmic reticulum, whereas Trisk 32 is mainly at the plasma membrane. Wild type Trisk 32 (T32) and mutant Trisk 32-T59R (T32-T59R) were transfected in COS-7 cells, and their localization analyzed by immunofluorescent labeling. Typical Trisk 32 labeling at the plasma membrane (PM) or in the endoplasmic reticulum (ER) are shown. Bar: 20 μ m. The histogram shows the percentage of transfected cells exhibiting PM (■) or ER (□) labeling, for a total of 500 transfected cells from 3 different experiments. *** $p < 0.001$, Fisher's test comparison of T32- vs. T32-T59R- transfected cells. (b) Immunofluorescent labeling on intact or permeabilized cells shows intracellular retention of Trisk 32-T59R. Transfected cells were fixed without permeabilization and stained with an antibody directed against the C-terminal end of Trisk 32, which is extracellular when the protein is in the plasma membrane (left panels, "intact"). Afterwards, cells were permeabilized and stained with an antibody directed against the N-terminal end of Trisk 32;

1
2
3 which is cytosolic when the protein is in the plasma membrane or in the reticulum membrane
4
5 (right panels, "permeabilized"). Bar: 20 μ m.
6
7
8

9
10 **Figure 3: The mutant protein Trisk 32-T59R is degraded faster, via the proteasome**

11 (a) Trisk 32-T59R is degraded faster in the course of protein synthesis inhibition. Wild type
12 Trisk 32 (T32) and mutant Trisk 32-T59R (T32-T59R) were first transfected in COS-7 cells.
13 Transfected cells were then incubated with cycloheximide (CHX) to block protein synthesis
14 for the indicated time. Cells were collected and analyzed by quantitative Western blot with
15 specific antibodies to evaluate the amount of protein. The curves show the quantification from
16 4 experiments of the amount of each protein (T32 -●- and T32-T59R -□-) compared to its
17 initial amount. *** $p < 0.001$, F-test comparison of the two curves, based on decay and plateau
18 parameters. (b) Inhibition of the proteasome raises the amount of the mutant protein Trisk 32-
19 T59R. Twenty hours after transfection, the cells were incubated during 6 h with either DMSO
20 alone for controls (lanes "-") or 50 μ M MG132 to block proteasome (lanes "+"). The cells
21 were then collected and analyzed by quantitative Western blot with specific antibodies. The
22 top panel shows a typical Western blot, the bottom histogram (■ DMSO; □ MG132) is a
23 quantification (mean \pm SEM) from 3 experiments. * $p < 0.05$, Mann and Whitney test
24 comparison of DMSO- vs. MG132- treated cells.
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 **Figure 4: Stability analyses of transcripts and proteins after in vivo expression in triadin**
46 **KO mice**

47 (a) The mutant transcript is present at similar levels as the wild-type one. Messenger RNAs
48 were purified from isolated cardiomyocytes of transduced mice. After reverse transcription,
49 the cDNAs were either directly used or diluted 10 or 100 times before the PCR amplification
50 of Trisk 32 (T32) and GAPDH. PCR products for Trisk 32 and GAPDH amplification were
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 expected respectively at 250 bp and 136 bp. The PCR primers for GAPDH were designed to
4
5 co-amplify possible contaminating genomic DNA as a 220 bp fragment, which was not
6
7 observed. (b) The mutant protein Trisk 32-T59R was not detectable. Western blot analysis of
8
9 100 µg of cardiomyocytes homogenates from control WT mouse, with mouse-specific anti-
10
11 Trisk 32 antibody (first lane), or 100µg of cardiomyocytes from a Trisk 32- transduced mouse
12
13 (second lane), or Trisk 32-T59R-transduced mouse (third lane) with rat-specific anti-Trisk 32
14
15 antibody. Trisk 32 appears as multiple bands (2/3) centered on 37kDa, the higher bands, the
16
17 glycosylated forms of Trisk 32, being in lower amount and visible in correlation with the
18
19 intensity of the signal, as described before (6, 20).
20
21
22
23
24

25 **Figure 5: Immunofluorescent analysis of Trisk 32 in isolated cardiomyocytes.**

