



HAL
open science

Étude des voies de conduction cardiaque : identification des gènes spécifiquement exprimés et impliqués dans des troubles de conduction

Loubna El Zein

► To cite this version:

Loubna El Zein. Étude des voies de conduction cardiaque : identification des gènes spécifiquement exprimés et impliqués dans des troubles de conduction. Biochimie [q-bio.BM]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2003. Français. NNT : 2003LYO10118 . tel-00521428

HAL Id: tel-00521428

<https://theses.hal.science/tel-00521428>

Submitted on 27 Sep 2010

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.

THESE

présentée

devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention

du **DIPLOME DE DOCTORAT**

(arrêté du 25 avril 2002)

présentée et soutenue publiquement le

16 septembre 2003

par

Loubna EL ZEIN

**ETUDE DES VOIES DE CONDUCTION CARDIAQUE : Identification
des gènes spécifiquement exprimés et impliqués dans des troubles de
conduction**

Directeur de thèse :
Patrice BOUVAGNET

JURY :

Mr. Philippe CHEVALIER
Mr. Gérard LEFRANC
Mr. André MEGARBANE
Mr. Marc BILLAUD
Mr. Patrice BOUVAGNET

PU-PH (UCBLI, Lyon)
Professeur (Montpellier)
Professeur Associé (Beyrouth, Liban)
Professeur (UCBL1, Lyon)
MCU-PH (UCBL1, Lyon)

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université	M. le Professeur D. DEBOUZIE
Vice-Président du Conseil Scientifique	M. le Professeur J.F. MORNEX
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. le Professeur R. GARRONE
Vice-Présidente du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	Mme J. GALLEZOT Maître de Conférences
Secrétaire Général	M. J.P. BONHOTAL

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec	Directeur : M. le Professeur D. VITAL-DURAND
UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche	Directeur : M. le Professeur X. MARTIN
UFR de Médecine Lyon-Nord	Directeur : M. le Professeur F. MAUGUIERE
UFR de Médecine Lyon-Sud	Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY
UFR d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur J.DOURY
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : M. le Professeur F. LOCHER
Institut Techniques de Réadaptation	Directeur : Mme le Professeur D. BOISSON
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur J.F. MORNEX
Département de Formation à la Recherche et à l'Evaluation Pédagogiques	Directeur : M. le Professeur M. LAVILLE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique	Directeur : M. le Professeur J.L. VIALLE
UFR de Biologie	Directeur : M. le Professeur G. BOSQUET
UFR de Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
UFR de Génie Electrique et des Procédés	Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET
UFR Sciences de la Terre	Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE
UFR de Mathématiques	Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE
UFR d'Informatique	Directeur : M. le Professeur M. EGEE
UFR de Chimie Biochimie	Directeur : M. le Professeur J.P. SCHARFF
UFR STAPS	Directeur : M. P. THIRIET Maître de Conférences
Observatoire de Lyon	Directeur : M. le Professeur R. BACON
Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon	Directeur : M. le Professeur J.P. PUAUX
Département de 1 ^{er} cycle Sciences	Directeur : M. J.C. DUPLAN Maître de Conférences
IUT A	Directeur : M. le Professeur M. ODIN
IUT B	Directeur : M. le Professeur G. MAREST
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. le Professeur D. SERANT

Remerciements

Je veux tout d'abord exprimer ma profonde gratitude à Messieurs les Professeurs **Antoon VANDERBERGH** et **Marc BILLAUD** pour m'avoir accueillie dans leurs laboratoires.

J'adresse aussi mes sincères remerciements à Monsieur le professeur **Patrice BOUVAGNET** pour la direction de cette thèse et la confiance qu'il m'a accordée tout au long de ces travaux. Son enthousiasme, ses encouragements, ses conseils et ses apports scientifiques m'ont été précieux au cours de ces quatre années. Je n'oublie pas non plus sa grande disponibilité et ici, plus particulièrement, je pense à nos visites, à matines, aux abattoirs de Lyon pour y extraire la matière première indispensable à mes expérimentations.

Je tiens à témoigner ma reconnaissance à Madame **Dominique BOZON** pour, là aussi, sa grande disponibilité, la qualité de sa collaboration, sa vision scientifique, sa rigueur, son optimisme et l'ambiance de travail chaleureuse qu'elle apportait.

Je remercie Monsieur le professeur **Philippe CHEVALIER** pour sa participation au jury de thèse en tant que Président, et Messieurs **Gérard LEFRANC** et **André MEGARBANE**, en tant que rapporteurs, d'avoir consacré de leur temps à l'examen et à la critique de ce travail.

Je remercie aussi Monsieur **Alain TABIB** de m'avoir autorisée à utiliser le cryostat de l'hôpital cardiologique de Lyon, et surtout pour son aide précieuse dans l'analyse des coupes histologiques, ainsi que Monsieur **Alain CALENDER** et le laboratoire de "Génétique et Cancer" de l'hôpital Edouard Herriot pour avoir mis à ma disposition le séquenceur et pour leur gentillesse.

Je veux remercier Mesdames **Michèle MONTANGE** et **Arlette BERNARD** pour la pertinence de leurs conseils sur l'hybridation In Situ.

J'adresse mes sincères remerciements à **Angélique MULARONI** pour ses conseils scientifiques, son amitié et son soutien moral.

J'adresse aussi toutes mes amitiés à mes collègues de laboratoire pour leur gentillesse : **Brigitte**, **Jacqueline** et **Salima**, aux stagiaires, **Audrey**, **Christophe** et **Jean**, et aux permanents **Dominique Marcel**, **Roger** et **Olivier**.

Je tiens à témoigner ma reconnaissance et ma sympathie à **Michèle CARRIER** pour son amitié, son soutien moral, son enthousiasme et son humour si énergisant...

Je n'oublie pas non plus **Christiane BARDELLI** pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Je tiens à exprimer ma gratitude au CNRS du LIBAN et à la Région RHONE-ALPES qui ont contribué au financement de ce travail.

Je souhaite remercier aussi le service vétérinaire et l'abattoir Corbas de Lyon pour nous avoir autorisé l'accès, gracieusement, aux cœurs de bovin.

Je tiens à remercier l'université St Joseph de Beyrouth et l'unité "génétique médicale" pour nous avoir aimablement fourni les marqueurs du chromosomes X, avoir mis à notre disposition un appareil ECG et nous avoir permis l'extraction d'ADN dans son laboratoire.

Merci bien sûr à Fadi pour avoir mis à ma disposition sa grande maîtrise de certains logiciels informatiques.

Je remercie, enfin, particulièrement mes parents, mes frères et sœurs qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de cette thèse.

Sommaire

ABREVIATIONS	10
INTRODUCTION	13
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	17
I. L'ACTIVITE ELECTRIQUE CARDIAQUE	17
I.1. PROPAGATION DE L'ONDE D'ACTIVATION DANS LE COEUR	17
I.2. MECANISMES DE L'AUTOMATISME CARDIAQUE	20
I.3. MECANISMES DE L'EXCITABILITE ET DE LA PROPAGATION DE L'ACTIVITE ELECTRIQUE DANS LE TISSU CARDIAQUE	20
I.3.1. <i>Excitabilité normale</i>	20
I.3.2. <i>Mécanismes de la propagation normale</i>	21
II. LE TISSU DE CONDUCTION CARDIAQUE	22
II.1. NOTIONS ANATOMIQUES ET HISTOLOGIQUES	22
II.2. ORIGINE ET DEVELOPPEMENT DU SYSTEME DE CONDUCTION	25
II.2.1. <i>Origine neurogénique</i>	25
II.2.2. <i>Origine myogénique</i>	26
II.3. FACTEURS DE TRANSCRIPTION	28
II.3.1. <i>Csx/Nkx2.5</i>	28
II.3.2. <i>Msx-2 (Muscle segment-related homeobox)</i>	30
II.3.3. <i>HF-1b</i>	30
II.3.4. <i>Myogénine D (myoD)</i>	31
II.4. PROFILS D'EXPRESSION DES GENES DANS LES TISSUS DE CONDUCTION ET SPECIFICITES	32
II.4.1. <i>Les canaux ioniques cardiaques</i>	32
II.4.1.1. <i>Les canaux sodiques cardiaques</i>	33
II.4.1.2. <i>Les canaux calciques cardiaques</i>	35
II.4.1.3. <i>Le canaux potassiques cardiaques</i>	37
II.4.2. <i>Les canaux jonctionnels : La connexine</i>	43
II.4.3. <i>Les protéines contractiles</i>	46
II.4.4. <i>Les protéines cytosquelettiques</i>	48
II.4.5. <i>Créatine Kinase</i>	50
II.4.6. <i>Facteur Natriuretique Atrial (Atrial Natriuretic factor : ANF)</i>	50
II.4.7. <i>La calréticuline</i>	51
II.5- HYPOTHESES DES TROUBLES DE CONDUCTION	52
III. BLOCS DE CONDUCTION	53
III.1. LES BLOCS DE CONDUCTION	53
III.1.1. <i>Différents types de bloc de conduction</i>	53
III.2- ORIGINE GENETIQUE DES BLOCS DE CONDUCTION ISOLES ET HISTORIQUE	56
III.3. LES BLOCS DE CONDUCTION HEREDITAIRES ASSOCIES	58
III.4. LES TROUBLES DE CONDUCTION HEREDITAIRES ISOLES	60
III.4.1. <i>Formes et aspects cliniques des blocs de conduction familiaux isolés</i>	60
III.5. PRISE EN CHARGE ET TRAITEMENT	63
III.6. DIAGNOSTIC PRENATAL	63
III.7. GENETIQUE MOLECULAIRE DES TROUBLES DE CONDUCTION HEREDITAIRES PROGRESSIFS ISOLES.	64
III.7.1. <i>Loci et gènes identifiés</i>	64
III.8. PATHOLOGIE MOLECULAIRE DU GENE SCN5A CHEZ L'HOMME	68
III.8.1. <i>Mutations « perte de fonction » : blocs de conduction isolés</i>	68
III.8.2. <i>Mutations « perte de fonction » : syndrome de Brugada</i>	70
III.8.3. <i>Mutations « gain de fonction » : le syndrome de QT Long de type 3</i>	71
III.8.4. <i>Mutations du gène SCN5A responsables de plusieurs syndromes différents</i>	73
IV. LOCALISATION ET IDENTIFICATION DES GENES	76
IV.1. PRINCIPE	76
IV.2. LA RDA : REPRESENTATIONAL DIFFERENCE ANALYSIS	79
IV.2.1. <i>Principe et historique</i>	79

DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES	82
I. ETUDE DE LIAISON ET GENES CANDIDATS	82
I.1. FAMILLES ETUDIEES	82
I.2. ETAPE BIO-INFORMATIQUE	82
I.3. MARQUEURS POLYMORPHES	83
I.4. RECHERCHES DE NOUVEAUX MARQUEURS POLYMORPHES NON MENTIONNES DANS LES BANQUES DE DONNEES	83
I.5. DETERMINATION DE LA TAILLE DES ALLELES DES MARQUEURS POLYMORPHES MICROSATELLITES	84
I.6. RECHERCHE D'ANOMALIE GENIQUE	84
I.6.1. SSCP (<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>)	84
I.6.2. Séquençage	85
I.6.3. Clonage	86
II. RDA : REPRESENTATIONAL DIFFERENCE ANALYSIS	87
II.1. PRINCIPE	87
II.2. OBTENTION DES TISSUS	89
II.3. COUPES HISTOLOGIQUES	89
II.4. OLIGONUCLEOTIDES	89
II.5. OBTENTION DE REPRESENTATIONS DE DEUX TISSUS	90
II.5.1. <i>Extraction des ARN totaux de tissu de conduction et du myocarde</i>	90
II.5.2. <i>Purification des ARNm</i>	90
II.5.3. <i>Transcription inverse des ARNm de deux tissus</i>	91
II.5.4. <i>Digestion des ADNc de deux tissus (tissu de conduction et du myocarde) par DpnII</i>	94
II.5.5. <i>Ligation avec les adaptateurs R – Bgl-24</i>	94
II.5.6. <i>Optimisations des conditions d'amplification pour générer les représentations (tissu de conduction et myocarde)</i>	95
II.5.7. <i>Générations de représentations (tissu de conduction et myocarde)</i>	95
II.5.8. <i>Générations du driver (myocarde)</i>	96
II.5.9. <i>Générations du tester (tissu de conduction)</i>	96
II.5.10. <i>Purification du tester (tissu de conduction) des amorces R-Bgl-24</i>	97
II.6. ETAPE DE L'HYBRIDATION SOUSTRUCTIVE	97
II.6.1. <i>Ligation du tester (tissu de conduction) avec les amorces J-Bgl-24</i>	97
II.6.2. <i>Hybridation soustractive</i>	98
II.6.3. <i>Obtention de DP1 (produit différent 1 = produit de la première soustraction)</i>	98
II.6.4. <i>Purification de DP1 des amorces J-Bgl-24</i>	100
II.7. REITERATION DES ETAPES DE SOUSTRACTION ET D'AMPLIFICATION SELECTIVE	100
II.7.1. <i>Ligation de DP1 avec les amorces N-Bgl-24</i>	100
II.7.2. <i>Obtention de DP2 et DP3 et DP4</i>	101
II.8. ANALYSE DE L'EFFICACITE DE LA SOUSTRACTION	101
II.9. CLONAGE DE DP4	102
II.9.1. <i>Principe de clonage TOPO TA</i>	102
II.10. EXTRACTION DES PLASMIDES	103
II.11. SEQUENÇAGE DES PLASMIDES	105
II.12. ANALYSE DES SEQUENCES ET RECHERCHE D'HOMOLOGIE	105
II.13. PCR SEMI-QUANTITATIVE	105
II.14. HYBRIDATION IN SITU	105
II.14.1. <i>Préparation des ribosondes (sonde ARN)</i>	105
II.14.2. <i>Coupes cryostats</i>	106
II.14.3. <i>Réaction d'hybridation</i>	106
II.14.4. <i>Lavages et détection des sondes</i>	107

TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION	109
I. ETUDE DE LIAISON ET REDUCTION DE L'INTERVALLE DE LA MUTATION	109
I.1. ETUDE FAMILIALE	109
I.1.1. <i>Rappels</i>	109
I.1.2. <i>Recherche de nouveaux individus de la famille L1</i>	110
I.1.3. <i>Famille libanaise L2</i>	112
I.1.4. <i>Famille française F1</i>	114
I.1.5. <i>Famille française F2</i>	116
I.1.6. <i>Famille allemande G1</i>	118
I.2. REDUCTION DE L'INTERVALLE GENETIQUE	121
I.2.1. <i>La grande famille libanaise L1</i>	121
I.2.2. <i>Effet fondateur</i>	123
I.3. DISCUSSION	131
II. GENES CANDIDATS	133
II.1. ETUDE DU GENE <i>KCNC3</i> OU Kv3.3	133
II.2. ETUDE DU GENE <i>CD37</i>	137
II.3. ETUDE DU GENE <i>HRC</i>	139
II.4. ETUDE DU GENE <i>UI-70K</i>	143
II.5. ETUDE DU GENE LA <i>NT-4</i> OU LA NEUROTROPHINE 4 OU 5	145
II.6. ETUDE DU GENE <i>BAX</i>	146
II.7. ETUDE DU GENE <i>NUCB1</i>	148
II.8. ETUDE DU GENE <i>KCNJ14</i> OU Kir 2.4	150
II.9. ETUDE DU GENE <i>CABP3/5</i>	153
II.10. DISCUSSION	157
II.11. GENES SUR 19Q13.3 ENTRE D19S606 ET D19S601	159
III. RDA : REPRESENTATIONAL DIFFERENCE ANALYSIS	162
III.1. TISSUS PRELEVES	162
III.2. COUPES HISTOLOGIQUES	163
III.3. OBTENTION DES ARN TOTAUX DE TISSU DE CONDUCTION ET DU MYOCARDE	164
III.4. PURIFICATION DES ARNm	165
III.5. TRANSCRIPTION INVERSE DES ARNm	165
III.6. DIGESTION DES ADNC PAR <i>DpnII</i>	166
III.7. EFFICACITE DE LA LIGATION AVEC LES ADAPTATEURS	167
III.8. OPTIMISATION DES CONDITIONS (NOMBRE DE CYCLE, CONCENTRATION D'ADNC) POUR GENERER LES DEUX REPRESENTATIONS (TISSU DE CONDUCTION ET MYOCARDE)	168
III.9. ANALYSE DE L'EFFICACITE DE SOUSTRACTION	170
III.10. HYBRIDATION SOUSTRACTIVE ET OBTENTION DE DPS (<i>DIFFERENT PRODUCTS</i> : PRODUITS DIFFERENTS)	172
III.11. SEQUENÇAGE ET RECHERCHE <i>IN SILICO</i>	173
III.11.1. <i>Fonctions de certains gènes ou transcrits obtenus par la RDA</i>	176
III.12. PCR SEMI-QUANTITATIVE	178
III.12.1. <i>PCR sur les clones obtenus par la RDA</i>	179
III.12.2. <i>PCR semi-quantitative sur les clones obtenus par la RDA</i>	180
III.13. HYBRIDATION <i>IN SITU</i>	182
III.14. DISCUSSION	184
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	186
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	189
CLONAGE POSITIONNEL D'UN SYNDROME DE KARTAGENER A TRANSMISSION LIEE A L'X ET EXCLUSION DE DEUX GENES CANDIDATS : <i>MID2</i> ET <i>AKAP28</i>	222
PUBLICATIONS	237
RESUME	244

Abréviations

ABREVIATIONS

A A	Acide Aminé
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
BAV	Bloc Auriculo-Ventriculaire
BAVc	Bloc Auriculo-Ventriculaire complet
BAVi	Bloc Auriculo-Ventriculaire incomplet
BBDC	Bloc de Branche Droit complet
BBDi	Bloc de Branche Droit incomplet
BLAST	Basic Local Alignment Search Tools
Cx	Connexine
DCP	Dyskinésie Ciliaire Primitive
DHC	Dynein Heavy Chain ; Chaîne lourde de dynéine
DHPLC	Denaturing High Pressure Liquid Chromatography (Chromatographie liquide Haute Pression Dénaturante)
DIC	Dynein Intermediate Chain ; Chaîne intermédiaire de dynéine
DP	Difference Product ; Produit Différent
DLC	Dynein Light Chain ; Chaîne légère de dynéine
ECG	Electrocardiogramme
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HBAG	Hémibloc Antérieur Gauche
HBBD	Hereditary Bundle Branch Defect
HBPD	Hémibloc postérieur droit
KDa	Kilo Dalton
MC	Malformation Cardiaque
MHC	Myosin Heavy Chain ; Chaîne Lourde de Myosine

PCR	Polymerase Chain Reaction ; Réaction de Polymérisation en Chaîne
PVM	Prolapsus de la Valve Mitrale
RDA	Representational Difference Analysis
RT	Reverse Transcription ; Transcription inverse
SI	Situs Inversus
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
ZIC3	Zinc finger protein of cerebellum 3

Autres

GDB	Genome DataBase (http://www.gdb.org).
LLNL	Lawrence Livermole National Library (http://bbrp.llnl.gov/genome/genome.html).
NCBI	National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).
Ensembl Human Genome	(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/contigview).
Leiden Muscular Dystrophy pages	(http://WWW.dmd.nl).

Introduction générale

INTRODUCTION

L'onde d'activation responsable de la contraction musculaire myocardique emprunte des voies de conduction particulières à l'intérieur du myocarde. Ces voies de conduction sont constituées de cellules histologiquement distinctes du reste du myocarde. Les anomalies qui touchent les voies de conduction, peuvent aboutir à un arrêt ou un retard de la propagation de l'onde de dépolarisation, conduisant ainsi à ce qu'on appelle un bloc de conduction.