26
27 Cardiomyocytes were isolated from a wild type mouse (WT), a triadin KO mouse (KO), a
28
29 triadin KO mouse transduced with rat Trisk 32 (KO + T32) and a triadin KO mouse
30
31 transduced with rat Trisk 32-T59R (KO + T32-T59R). They were labeled with antibodies
32
33 against mouse Trisk 32 and RyR (panels a-f) or against rat Trisk 32 and RyR (panels g-l). In
34
35 all cardiomyocytes, RyR labeling is typical of a dyad labeling showing aligned rows of dots,
36
37 as observed in the inserts. Bar: 2µm
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

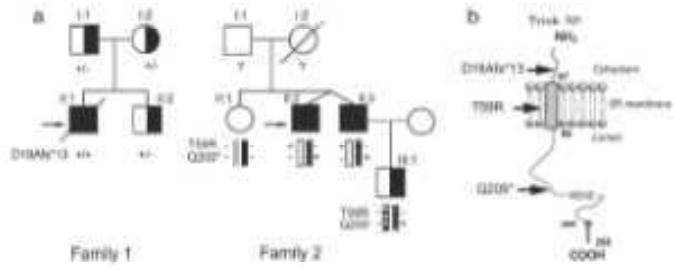
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abbreviations:

CHX, cycloheximide; CPVT, Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia; CRC, calcium release complex; CSQ, calsequestrin; ER, endoplasmic reticulum; KO, knock out; PFA, paraformaldehyde; PM, plasma membrane; PTC, premature termination codon; RyR, ryanodine receptor; SR, sarcoplasmic reticulum; WT, wild type.

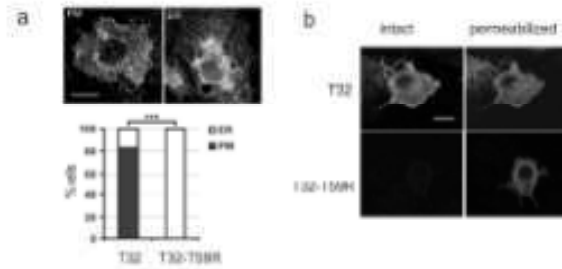
For Peer Review

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



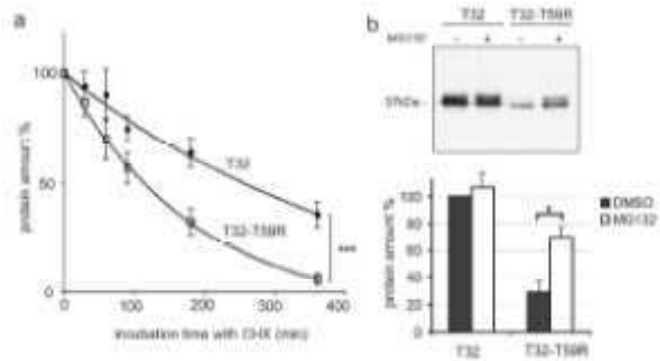
Triadin mutations in two CPVT families
297x420mm (300 x 300 DPI)

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



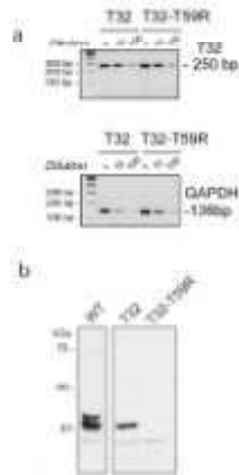
Trisk 32 and Trisk 32 - T59R cell localizations are different
297x420mm (300 x 300 DPI)

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



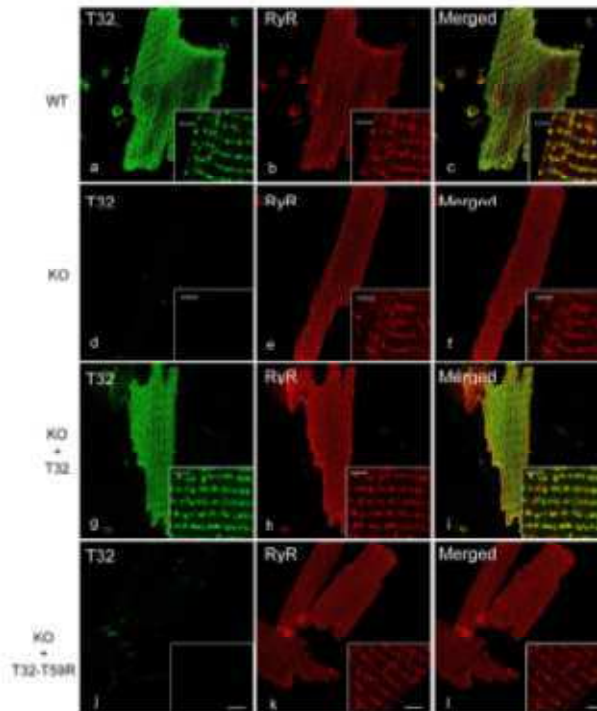
The mutant protein Trisk 32 -- T59R is degraded faster, via the proteasome
297x420mm (300 x 300 DPI)