Les blocs de conduction cardiaque ont une incidence élevée, mais la proportion des cas familiaux est mal évaluée. Ces blocs de conduction se traduisent sur l'électrocardiogramme par des blocs de branche droit, des hémibranches de branche gauche, complets ou incomplets et des blocs auriculo-ventriculaires de divers degrés. Les blocs auriculo-ventriculaires du 3^{ème} degré se manifestent par un ralentissement important des battements cardiaques, par des sensations vertigineuses, un malaise ou une mort subite et nécessitent la pose d'un pacemaker. Le mode de transmission de cette maladie est autosomique dominante, à pénétrance incomplète, beaucoup plus élevée chez les hommes (70%) que chez les femmes (50%) (Stéphan E et al., 1979, 1997). L'étude de liaison d'une famille libanaise a permis de localiser la mutation en 19q13.3 à 10 cM d'intervalle (De Meeus A et al., 1995), mais le gène est inconnu. Il s'agit d'une maladie hétérogène, jusqu'à présent deux loci ont été identifiés, et un seul gène est connu comme étant responsable de bloc de conduction familial (la maladie de Lenègre et Lev) : la sous-unité α du canal sodique SCN5A en 3p25.

Notre objectif est d'identifier le gène muté responsable de bloc de conduction familiale lié au chromosome 19q13.3. Après une étude bibliographique, et les matériel et méthodes qui ont été utilisés pour réaliser ce travail, les résultats sont présentés en trois chapitre :

La première partie de ma thèse est consacrée à l'étude de cinq familles atteintes de blocs de conduction : deux familles libanaises, deux familles françaises et une famille allemande. Cette étude a été effectuée par la stratégie d'étude de liaison. Nous avons montré que les malades partagent le même haplotype qui est compatible avec la mutations sur 19q13.3. Afin de réduire l'intervalle de la mutation, nous avons émis l'hypothèse d'un effet fondateur entre les deux familles libanaises, et entre une

famille françaises et une famille sud-africaine, et nous avons identifié deux marqueurs polymorphes qui sont disponibles maintenant sur les bases de données (D19S1193 et D19S1194). Cette hypothèse d'un effet fondateur n'a pas été confirmée. Grâce à un polymorphisme et une recombinaison chez un malade de la famille libanaise L1, nous avons réduit l'intervalle de la mutation à 7 cM entre CaBP3/5 (exclus) du côté centromérique et D19S601 (exclus) du côté télomérique.

Dans la deuxième partie de ma thèse, nous détaillerons l'approche gènes candidats, afin de tenter d'identifier le gène muté responsable de cette maladie. L'analyse des séquences codantes des différents gènes qui semblaient les plus probablement impliqués de par leur fonction présumée ou leur expression dans le tissu cardiaque, nous a permis d'exclure 9 gènes (*KCNC3*, *CD37*, *HRC*, *U1-70K*, *NT-4*, *BAX*, *NUCB1*, *KCNJ14* et *CaBP3/5*). Avec le progrès du séquençage du génome humain, l'intervalle dans lequel se trouve la mutation s'avère être très riche en gènes, nous avons donc entrepris un changement de stratégie par l'analyse de transcriptome.

Jusqu'à présent aucune étude n'a exploré les gènes spécifiquement exprimés dans le tissu de conduction de cœur adulte. Des travaux ont été menés pour mettre en évidence des gènes et des EST exprimés dans le cœur à partir des ARN prélevés des oreillettes et des ventricules, donc, à priori, pas à partir de tissu de conduction (Hwang D.M., et al., 1997, Bortoluzzi et al., 2000, Dai et al., 1999, Fung et al., 1996, Liew et al., 1997, Tanaka et al., 1996, Ton et al., 2000).

Dans la troisième partie de ma thèse nous présenterons l'approche de la *RDA* (*Representational Difference Analysis*) ou l'hybridation soustractive, afin de sélectionner les gènes qui sont spécifiquement exprimés dans le tissu de conduction cardiaque, en supposant que le gène muté est exprimé spécifiquement dans ces cellules conductrices de l'onde de dépolarisation cardiaque, puisqu'il s'agit d'une atteinte sélective de ce tissu. Ce travail nécessite l'obtention de voies de conduction cardiaque, opération très délicate chez l'homme, aussi avons nous choisi de travailler sur le cœur de bovin. Après purification des ARNm de voies de conduction et du myocarde, les ADNc sont hybridés

pour soustraire les ADNc communs aux 2 prélèvements et ne garder que ceux spécifiques des voies de conduction.

Par ailleurs, une étude sur le syndrome de Kartagener, qui associe une dyskinésie ciliaire primitive avec situs inversus, a été réalisée sur une famille dont la transmission semble liée à l’X. Nous avons localisé la mutation en Xq21-q24 à 34 cM d’intervalle. L’analyse de deux gènes candidats nous a permis d’exclure deux gènes *MID2* et *AKAP28* comme étant responsable de cette maladie.

Etude bibliographique

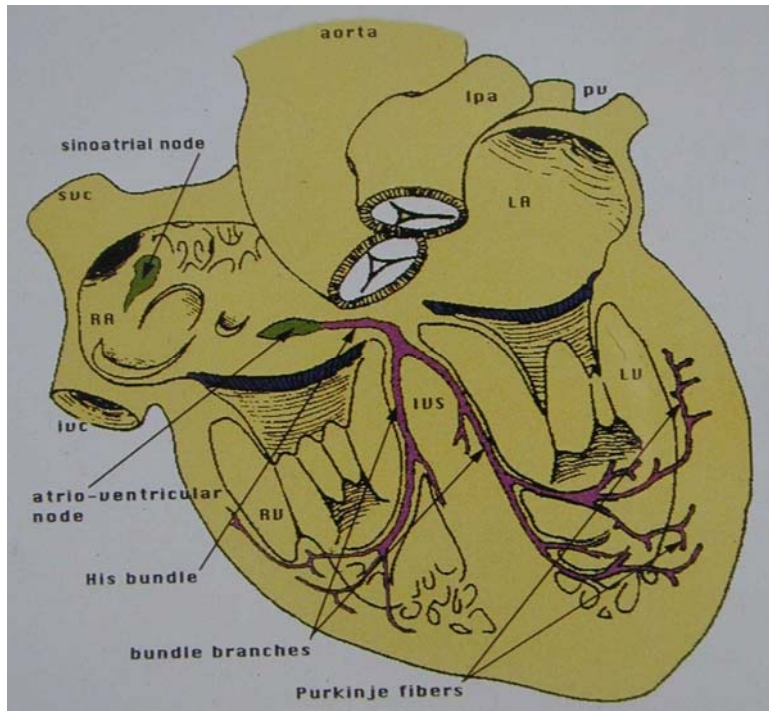
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. l'activité électrique cardiaque

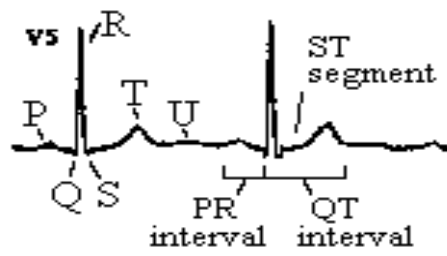
I.1. Propagation de l'onde d'activation dans le coeur

L'onde d'activation responsable de la contraction musculaire myocardique emprunte des voies de conduction particulières à l'intérieur du myocarde. Ces voies de conduction sont constituées de cellules histologiquement distinctes du reste du myocarde (figure 1A) qui présentent trois propriétés électrophysiologiques principales : automatisme, excitabilité et conduction.

L'activation cardiaque naît dans le nœud sinusal de Keith et Flack (FK), et se propage dans le myocarde des oreillettes droite et gauche, qui se contractent, et chassent le sang vers les ventricules. Puis, elle atteint le nœud auriculo-ventriculaire d'Aschoff-Tawara (AT), où le ralentissement de la conduction au niveau de ce nœud permet à la systole auriculaire de s'achever et permet ainsi le remplissage des cavités ventriculaires avant la transmission de l'onde d'activation aux ventricules. Du nœud auriculo-ventriculaire part un faisceau de cellules (fonctionnellement très important mais anatomiquement minuscule, il est à peine visible à l'œil nu chez l'Homme) appelé **faisceau de His**. Arrivé dans la partie ventriculaire (au niveau du septum inter-ventriculaire), ce dernier se sépare rapidement en deux branches, droite et gauche, destinées respectivement aux ventricules droit et gauche. La branche droite est la seule qui soit bien individualisée, car la branche gauche se divise rapidement en hémibranches antérieures et postérieures pour les faces antérieure et postérieure du ventricule gauche. L'activité électrique atteint l'apex des ventricules qui se contracte, puis cette activité électrique remonte l'apex vers la base des ventricules et se transmet ainsi à l'ensemble de la paroi ventriculaire, de l'endocarde vers l'épicarde, par le biais du réseau de Purkinje. La systole ventriculaire se produit alors et permet de chasser le sang des ventricules vers l'artère pulmonaire et l'aorte.



A



B

Figure 1 : A : Schéma du cœur, indiquant les différentes parties du tissu de conduction cardiaque. B : un ECG mentionnant les différentes ondes P, Q, R, S et T.

L'électrocardiogramme est la résultante spatio-temporelle du potentiel d'action des cardiomyocytes. Ce potentiel d'action résulte d'une cascade de transferts ioniques dépendant des variations de perméabilité de la membrane cytoplasmique. La morphologie du potentiel d'action cellulaire est différente d'un type de tissu myocardique à l'autre (Antezelevitch C. et coll. , 1991) (figure 1B).

Sur l'électrocardiogramme l'onde P correspond à la dépolarisation des oreillettes, l'intervalle PQ au temps de conduction auriculo-ventriculaire, le complexe QRS représente la dépolarisation simultanée des ventricules et l'onde T représente la repolarisation ventriculaire. La durée de l'intervalle QT correspond à la durée de repolarisation ventriculaire.

Une anomalie des voies de conduction, aboutissant à un arrêt ou un retard de la propagation de l'onde de dépolarisation, conduit ainsi à ce qu'on appelle un bloc de conduction.

I.2. Mécanismes de l'automatisme cardiaque

L'automatisme ou propriété d'auto-excitation spontanée est une caractéristique des cellules du nœud sinusal et du système de conduction spécialisé. Le nœud sinusal a la fréquence d'automatisme la plus élevée et il l'impose à l'ensemble du myocarde : on dit qu'il agit comme pacemaker cardiaque. Les cellules du nœud auriculo-ventriculaire ou du système His-Purkinje peuvent imposer leur fréquence en cas de défaillance du nœud sinusal ou lorsque leur fréquence d'excitation spontanée est augmentée. A la différence des cellules auriculaires et ventriculaires, le potentiel de repos des cellules de conduction n'est pas stable.

La phase de dépolarisation lente serait due principalement à trois courants : les courants potassiques rectifiants retardés I_K , le courant *pacemaker* I_f , et un courant sodique I_b (background). La phase de dépolarisation rapide dépend des canaux calciques dans le nœud sinusal ($I_{Ca,T}$ et $I_{Ca,L}$), alors que dans les cellules de Purkinje, ce sont les canaux sodiques qui jouent ce rôle. Des transporteurs membranaires, tels que l'échangeur Na^+/Ca^{2+} , pourraient aussi contribuer à l'automatisme cellulaire.

L'automatisme cellulaire peut être influencé par les modulateurs des courants potassiques, sodiques et calciques. Le système nerveux autonome module la fréquence cardiaque en agissant sur les courants ioniques des cellules du nœud sinusal : une stimulation vagale provoque une bradycardie alors qu'une stimulation sympathique provoque une tachycardie.

I.3. Mécanismes de l'excitabilité et de la propagation de l'activité électrique dans le tissu cardiaque

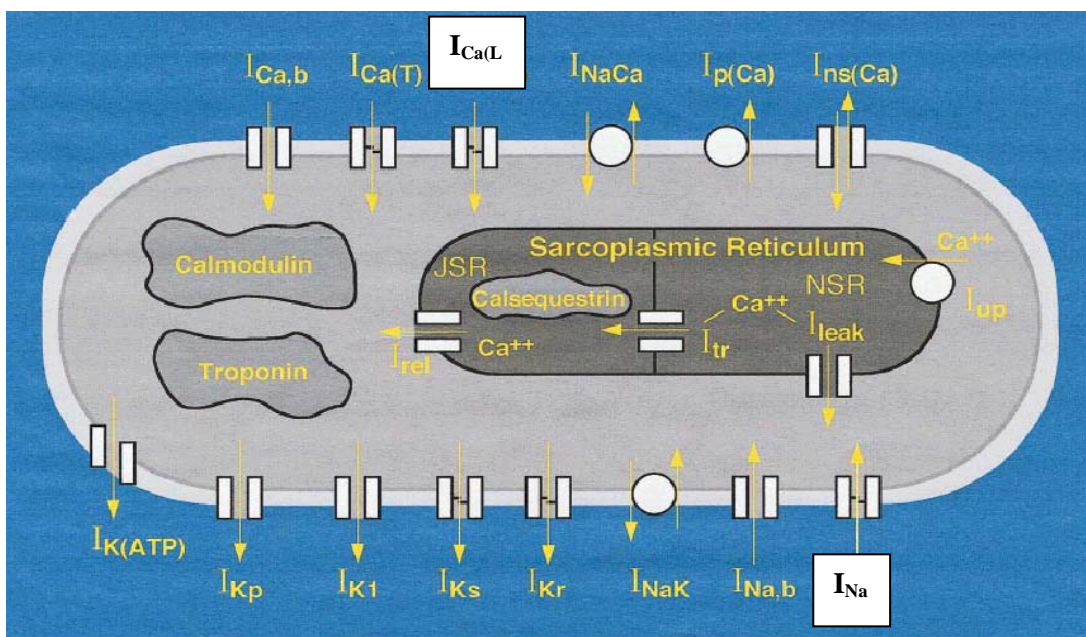
I.3.1. Excitabilité normale

L'excitabilité correspond à la possibilité pour une cellule de générer un potentiel d'action en réponse à un stimulus dépolarisant. L'excitabilité dépend de l'amplitude et des cinétiques des courants ioniques responsables de la dépolarisation rapide du potentiel d'action (I_{Na} dans les oreillettes, les ventricules et

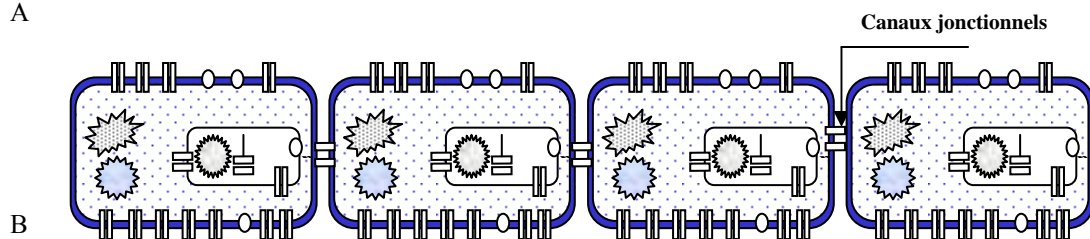
le système His-Purkinje ; I_{Ca} dans les nœuds sinusal et auriculoventriculaire), du potentiel seuil d'activation de I_{Na} et I_{Ca} , de la différence entre le potentiel de repos et le potentiel seuil et des propriétés de « câbles » des myocytes.

I.3.2. Mécanismes de la propagation normale

La conduction cardiaque dépendrait principalement du courant sodique I_{Na} , du courant calcique $I_{Ca,L}$ et du couplage électrique intercellulaire au moyen des canaux jonctionnels (figure 2).



A



B

Figure 2 : Modèles d'études de la conduction électrique cardiaque. A : modèle dynamique de Luo-Rudy (LRd) représentant les principaux courants ioniques de la cellule ventriculaire. Les principaux courants responsables de la conduction cardiaque, $I_{Ca(L)}$ dans le nœud sinusal et I_{Na} dans le système de conduction périphérique (Kodama I et al., 1997). B : une série de cellules ventriculaires interconnectées par des canaux jonctionnels (shaw RM et Rudy Y. 1997).

II. Le tissu de conduction cardiaque

II.1. Notions anatomiques et histologiques

C'est un tissu conducteur, constituant un véritable "système de commande du cœur", qui tient sous sa dépendance l'automatisme et le rythme des contractions de l'organe. C'est un tissu musculaire de type particulier à striation discrète, dans lequel se perpétuent les variations spontanées et rythmiques de perméabilité des membranes cellulaires. Il constitue la seule connexion fonctionnelle entre le myocarde atrial et ventriculaire (figure 1A).

Il comporte deux parties différentes par la topographie et la structure mais parfaitement continues : une partie condensée, où prend naissance l'excitation et une partie diffuse qui transmet l'influx à l'ensemble du myocarde. La première présente les nœuds situés dans l'oreillette droite : le nœud sinusal et le nœud auriculo-ventriculaire, près de la charpente fibreuse. La deuxième présente le faisceau de His, les branches et le réseau de Purkinje.

Le nœud sinusal (SAN) ou le "nœud de Keith et Flack" est situé à la jonction de la partie inférieure de la veine cave supérieure et de la face antérieure de l'oreillette droite. Il génère des décharges spontanées à la fréquence de 60 à 100 par minute, ce qui en fait le centre d'automatisme primaire. Il est régulé par le tonus sympathique et parasympathique.

Le nœud auriculoventriculaire (AVN) ou le "nœud d'Aschoff-Tawara" se trouve à la partie basse de l'oreillette droite, près de l'orifice du sinus coronaire et de la valve tricuspide. Il présente une structure semblable à celle du nœud sinusal. Il ralentit l'influx d'un dixième de seconde, protégeant ainsi les ventricules d'un rythme primaire trop rapide, et assure que les ventricules ne se contractent pas avant que la contraction des oreillettes ne soit terminée.

Le faisceau de His relie le nœud auriculo-ventriculaire au myocarde ventriculaire, il est le seul à pouvoir transmettre l'onde de dépolarisation des oreillettes aux ventricules, car les oreillettes et les ventricules sont séparés par du tissu fibreux. Il commence par un tronc simple, qui s'engage dans la portion fibreuse du septum en longeant le bord d'insertion de la valve tricuspide, puis se subdivise en une branche droite et une branche gauche.

La branche droite, prolonge directement le faisceau de His en cheminant le long du bord droit du septum inter-ventriculaire pour se disperser dans le ventricule droit.

La branche gauche, traverse le septum en dessous des valves sigmoïdes aortiques, elle se dirige alors vers le bas en position sous-endocardique, en se divisant en de nombreux branches, antérieures et postérieures.

Le réseau de Purkinje, ramification terminale des branches droite et gauche du faisceau de His, s'étend sur toute la musculature ventriculaire pour propager l'influx et est capable de décharger spontanément des impulsions à la fréquence de 20 à 40 par minutes.

Les myocytes conducteurs de nœuds sinusal et auriculo-ventriculaire sont assemblés dans un tissu conjonctif. Ces cellules nodales ont beaucoup d'analogies avec les fibres myocardiques. Cependant elles en diffèrent par leur aspect fusiforme et leur diamètre nettement plus faible (3 à 5 μm), et apparaissent semblables aux cardiomyocytes embryonnaires. Leurs myofibrilles sont peu nombreuses. Le noyau est volumineux et entouré d'une zone de cytoplasme claire. Les tissus conjonctifs qui enveloppent les myocytes conducteurs, sont riches en micro-vaisseaux et mêlés de nombreuses fibres parasympathiques et de cellules nerveuses ganglionnaires. Le conjonctif est moins abondant dans le nœud sinusal, mais plus abondant dans le nœud auriculoventriculaire.

Dans le tronc commun du faisceau de His, la structure des cellules conductrices est d'abord identique à celle du nœud qu'il prolonge puis se modifie : les cellules deviennent moins irrégulières, plus largement accolées les unes aux autres et leur taille augmente.

Le réseau sous-endocardique de Purkinje est formé de myofibres cylindroïdes de dimensions très supérieures à celles des fibres de myocarde. Chez les Ongulés, ces myocytes conducteurs atteignent 150 à 200 μm de long et 30 à 40 μm de large. Les myocytes conducteurs sont accolés par une partie étendue de leurs faces latérales de façon à former des bandes allongées qui s'anastomosent pour constituer le réseau. Ils possèdent un noyau double, un cytoplasme très riche en glycogène et des myofibrilles peu nombreuses. Le sarcolemme est très froncé, et pourvu d'innombrables évaginations qui en augmentent la superficie et permettent une grande intensité des échanges.

Il existe des formes de transition entre les myocytes nodaux et ceux du réseau sous-endocardique. La transition est tout aussi progressive entre le tissu de conduction et les fibres myocardiques. Toutefois, les différences morphologiques entre les types extrêmes de ces constituants du myocarde ne sont pas aussi importantes dans toutes les espèces. Elles sont particulièrement évidentes chez les Ongulés, tandis que les Carnivores et l'Homme présentent des types intermédiaires.