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



Stability analyses of the transcripts and proteins after in vivo expression in triadin KO mice
297x420mm (300 x 300 DPI)

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



Immunofluorescent analysis of Trisk 32 in isolated cardiomyocytes
297x420mm (300 x 300 DPI)

Supplementary material

Supplementary methods: Identification of human Trisk 32

We have previously cloned all the triadin isoforms expressed in rat (20, 36). Using sequence homology between rat and human, we previously cloned the human skeletal muscle triadin isoform Trisk 51 (5). As the human cardiac isoform Trisk 32 sequence has not been identified, we used a similar strategy to clone the human Trisk 32. We used the specific sequence of rat Trisk 32 to search for homologies in the human *TRDN* gene. We identified a human sequence in the triadin gene with significant homologies to the specific sequence of rat Trisk 32. This sequence was localized immediately at the end of exon 8 (Figure S4, panel a). This new exon specific of Trisk 32 was named exon 8bis. To further demonstrate the presence of the Trisk 32 mRNA in human cardiac tissue, we amplified the full length coding sequence by RT-PCR using a reverse primer in the genomic sequence described above in combination with a forward primer in the 1st exon of the triadin gene. Control human cardiac sample was obtained from the tissue bank "Myobank-AFM" (Institut de Myologie, Paris). Total RNA was extracted using Trizol (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and cDNA was synthesized from 500ng of RNA with an oligo-dT, and amplified with the triadin specific primers. The amplified transcript product with an expected size of 1230bp was then bidirectionally sequenced using the primers used for PCR amplification. The corresponding protein contained 286 amino acids. This 286 amino-acids protein sequence was different in its specific C-terminal part from the putative 297 amino-acids long isoform described in nucleotide databases (ENSG00000186439), but presented a high homology with rat, rabbit and dog protein sequences. The alignment of the C-terminal specific sequence of Trisk 32/CT1 in different species is presented in supplemental Figure I, panel b. To confirm the

presence of the corresponding human protein, antibodies were raised against the C-terminal specific end of human Trisk 32, as described before (36). These antibodies were assayed in Western blot on control human cardiac muscle, and the signal was compared to the one obtained with an antibody against the N-terminal end of triadin (33) which reacts with all the triadin isoforms identified up to now (Figure S4, panel c). The antibody against the N-terminal end of triadin recognized a double band centered on 37kDa, corresponding most probably to Trisk 32 and its glycosylated form, as observed previously in dog and rabbit cardiac muscle (19, 30). In agreement with canine heart's studies showing the presence of only one cardiac protein isoform (19), there was thus no evidence for the presence of additional triadin isoforms at different molecular mass in human heart. The antibody against the specific C-terminal end also recognized two bands at the very same 37kDa size, that most likely correspond to Trisk 32 and its glycosylated form, as observed with the anti-N-terminal antibodies. Therefore, the sequence that we have identified is translated into a protein which is most probably the major if not the only cardiac triadin in human heart.

36. Marty I, Thevenon D, Scotto C, Groh S, Sainnier S et al. (2000) Cloning and characterization of a new isoform of skeletal muscle triadin. *J Biol Chem* 275: 8206-8212

Supplementary Table I : Primers for PCR amplification

The primers used for the amplification of triadin's and junctin's exons, and intron-exon boundaries are listed in the following table. The size of the amplified fragment is indicated.

The primers used to identify Trisk 32 by amplification of the full length cDNA are named T32 FL.