Il existe des variations considérables entre les espèces dans la morphologie des cellules de conduction, et une hétérogénéité au niveau des nœuds et des fibres de Purkinje périphériques.

II.2. Origine et développement du système de conduction

Chez l'Homme et les mammifères, les premiers signes morphologiques du noeud sinusal, du faisceau de His et de ses branches primaires, apparaissent à environ 5 à 6 semaines du développement embryonnaire et à 10 jours du développement embryonnaire chez la souris (Davies MJ et al., 1983, Canale ED et al., 1986, Viragh S et al., 1977), dans la partie la plus postérieure du tube cardiaque assurant ainsi une voie de contraction unidirectionnelle.

L'origine du système de conduction a fait débat pendant plusieurs années, puisque la coexpression des gènes d'origine neuronale et squelettique a confondu la compréhension de l'origine de ce système. Par conséquent, deux origines cellulaires ont été proposées, une myogénique (Patten 1956) et une neurogénique (Gorza et al., 1988a, Vitadello et al., 1990).

II.2.1. Origine neurogénique

Des auteurs ont proposé que le système de conduction cardiaque dérive des cellules de la crête neurale (Gorza et al., 1988, Kirby et al., 1983 et 1993) en suggérant que les cellules de la crête neurale entrent dans le coeur embryonnaire au 4^{ème} jour du développement chez le poulet pour former les éléments gliaux et les ganglions cardiaques. Cependant, Cheng et al., (1999) ont réalisé une microinjection de rétrovirus comportant le gène β - galactosidase dans les cellules de crête neurale cardiaque avant ou durant leur migration dans le tube cardiaque et ils ont observé qu'il n'y avait pas d'incorporation de cellules marquées au β - galactosidase dans les cellules de conduction mais plutôt dans le myocarde. Cette hypothèse de l'origine neurale n'a donc pas été démontrée.

II.2.2. Origine myogénique

Des conclusions définitives à propos de l'origine du système de conduction cardiaque ont été obtenues par analyse des lignées cellulaires, par marquage rétroviral et techniques d'injection de colorant. La plupart des études ont été réalisées sur le poulet et le rat, et ont montré que les cellules de conduction cardiaques dérivent de précurseurs myogéniques du tube cardiaque (Cheng et al., 1999).

II.2.2.1. Etude chez le poulet

L'utilisation de rétrovirus et d'adénovirus codant la β -galactosidase (*lacZ*) sous le contrôle du promoteur dérivant de cytomegalovirus humain (CMV) ou de virus de sous sarcoma du poulet (RSV), a permis de suivre l'évolution des lignées cellulaires des fibres de Purkinje chez le poulet par microinjection de ce virus dans le tube cardiaque au 3^{ème} jour du développement embryonnaire (Gourdie et al., 1995, Cheng et al., 1999). Après incubation des embryons jusqu'au 5^{ème} et 18^{ème} jour de développement, la révélation de la β -galactosidase montre qu'il existe une relation clonale entre les cellules de Purkinje et les myocytes ventriculaires.

Ces auteurs ont proposé un modèle de différenciation de fibres de Purkinje périvasculaires. L'élément clé de la différenciation est la vasculogénèse (le développement de l'artère vasculaire coronaire commence après la phase de septation), puis la conversion de myocytes contractiles qui sont adjacents aux vaisseaux artériels en cellules conductrices qui sont quiescentes, tandis que les myocytes contractiles continuent de proliférer. Dans les ventricules de poulet, le site de recrutement des cardiomyocytes aux fibres de Purkinje sont sous-endocardique et périatriale, cela a permis d'émettre l'hypothèse que les facteurs paracrines qui dérivent de la circulation artérielle sont responsables de ce phénomène (Gourdie et al., 1995, Mikawa et al., 1996). Cette hypothèse a été renforcé par le fait qu'*in vivo*, une activation de l'artère coronaire a permis une différenciation ectopique de fibres de Purkinje chez le poulet (Hyer et al., 1999). Il a été démontré plus tard que l'endothéline 1 (ET-1) (*Vascular associated Cytokine*), un facteur paracrine sécrété par les cellules endothéliales en réponse au stress, est capable de faire différencier des myocytes embryonnaires en fibres de Purkinje *in vivo*

(Takebayashi-Suzuki et al., 2000) et *in vitro* (Gourdie et al., 1998). Mais ceci n'a pas été reproduit ni chez la souris ni chez l'homme.

II.2.2.2. Etude chez la souris

Jusqu'à présent, la plupart des études sur le développement et l'origine du système de conduction ventriculaire ont été portées sur le poulet. Très peu de données sont disponibles à propos de la régulation de ce système chez les mammifères. La différence majeure entre le poulet et les mammifères, et que le système de conduction est sous-endocardique chez les derniers. Par ailleurs, les cellules endothéliales pourraient être aussi impliquées dans la différenciation du système de conduction cardiaque chez les mammifères, puisque ce système est proche de l'endocarde.

Une étude a montré que la Neuregline-1 (NRG-1) permet la formation du système de conduction cardiaque chez la souris (Rentschler et al., 2002). La Neuregline est un peptide de facteur de croissance qui agit par des récepteurs de type tyrosine-kinase. Dans le cœur, son expression est restreinte aux cellules endothéliales. Plusieurs facteurs paracrines dont l'endothéline-1 (Srivastava D et Olson E. 2000) sont capables d'induire la différenciation des cardiomyocytes en système de conduction. L'utilisation des souris transgéniques (*SCC-lacZ*) dans lesquelles le gène *lacZ* est exprimé dans le système de conduction cardiaque a permis de montrer que la NRG-1 induit d'une manière remarquable une expression ectopique de *lacZ* à 8.5–10.5 jours du développement embryonnaire dans la totalité du système de conduction. Les auteurs concluent que la Neuregline-1 jouerait un rôle majeur endogène responsable dans la différenciation des cardiomyocytes murins en cellules de conduction.

En plus, les souris invalidées pour le gène Neuregline-1, meurent à 10,5 jours du développement embryonnaire (Meyer D et al., 1995). Le même phénotype a été observé pour les souris portant une perte de fonction du récepteur de la neuregline erB2 ou erB4 (Lee KF et al., 1995, Gassmann M et al., 1995, Marchionni MA. 1995). erB2 ou erB4 sont exprimés dans le myocarde des oreillettes et des

ventricules. La cause exacte de la mort de ces souris est inconnue, probablement est-elle due à un manque de capacité contractile du cœur.

II.3. Facteurs de transcription

La formation d'un organe complexe comme le cœur nécessite l'expression d'un grand nombre de gènes, dont la plupart ne lui sont pas spécifiques. Les études chez différents modèles animaux ont montré une certaine conservation du développement cardiaque, contrôlé par des facteurs de transcription. Les facteurs de transcription responsables de la différenciation des cellules de conduction sont mal connus. Parmi ceux qui sont connus, on trouve Csx/Nkx2.5, Msx-2 et HF-1b.

II.3.1. Csx/Nkx2.5

Les cardiomyocytes dérivent des cellules souches du mésoderme directement après gastrulation. Ils sont produits en réponse à des facteurs protéiques, comme les protéines morphogéniques osseuses. Les signaux cardiogéniques activent l'expression de Nkx2.5 qui est le marqueur le plus précoce des lignées cardiaques (Harvey R.P. 1996).

Le facteur de transcription de l'homéobox Csx/Nkx2.5, un homologue de *tinman* chez le *Drosophila* est exprimé très précocement au niveau du mésoderme cardiaque et jouerait un rôle essentiel dans la différenciation, le développement, la maturation et la maintenance des cardiomyocytes. Il interviendrait dans la régulation de la septation auriculaire, ventriculaire et conotruncale pendant la morphogenèse cardiaque, dans la formation des valves auriculo-ventriculaire ainsi que dans la maturation et le maintien du nœud auriculo-ventriculaire, et dans la formation du système de conduction (Schott J.J. et al., 1998, Benson W. et al., 1999).

Des études d'expression ont montré que Nkx2.5 est plus abondant dans le système de conduction que dans les myocytes cardiaques : 1- durant le premier et le deuxième trimestre du développement embryonnaire cardiaque humain, 2- après la phase de la septation (incluant le 14^{ème} dpc) du cœur fœtal de la souris, 3- entre les stades HH17 à HH44 (stade Hamburger et Hamilton, stade où le cœur contient

seulement des cellules myocardiques et endocardiques) du développement cardiaque chez le poulet (Thomas PS. et al., 2001).

Csx/Nkx2.5 est un régulateur ou activateur transcriptionnel de plusieurs facteurs de transcriptions tels que eHAND, MEF2C (contrôle la différenciation des myocytes), Msx2, CARP, M-Myc. Les souris invalidés homozygotes Csx/Nkx2.5 *-/-* (Kasahara H. et al. 2000), présentent une sous-expression des ces facteurs, et une diminution d'expression de MLC2V (*Myosin Light Chain 2 Ventricular*), ANF (*Atrial Natriuretic Factor*) et BNF (*Brain Natriuretic Factor*). Csx/Nkx2.5 lie également GATA4 une protéine à doigt de zinc (Molkentin JD et al., 1997). Ces deux protéines activent l'expression d'ANF (*Atrial Natriuretic Factor*), qui est présent dans le système de conduction atrial et ventriculaire (Wharton J et al., 1988, Hansson et Forsgren 1993).

Lyons et al., (1995) ont montré que les souris invalidées pour le gène Nkx2.5 meurent à des stades très précoces du développement embryonnaire, avec un arrêt du développement au stade du tube cardiaque, avant de faire la boucle cardiaque.

Des souris transgéniques portant une mutation ponctuelle I183P dans la troisième hélice du domaine de liaison à l'ADN (Kasahara et al., 2001) présentent un phénotype de troubles de conduction auriculo-ventriculaire progressifs et une insuffisance cardiaque. En plus, on observait chez ces souris transgéniques une diminution importante des connexines 40 et 43. Cette même mutation serait responsable de BAV progressifs du 2^e et 3^e degré sans malformation cardiaque et altère la liaison de NKx2.5 à l'ADN, mais préserve sa capacité d'homodimérisation. Il existerait des sites de fixation consensus dans les régions promotrices des connexines pour le gène Nkx2.5 (Chen C.Y. et Schwartz R.J. 1995, Chen Z.Q. et al., 1995, Seul K.H. et al., 1997).

Des mutations dans le gène *Nkx2.5* ont été décrites chez des patients atteints des cardiopathies congénitales : des blocs auriculo-ventriculaires (BAV) progressifs avec des communications inter-auriculaires de type Ostium Secundum, ou d'autres malformations cardiaques, telles qu'une communication inter-ventriculaire, une tétralogie de Fallot et des malformations des valves tricuspides (Schott JJ et al., 1998, Benson W et al., 1999). Schott et al., (1998) avaient trouvé des mutations au niveau du gène *NKx2.5* dans 4 familles souffrant de malformation cardiaque avec des troubles de

conduction (BAV), transmis selon un mode autosomique dominant. *Nkx2.5* est codé par le gène *Nkx2.5* localisé en 5q34-q35.

II.3.2. Msx-2 (Muscle segment-related homeobox)

Le facteur de transcription *Msx-2* (homologue au *Drosophila muscle segment-related homeobox*) a été observé dans les progéniteurs des cellules de conduction dans le cœur de poulet au cours du développement embryonnaire. L'utilisation des sondes ARN du gène *Msx-2* par Hybridation In Situ a montré que l'ARN était restreint à une population des cellules de myocarde qui coïncide avec le système de conduction cardiaque central, incluant l'anneau auriculoventriculaire et suggérant que *Msx-2* joue un rôle important dans la septation et la formation des valves, mais son expression n'a pas été liée aux fibres de Purkinje (Chan-Thomas et al., 1993). Le gène codant *Msx-2* est localisé sur en 5q34-q35.

II.3.3. HF-1b

Un autre facteur de transcription HF-1b (sp4), codant une protéine à doigts de zinc apparentée à la famille sp1, est impliqué dans la différenciation des cellules du système de conduction et des myocytes ventriculaires en intervenant notamment dans la mise en place des canaux ioniques et des connexines. Ce gène est exprimé de façon prépondérante dans le cerveau et le cœur, notamment dans les zones du septum inter-ventriculaire (qui coïncident avec le tissu de conduction) et dans la paroi libre des ventricules. Chez la souris, il est préférentiellement exprimé dans le système de conduction cardiaque et dans les myocytes ventriculaires (Nguyen-Tran VTB et al., 2000).

Les souris invalidées pour ce gène naissent normalement mais elles présentent des troubles de conduction et meurent subitement par arythmie ventriculaire (Nguyen-Tran V.T.B. et al., 2000). L'analyse anatomique a montré que ces souris auront une diminution du nombre de cellules exprimant la connexine 40, surtout celles du réseau de Purkinje, avec des anomalies de distribution intracellulaire de la connexine 40. HF-1b est exprimé dans les mêmes régions que la connexine 40 au cours du

développement (Gourdie R.G. et al., 1993, Delorme B. et al., 1995, Simon A.M. et al., 1998, Moorman A.F. et al., 1998).

La protéine minK, en absence de HF-1b, est désorganisée dans le septum interventriculaire chez les souris nouveau-nés reflétant une anomalie du développement du système de conduction. Le gène minK est exprimé normalement au niveau de la jonction auriculo-ventriculaire et le long des voies de conduction du septum interventriculaire. Il constitue un marqueur de ce système chez la souris (Kupersmidt S. et coll., 1999) et son expression diminue chez les souris adultes normales, alors que chez les souris mutantes cette expression se maintient à un niveau élevé.

HF-1b joue un rôle majeur dans le déterminisme des troubles de conduction et de la mort subite. L'analyse de la cascade impliquant HF-1b devrait permettre de mieux comprendre ces mécanismes, et d'identifier des candidats pour ces troubles.

II.3.4. Myogénine D (myoD)

Durant la conversion des myocytes ventriculaires en fibres de Purkinje, celles-ci continuent à exprimer les facteurs de transcription comme NKx2.5 et GATA4 et MEF2C, et un autre facteur de transcription caractéristique du muscle squelettique, myoD. Ce dernier présente une augmentation d'expression dans les fibres de Purkinje, mais Myf5 et MRF4 sont indétectables (Takebayashi-Suzuki et al., 2001), montrant ainsi que les fibres de Purkinje expriment un facteur de transcription myogénique unique.

Les facteurs impliqués dans l'activation des gènes des muscles squelettiques dans le système de conduction cardiaque sont inconnus. Les gènes régulateurs du muscle squelettique, spécifiques de la famille des gènes *MyoD*, ne sont pas exprimés dans les tissus de conduction (Takebayashi-Suzuki et al., 2001). Cependant, les muscles squelettiques et les fibres de Purkinje partagent des mécanismes régulateurs puisque par exemple la région 5' du gène de desmine permet l'expression d'un gène

rapporteur dans les muscles squelettiques et les tissus de conduction mais pas dans les myocarde (Li Z et al., 1993).

La transition morphologique et fonctionnelle des précurseurs myogéniques aux cellules du système de conduction est essentielle à l'établissement de phénotypes distincts entre les différents composants de ce système, tels que le nœud sinusal, le nœud auriculo-ventriculaire, le faisceau de His et le réseau de Purkinje. Chacun présente des spécificités qui lui confère un phénotype électrophysiologique propre. Cette différence d'expression des gènes est détaillée dans la partie suivante.

II.4. Profils d'expression des gènes dans les tissus de conduction et spécificités

Les myocytes conducteurs ne peuvent pas être reconnus morphologiquement des myocytes cardiaques dans la plupart des espèces, homme, rat, souris, etc.... Sur le plan moléculaire, ces myocytes conducteurs sont très mal connus. Par ailleurs, plusieurs classes de gènes et de protéines, neuronales, myogéniques et embryonnaires, permettent la distinction des myocytes conducteurs de ceux du myocarde qui les entourent. Bien que peu d'études ont été réalisées sur les tissus de conduction, certains gènes sont connus comme étant exprimés dans ces tissus.

II.4.1. Les canaux ioniques cardiaques

Les cellules cardiaques possèdent un répertoire très important de canaux ioniques pour engendrer une activité électrique périodique et pour propager cette activité aux cellules voisines. C'est l'équilibre de l'activité des canaux qui permet au cœur non seulement d'engendrer et de propager son activité électrique mais aussi de la moduler.

Les potentiels d'action cardiaque présentent des morphologies différentes en fonction des régions anatomiques du cœur. Ces différences sont liées à la variabilité intercellulaire des canaux ioniques,

elles-même liées aux différences d'expression et de propriétés des différents canaux ioniques cardiaques (Li G.R. et al., 1998).

Il existe plusieurs types de canaux ioniques cardiaques (sodiques, calciques et potassiques). Les principales causes du ralentissement de la conduction cardiaque sont une diminution de l'excitabilité ou du couplage électrique intercellulaire, due à des anomalies des canaux ioniques cardiaques.

II.4.1.1. Les canaux sodiques cardiaques

Les canaux sodiques cardiaques sont responsables de la phase de dépolarisation du potentiel d'action et leur fonction est essentielle à la propagation rapide de la dépolarisation au travers du myocarde. Dans les conditions normales, lorsque le myocarde est dépolarisé, les canaux sodiques s'ouvrent brièvement et s'inactivent très rapidement. Deux gènes codant des sous-unités α : les gènes *SCN5A* et *SCN6A* sont prédominant dans le cœur.

Le canal sodique cardiaque *SCN5A* est responsable de la phase de dépolarisation du potentiel d'action et sa fonction est essentielle à la propagation rapide de la dépolarisation à travers le myocarde. C'est un complexe multimérique formé par une sous-unité α et une ou deux sous-unités auxiliaires $\beta 1$. La sous-unité α est un monomère à quatre domaines répétés (DI à DIV), reliés par des domaines de liaisons intracellulaires. C'est une protéine glycosylée de 260 kDa et constituée de 2016 a.a.. qui est codée par un gène de 28 exons repartis sur 80 kb. Chaque domaine comporte six hélices transmembranaires (S1 à S6), le pore est situé entre S5-S6, et les terminaisons N-terminale et C-terminale sont intracellulaires (Balsler J.R. et al., 1999). La sous-unité α joue un rôle majeur dans la génèse du courant sodique. La sous-unité $\beta 1$ a un seul segment transmembranaire, la terminaison N-terminale est extracellulaire tandis que la terminaison C-terminale est intracellulaire. C'est une protéine de 218 kDa codée par le gène *SCN1B* qui est localisée sur le chromosome 19q13.1. Le gène *SCN5A* est exprimé dans le cœur, le muscle squelettique et certaines régions du cerveau. Il existe au moins 11 gènes différents qui codent des sous-unités α et qui présentent une forte homologie entre eux

et sont exprimés dans le cœur. Les canaux sodiques cardiaques sont différents de ceux du cerveau et du muscle squelettique par leur sensibilité faible à la Tétrotoxine (TTX).

Une étude très récente a montré la présence de canaux sodiques sensibles à la TTX, surtout dans le cerveau, mais aussi dans le nœud sinusal de la souris et du lapin, et leur absence dans les myocytes auriculaires et ventriculaires (tableau 1).

Des souris invalidées pour le gène *Scn5a* ont été développées (Papadatos GA et al., 2002). Les souris homozygotes (*Scn5a*^{-/-}) meurent in utero et présentent des anomalies sévères de la morphogénèse ventriculaire, tandis que les souris hétérozygotes (*Scn5a*^{+/-}) semblent normales mais elles présentent une réduction de 50% de la conduction en Sodium et des troubles de conduction auriculo-ventriculaire, intraventriculaire, intramyocardique et des tachycardies ventriculaires.

Ces résultats montrent la réduction de l'activité du canal sodique aboutissant à la réduction de la conduction avec des phénotypes cliniques diverses donnant ainsi un modèle pour l'analyse détaillée de la pathophysiologie de l'arythmie cardiaque.

Des mutations dans le gène *SCN5A* sont responsables du syndrome du QT long de type III, d'une forme de fibrillation ventriculaire idiopathique (le syndrome de Brugada) et de blocs de conduction isolés (Wang Q. et al., 1995, Chen Q. et al., 1998, Schott et al., 1999, Grant A.O. 2001).