(a) Triadin's primers

Exon	Primers (5'-3') Forward	Primers (5'-3') Reverse	Size (bp)
1	AGAGGCAAAGTTCAACAGGACAAC	GCTCCTAAATCCACTTCTCAGATCC	347
2	CAGGTTTCAGCACTCATATAGTCAGTGTT	CTTGACCCAAGTGCTCATTGAAT	398
3-4	CGCAAAAAATTGTAGCCAGGAGA	TTTGAACCATGCTGAAAACCAA	1493
5	TGACAACATAGCTCTGTCTATTAATG	ACACAAAAATGTATATCTAAATGAAGAAT	375
6	TGCCGTGCAAACATCTCCTC	TGCGTGGTCATCTAAAATCTGAATG	224
7	GCTTGCTAAGTCTTAATGCCTAGA	CAAATATCCAACCTATCTGTTACCCA	358
8-8b	TTTCTTCCCTCTTTCTTTTCCA	GATTCGGATGCTACCTCCA	547
T32 FL	TGCAGAGGAGAGGCAAAGTT	GATTCGGATGCTACCTCCA	1230

(b) Junctin's primers

Exon	Primers (5'-3') Forward	Primers (5'-3') Reverse	Size (bp)
2	AGTTTGTAGTCAGGTCCAATTTTCAG	AGTCAGTATCTCCAGGAGTTCAAAA	348
3	AGGAGTTTATTTCCCTGCACTACTTC	CTATTGAGAACCACTGAAAGGCTAT	500
4	TCTGAGTAGATCTATGCTTTGACTG	CCATAATGGGAAATTGGTCCTA	298
5	AACTGCTTTGCAGGATTAAGAG	CTACCGTTAAAATATGCATGGGAC	684
6	GTGAAGTTGGTTAAATCATAGGCTG	AAGCAAGACCCAAAAGCAATAG	398
7	TGCACCTATTTTAGCCACCA	TGTTTTTACATTTAGAAGTATGAGACG	717

Legends supplementary figures

Figure S1: Electrocardiogram of the probands

- (a) Typical resting electrocardiogram of Ind II:1 of Family 1, recorded at hospital after cardiac arrest showed frequent runs of bidirectional or polymorphic ventricular tachycardia.
- (b) Electrocardiogram of Ind II:2 of Family 2, recorded during exercise test. Numerous bidirectional extra beats can be observed.

Figure S2: Intracellular retention of the mutant protein Trisk 32-T59R

- (a) Trisk 32 T59R is retained in endoplasmic reticulum. The intracellular compartment in which Trisk32-T59R is retained is identified as endoplasmic reticulum by double immunofluorescent labeling with antibodies against Trisk 32 (green) and against calnexin (red). Bar 20 μ m
- (b) Trisk 32 is accessible to cell surface biotinylation, while the mutant Trisk 32-T59R is not. Twenty-hour post-transfection, COS-7 cells were washed with PBS and cell surface proteins were biotinylated using Sulfo-NHS-SS-Biotin reagent (Thermo Scientific) according to manufacturer's protocol. After biotinylation, cells were lysed with RIPA buffer and lysates were incubated with streptavidin-agarose beads (Pierce) to bind biotinylated- plasma membrane proteins. Plasma membrane (PM) fraction was then separated from intra-cellular (IC) fraction before SDS-PAGE and Western blotting. The shift in the molecular weight observed for Trisk 32 in the PM fraction was predictable and was due to *N*-hydroxysulfosuccinimide (NHS) ester groups still bound to the ϵ -amines of lysine residues of Trisk 32 after SDS-PAGE.

Figure S3: Western blot analysis of all transduced mice

Trisk 32 was detected in all the Trisk 32-transduced mice, but never in Trisk 32-T59R-transduced mice. Cardiomyocyte homogenates were prepared from seven Trisk 32-transduced mice (lanes 1-7) and six Trisk 32-T59R-transduced mice (lanes 8-13), and analyzed by Western blot with the antibody against rat-Trisk 32.

Figure S4 : Human cardiac triadin isoform Trisk 32

(a) Schematic representation of splicing events in human triadin isoforms. Exclusion of exon 8bis during the splicing leads to the formation of the longer skeletal muscle (SK) specific isoforms, Trisk 51 and Trisk 95. When exon 8bis is included, as it contains a TGA stop codon and an AATAAA polyadenylation signal, a shorter protein of 286 amino acids is produced. This protein has a specific C-terminal end, encoded by exon 8bis.

(b) Alignments of the specific C-terminal ends of Trisk 32 (also called cardiac triadin 1: CT1) identified in different species. The peptide corresponding to the last 12 amino-acids of human Trisk 32 (underlined in the human sequence) with an additional Tyrosine at its N-terminal end was used to produce the anti-Trisk 32 C-terminal antibodies, as described before (34).

(c) Western blot analysis of human Trisk 32. Thirty μ g of human normal cardiac muscle homogenate were loaded in each lane of a 5-15% acrylamide gel, and assayed in Western Blot with antibodies directed against the N-terminal end of triadin, common to all isoforms or with the anti-human Trisk 32 antibody specific of the C-terminal sequence described above. Both antibodies recognized a double band centered on 37kDa.

Figure S1.

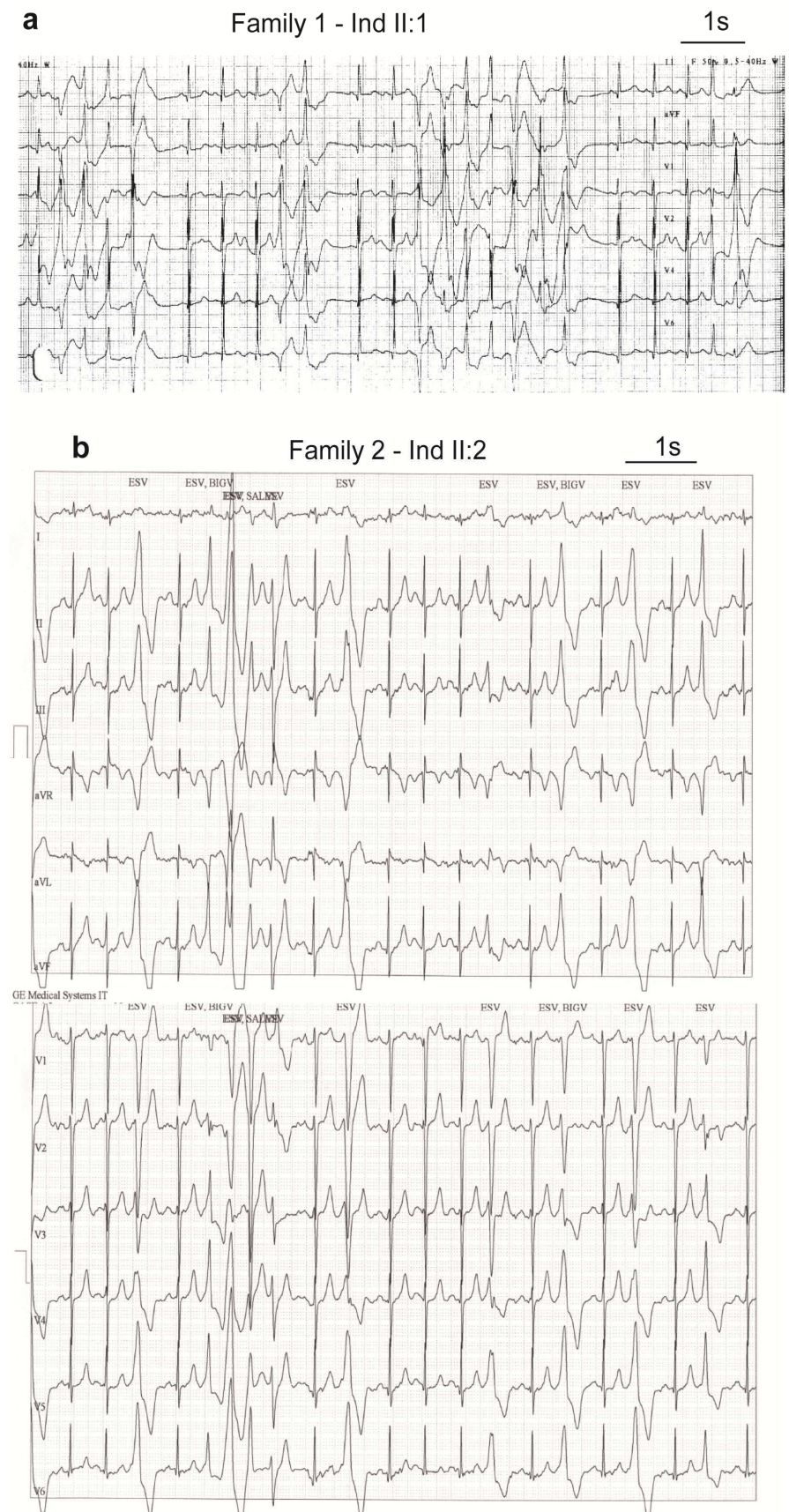
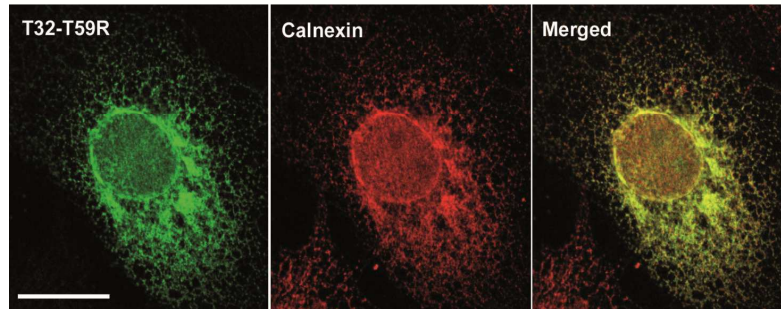