Tableau 1 : Les canaux sodiques dans le nœud sinusal chez les animaux étudiés. Les canaux sodiques sensibles à la Tétrotoxine sont principalement présents dans le cerveau.

Canaux sodiques	Nœud sinusal	Animal	Référence
Na _v 1.5 α (TTX insensible)	absent	Souris adulte	Maier S.K.G. et al., 2003
Na _v 1.1α, (β1→β4) (sensible à la TTX)	+	Souris, rat	Maier S.K.G. et al., 2003
Na _v 1.1α, (β1→β4) (sensible à la TTX)	+	Lapin nouveau né	Baruscotti M et al., 1997
Na _v 1.3α, (β1→β4) (sensible à la TTX)	+	Souris	Maier S.K.G. et al., 2003

II.4.1.2. Les canaux calciques cardiaques

Toutes les cellules cardiaques contiennent au moins cinq types de canaux calciques : trois canaux sont exprimés à la surface de la membrane cellulaire (les canaux calciques de type L et T), ainsi que des canaux responsables d'un courant calcique atypique ($I_{Ca, TTX}$) et deux canaux sont exprimés dans des membranes intracellulaires (le canal de libération de calcium du reticulum sarcoplasmique ou récepteur de la ryanodine (RyR) et le récepteur IP₃) (figure 3) (Shorofsky S.R. et Balke C.W. 2001).

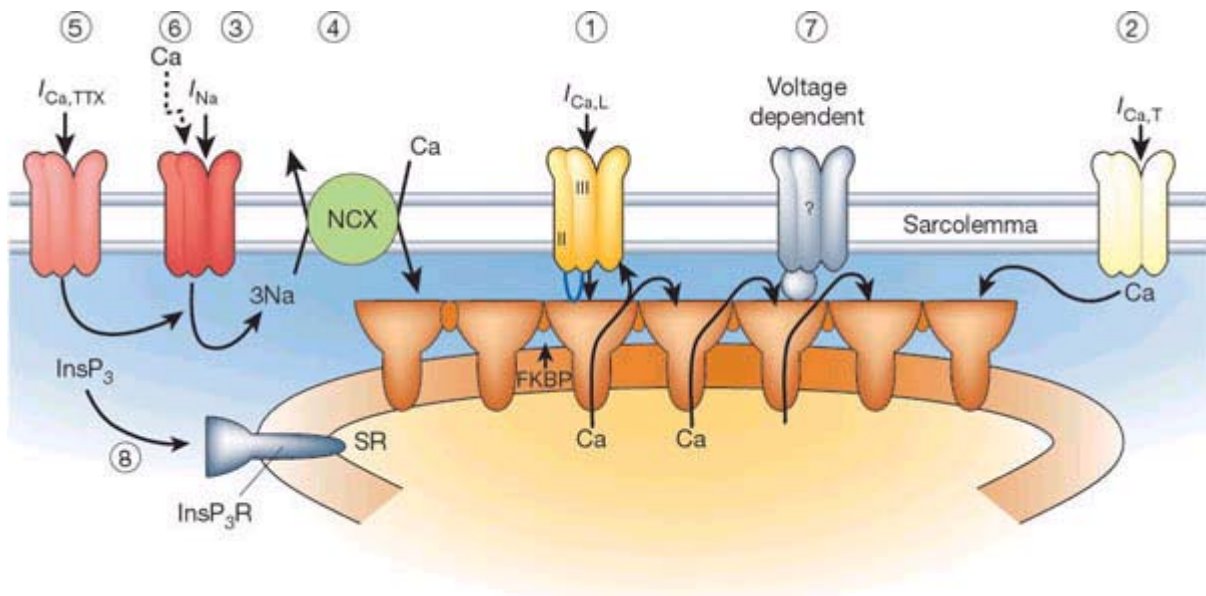


Figure 3 : Les principaux canaux calciques cardiaques (Bers D. M. 2002).

II.4.1.2.1. Les canaux calciques de type L

Ces canaux contribuent au maintien de la dépolarisation membranaire pendant le plateau du potentiel d'action et déclenchent le couplage excitation-contraction. L'entrée des ions Ca^{2+} déclenche une libération massive du Ca^{2+} stocké dans le reticulum sarcoplasmique des myocytes qui provoque l'activation des protéines contractiles. Ils participent aussi à l'automatisme dans les nœuds sinusal et auriculo-ventriculaire ainsi qu'à la conduction à travers le nœud auriculo-ventriculaire (AVN).

Les canaux calciques de type L sont constitués de plusieurs sous-unités : La sous-unité $\alpha 1$ qui forme le pore, et trois sous-unités $\alpha 2$, β et δ qui sont des protéines régulatrices (Soldatov N.M. 1994). Huit isoformes $\alpha 1$ ont été identifiées, codées par des gènes différents. Dans le cœur, la sous-unité $\alpha 1C$ serait l'isoforme la plus abondante et est codée par le gène *CACNA1C* localisé en 12p13.3.

II.4.1.2.2. Les canaux calciques de type T

Ils sont surtout distribués dans l'oreillette, le nœud sinusal, le nœud auriculo-ventriculaire et le tissu conducteur du système His-Purkinje. Ils sont impliqués dans l'automatisme cardiaque et interviendraient dans la phase tardive de dépolarisation diastolique lente du potentiel d'action sinusal.

Deux canaux de type T, de structures moléculaires différentes, ont été clonés dans le cœur : les sous-unités formant le pore $\alpha 1G$ et $\alpha 1H$, localisées en 17q22 et 16p13.3 respectivement. La sous-unité $\alpha 1H$ y serait majoritaire.

II.4.1.2.3. Les canaux calciques sensible à la tétrodotoxine

Ces canaux sont responsables d'un courant calcique entrant, fonctionnellement distinct des autres courants calciques. Ils sont perméables à la fois au calcium et au sodium, et sont bloqués par la Tétrodotoxine (TTX).

II.4.1.3. Le canaux potassiques cardiaques

Les courants potassiques cardiaques peuvent être classés en deux grandes catégories : les courants potassiques dépendants du potentiel et les courants potassiques rectifiant entrant. Les premiers jouent un rôle essentiel dans le potentiel d'action, alors que les seconds sont essentiellement responsables du potentiel de repos membranaire.

II.4.1.3.1. Les canaux potassiques dépendants du potentiel

Les canaux potassiques dépendant du potentiel jouent un rôle essentiel dans la modulation de l'amplitude et la durée des différentes phases du potentiel d'action cardiaque.

Quatre sous-familles de canaux dépendants du potentiel (Kv) ont été identifiées : *Shaker* (Kv1), *shab* (Kv2), *Shaw* (Kv3) et *shal* (Kv4). Chaque sous-famille comporte de nombreuses sous-unités α codées par des gènes différents (Attali B. et al., 1993, Deal K.K. et al., 1996). Chaque sous-unité α est formée de six segments transmembranaires. Ces sous-unités s'associent en tétramère pour former un canal ionique.

Deux autres sous-familles de canaux potassiques activés par le potentiel comprennent les canaux potassiques HERG (Human Ether-a-go-go-Related Gene) et KVLQT1, respectivement codés par les gènes *KCNH2* et *KCNQ1* et sont impliqués dans le syndrome de QT long.

Certaines sous-unités accessoires, telles que minK et MiRP1, sont des protéines à un seul segment transmembranaire, pouvant s'associer aux sous-unités α : minK s'associe au canal potassique KVLQT1 (Barhanin J., et al., 1996, Sanguinetti M.C. et al., 1996). La protéine *minK* est exprimée préférentiellement dans le tissu de conduction du cœur de souris embryonnaire (Kupersmidt S. et al.

1998). La protéine MiRP1 s'associerait au canal potassique HERG (Abbott G.W. et al., 1999, Tristani-Firouzi M. et al., 2001).

D'autres sous-unités accessoires des canaux Kv ont été clonées (Deal K.K. et al., 1996). Les sous-unités β sont des protéines cytosoliques qui interagissent avec les domaines intracellulaires des sous-unités Kv, dont trois sous-unités Kv β (Kv β 1, Kv β 2 et Kv β 3) qui s'associent aux sous-unités α de la famille Kv1.x. (Tristani-Firouzi M. et al., 2001).

Brahmajothi M et coll. (1996) ont étudiés l'abondance et la distribution des canaux potassiques dans les myocytes cardiaques chez le furet, incluant aussi le nœud sinusal, les myocytes et les cellules du septum auriculaires et ventriculaires (tableau 2). Ils ont démontré que tous les canaux potassiques sont exprimés dans le nœud sinusal, les canaux potassiques KV1.5, KV4.1, KV3.1, KV3.3, KV1.1, KV1.3, KV6.1 et minK sont plus abondants dans le nœud sinusal que dans les autres myocytes. Tandis que IRK était faible dans le nœud sinusal.

Les canaux HCN (*Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated ou Hyperpolarization-activated cationic currents* (I_h))

Les canaux HCN appartiennent à la superfamille de canaux potassiques dépendants du potentiel et sont caractérisés par une cinétique d'activation lente durant l'hyperpolarization. Ils sont perméables aux ions K^+ et Na^+ et modulés par une liaison directe aux AMPc intracellulaires qui porte l'activation à des valeurs plus positives. En plus du maintien du potentiel du repos, I_h a été impliqué dans la genèse de rythme cardiaque et neuronal.. Quatre gènes codant les canaux HCN ont été identifiés, *HCN1* (5p13-p14), *HCN2* (19p13.3), *HCN3* (1q21) et *HCN4* (15q24-q25). Ce sont des canaux à 6 passages transmembranaires, la partie C-terminale contient un domaine de liaison aux nucléotides cycliques. Les 4 canaux sont présents dans le cerveau, tandis que les canaux HCN2 et HCN4 sont prédominants dans le cœur (Ludwig A et al., 1999, Santoro et al., 2000). Les études d'expression de HCN, chez le rat et le lapin, ont montré que le canal HCN4 est prédominant dans le nœud sinusal (Shi W. et al., 1999, Ishii T.M. et al., 1999, Moosmang et al., 2001), suivi du HCN1 puis du HCN2. Ces canaux HCN sont présents dans les myocytes ventriculaires et auriculaires (HCN2 est prédominant) chez

l'homme et la souris. Mais aucune étude n'a pas été faite concernant la présence de ces canaux dans le nœud sinusal chez l'homme.