Figure S2.

a



b

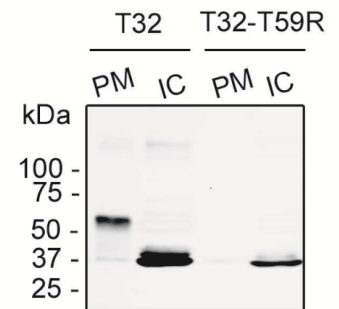


Figure S3.

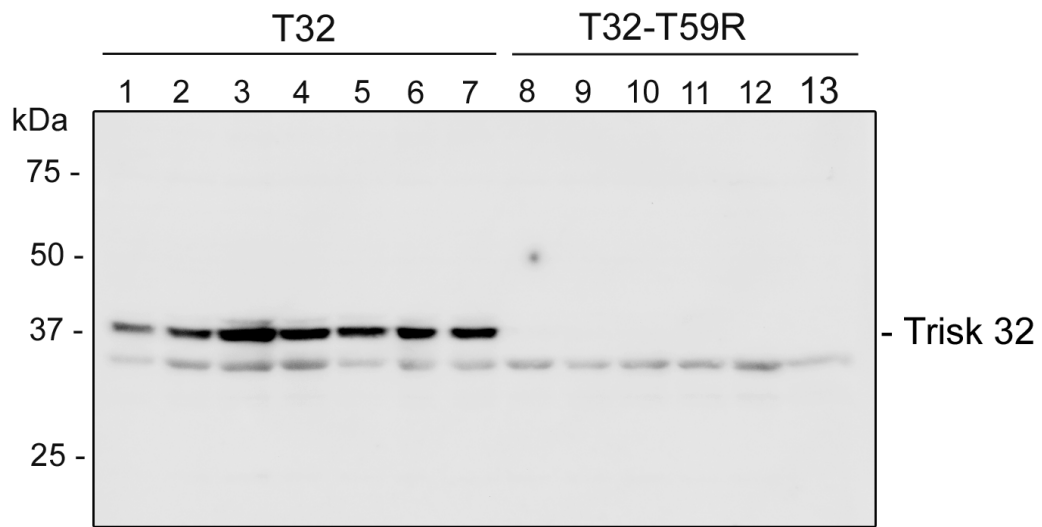
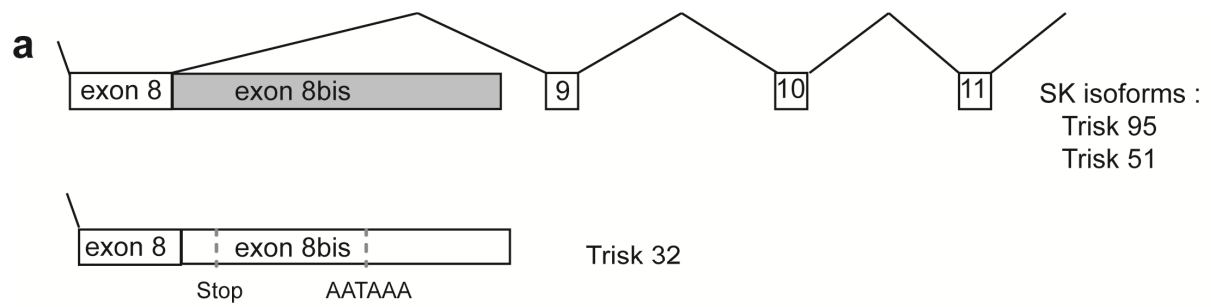
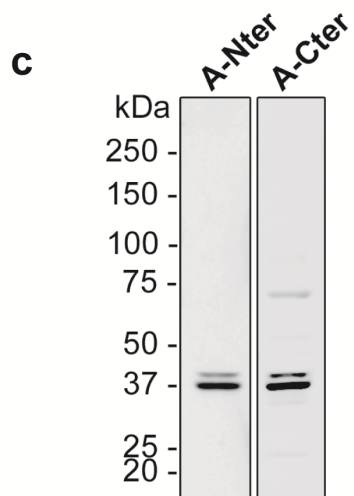


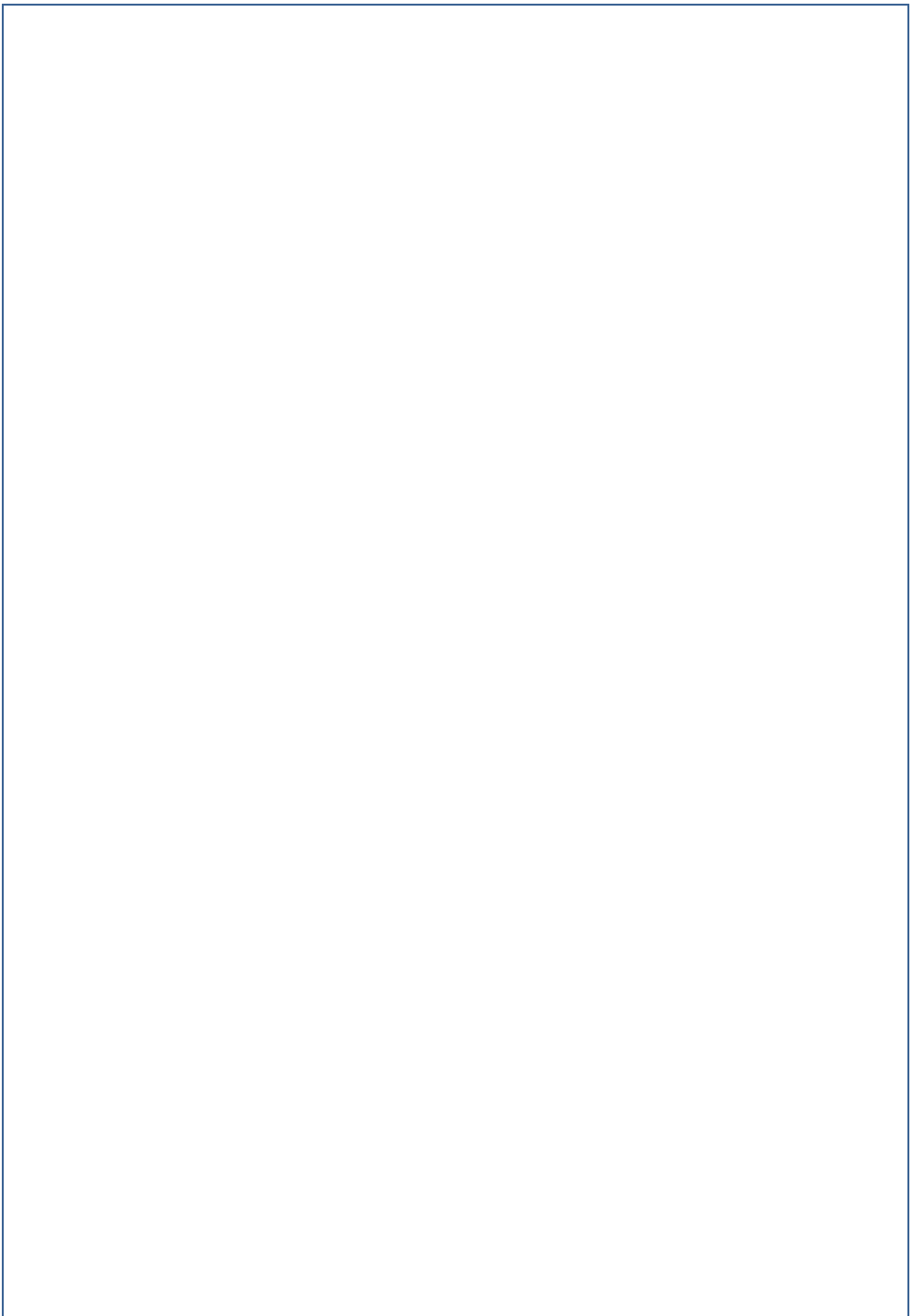
Figure S4.



b Specific C-terminal extremities of Trisk 32 / CT1 in different species

dog	GKHSEE---VAGGSKRTLGGKKQIQ
rabbit	GKQSEE---AAGCFKRTLGGKKQMQ
rat	GKLSKEEKEAVGGPKRILDKKQI-
human	GKHSEQE--AAGGSKRILGGKHM <u>Q</u>
mouse	GKHSRR-----RRQEVQRE---





Résumé

La Tachycardie Ventriculaire Polymorphe Catécholaminergique (TVPC) est une pathologie rythmique héréditaire rare et sévère, responsable de mort subite chez le sujet jeune. Les mutations des gènes *RYR2* et *CASQ2* sont associées respectivement à une transmission autosomique dominante et récessive de la maladie. Le canal calcique RyR2 et la protéine chélatrice du calcium Casq2 sont situés dans le réticulum sarcoplasmique (RS) où ils participent au complexe de relâchement calcique (CRC), essentiel à l'homéostasie calcique cardiaque. L'analyse de *RYR2* et *CASQ2* chez 214 probands ayant présenté une TVPC nous a permis d'identifier respectivement des mutations chez 75 et 11 probands. Deux cas de mosaïques germinales et somatiques ont été identifiés dans le gène *RYR2*. Deux mutations d'épissage du gène *CASQ2* ont été validées à l'aide de minigènes. Chez 97 patients négatifs pour *RYR2* et *CASQ2*, nous avons décidé de rechercher des mutations de trois protéines du CRC (la triadine, la junctine et FKBP12.6) en séquençant les gènes correspondants. Nous n'avons retrouvé aucune mutation de la junctine, ni de FKBP12.6. En revanche, nous avons identifié trois mutations de la triadine: une micro-délétion et une mutation non-sens entraînant un codon stop prématuré, ainsi qu'une variation faux-sens, dont la caractérisation à l'aide de modèle animal et cellulaire a montré qu'elle entraînait une dégradation massive de la protéine. Les mutations du gène *TRDN* seraient associées à une absence de triadine entraînant une dysfonction du CRC, à l'origine des arythmies observées. En conclusion, nos résultats confirment que *RYR2* est le gène majeur impliqué dans la TVPC, *CASQ2* étant rarement impliqué; et nous rapportons, pour la première fois, des mutations du gène *TRDN* en pathologie humaine, associée à une forme autosomique rare de TVPC.

Abstract

Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT) is a rare and severe inherited arrhythmogenic disorder, responsible for sudden death in young patients. It is a genetically heterogenous pathology with an autosomal dominant form associated with mutations of the *RYR2* gene, and a recessive form associated with mutations of the *CASQ2* gene. The ryanodine receptor RyR2 is a Ca²⁺ channel, and the calsequestrin Casq2 is the major calcium storage protein, located in the sarcoplasmic reticulum of the cardiomyocytes. They belong to the calcium release complex (CRC) that plays a central role in excitation-contraction coupling. In this work, we report the identification of *RYR2* and *CASQ2* mutations in 75 and 11 CPVT probands, respectively. We identified two cases of germline and somatic mosaicism in *RYR2*. Two splicing mutations of *CASQ2* have been validated using a splicing minigene assay. We searched for mutations among 97 CPVT probands, negative for *RYR2* and *CASQ2*, in three candidate genes: *TRDN*, *ASPH* and *FKBP1B*, encoding three proteins of the CRC. We did not identify any mutation of *ASPH* and *FKBP1B* genes. However, we found three mutations in the *TRDN* gene, encoding the cardiac triadin: a microdeletion, a nonsense mutation, both leading to a premature stop codon, and a missense mutation. We demonstrated that the missense mutation induces a drastic reduction of the protein in cellular and animal models. All the three mutations would thus be associated with the absence of triadin, leading to dysfunction of the CRC, and arrhythmias. In conclusion, our results confirm that *RYR2* is the major gene implicated in CPVT, and *CASQ2* rarely implicated. Moreover, we report mutations of the *TRDN* gene for the first time in pathology, as a third gene associated with a rare autosomal recessive form of CPVT.