Très récemment, Ludwig A et coll. (2003) ont développé des souris invalidées pour le gène HCN2. Ces souris souffrent de dysfonction sinusale, d'arythmie cardiaque sinusale et d'une réduction du courant sinusal HCN .

Une mutation dans le gène HCN4 a été identifiée chez un patient atteint de dysfonction sinusale, il s'agit d'une délétion à l'état hétérozygote dans l'exon 5 de ce gène (1631delC) (Schulze-Bahr E. et al., 2003)

Tableau 2 : Les gènes codants les canaux potassiques, et leur localisation dans le génome humain, abondance et distribution des canaux potassiques dans le nœud sinusal chez le furet (Brahmajothi M. et al., 1996). KV1.5 était également étudié chez le porc (Dobrzynski H et al., 2000) . +++ : présence très importante et plus élevée que dans les myocytes auriculaires et ventriculaires ; ++ : présence élevée, + : présence faible.

Gènes	Localisation sur le génome humain	Canaux potassiques	Nœud Sinusal
<i>KCNA1</i>	12p13	Kv1.1	+++
<i>KCNA2</i>	1p13	Kv1.2	++
<i>KCNA3</i>	1p13.3	Kv1.3	+++
<i>KCNA4</i>	11p14	Kv1.4	++
<i>KCNA5</i>	12p13	Kv1.5	+++
<i>KCNA6</i>	12p13	Kv1.6	++
<i>KCNB1</i>	20q13.2	Kv2.1	++
<i>KCNB2</i>	8q13.2	Kv2.2	++
<i>KCNC1</i>	11p15	Kv3.1	+++
<i>KCNC2</i>	12q14.1	Kv3.2	++
<i>KCNC3</i>	19q13.3	Kv3.3	+++
<i>KCNC4</i>	1p21	Kv3.4	++
<i>KCND1</i>	Xp11.3	Kv4.1	+++
<i>KCND2</i>	7q31	Kv4.2	++
<i>KCND3</i>	1p13.3	Kv4.3	++
<i>KCNF1</i>	2p25	Kv5.1	++
<i>KCNG1</i>	20q13	Kv6.1	+++
<i>KCNQ1</i>	11p15.5	KvLQT1	++
<i>KCNH2</i>	7q35	HERG	++
<i>KCNJ13, KCNJ15</i>	2q37, 21q22.2	GIRK	+
<i>KCNE1</i>	21q22	minK	+++

II.4.1.3.2. Le canaux potassiques rectifiants entrants

Il existe trois principaux courants rectifiants entrants régulant le potentiel de repos membranaire : I_{K1} , I_{KAch} et I_{KATP} . Sur le plan fonctionnel ces canaux sont caractérisés par une rectification entrante, c'est-à-dire qu'ils conduisent préférentiellement le potassium vers l'intérieur de la cellule pour des potentiels de membrane hyperpolarisants, et conduisent peu de potassium vers l'extérieur de la cellule même pour des potentiels très positifs. Ces canaux appartiennent à la famille Kir « inward rectifier ». Les sous-unités α de ces canaux ne comportent que deux segments transmembranaires. Elles s'assemblent en tétramère pour former des canaux fonctionnels et des associations hétéromultimériques seraient possibles même entre des familles différentes.

Le courant I_{K1} est un courant rectifiant entrant essentiellement responsable du maintien de potentiel de repos des myocytes ventriculaires et auriculaires. Ce courant proviendrait d'un canal formé de sous-unités de la famille Kir2.x.

Des mutations dans le gène *KCNJ12* (17p11.1), codant le canal kir2.1 chez l'homme, ont été identifiées chez des sujets atteints du syndrome d'Andersen, associant un syndrome du QT long à une paralysie périodique du muscle squelettique (Nakamura T.Y. et al., 1998, Tristani-Firouzi M. et al., 2001).

Le courant I_{KAch} proviendrait d'un canal potassique hétéromultimérique formé des sous-unités Kir3.1 (GIRK1) et Kir 3.4 (GIRK4), codées par les gènes *KCNJ13* (2q37) et *KCNJ15* (21q22.2) respectivement. Il est prédominant dans les cellules du nœud sinusal et des oreillettes par rapport aux ventricules.

Des mutations dans des canaux potassiques et sodiques sont responsables de trouble du rythme cardiaque (tableau 3)

Tableau 3 : Les principaux canaux ioniques et autres protéines responsables de troubles de rythmes cardiaques.

Gènes	Localisation	Canaux ou protéines	phénotype	Référence
<i>SCN5A</i>	3p21-p24	SCN5A SS α	Bloc de conduction isolé QT long de type III Syndrome de Brugada	Schott et al., 1999 Wang Q. et al., 1995 Chen Q. et al., 1998
<i>KCNH2</i>	7q35-q36	HERG	QT long type II	Curran ME et al., 1995
<i>KCNQ1</i>	11p15.5	KVLQT1	Q long type I	Wang Q. et al., 1996
<i>KCNE1</i>	21q22	minK	QT long type V	Splawski I et al., 1997
<i>KCNE2</i>	21q22	MiRP1	QT long type VI	Abbott GW et al., 1999 Schulze-Bahr E. et al., 2001 et 2003
<i>HCN4</i>	15q23-q24.1	HCN4	Dysfonction sinusale	
<i>ANK2</i>	4q25-q27	Ankyrine B	QT long IV	Mohler P.J. et al., 2003

Il existe une grande variabilité des profils d'expression de ces différents canaux en fonction des espèces. Il semblerait que les modèles animaux les plus proches de l'homme soit le chien et le furet, alors que le lapin, le cobaye, la souris et le rat présenteraient des profils d'expression des différents courants ioniques assez éloignés de ceux de l'homme.

De plus, pour une même espèce, il existe des variations d'expression des différents courants potassiques dépendants du potentiel entre les diverses régions anatomiques du cœur. Ces profils d'expression différents contribuent aux variations régionales des potentiels d'action entre les myocytes des oreillettes, des ventricules et du système de conduction spécialisé.

II.4.2. Les canaux jonctionnels : La connexine

Les connexines sont des protéines intégrales de la membrane plasmique, qui s'associent en hexamères pour constituer des canaux transmembranaires appelés connexons. Deux connexons de deux cellules adjacentes s'associent dans l'espace intercellulaire pour constituer un canal jonctionnel hydrophile assurant une communication directe entre le cytoplasme des cellules adjacentes. Les canaux jonctionnels s'agrègent pour former des jonctions intercellulaires de type *gap* (figure 4).

Cinq connexines ont été identifiées dans le cœur : les connexines 37, 40, 43, 45 et 46 (Saffitz J.E. et al., 2000). Ces connexines sont respectivement codées par les gènes *Cx* localisés en 1p35.1, 11q21.1, 6q21-q23.2, 17q21.31 et 13q11-q12. Elles sont impliquées dans la conduction de l'activité électrique dans le myocyte cardiaque.

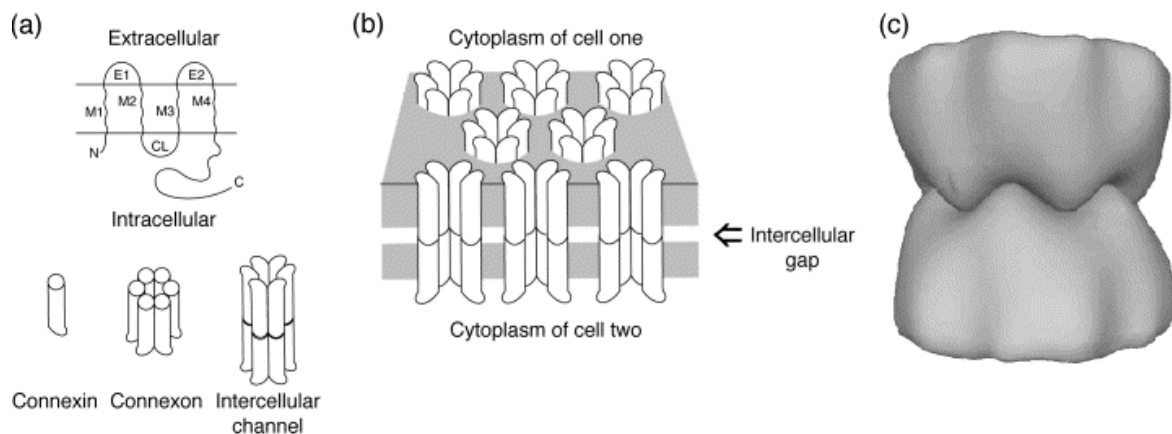


Figure 4 : (a) La topologie transmembranaire de la protéine connexine, 4 domaines transmembranaires (M1-M4), 1 domaine cytoplasmique (CL), 2 domaines extracellulaires (E1-E2), et les 2 extrémités N- et C-terminales sont intracellulaires. Les connexines s'associent en hexamère pour former les connexones, (b) qui se relie aux connexones de la cellule voisine, pour former des canaux jonctionnels de type « gap ». (c) modèle microscopique de l'interaction des connexones (Simon AM et la., 1998).

La connexine 43 est la connexine cardiaque la plus abondante. Chez l'homme et le bovin, elle est présente dans les myocytes cardiaques des oreillettes et des ventricules, et dans les myocytes conducteurs (Faisceau de His et réseau de Purkinje), mais elle est faiblement observée dans les nœuds sinusal et auriculoventriculaire (tableau 4) (Moorman Af et al., 1998, Davis LM et al., 1995).

La Cx 40 est faiblement présente dans les nœuds sinusal et auriculoventriculaire, et ne serait pas présente dans les myocytes conducteurs ventriculaires chez l'homme (Davis LM et al., 1995). On observe la connexine Cx40 dans le système de conduction ventriculaire du cœur adulte du rat, du bovin, du porc et du chien (Van Kempen MJA et al., 1995, Kwong KF et al., 1998, Kanter HL et al., 1993).

Chez le lapin, les connexines 40, 43 et 45 sont présentes dans le nœud sinusal, avec une prédominance de la connexine 45 (Coppen SR et al., 1999).

Chez le poulet, la Cx42 est l'homologue de la Cx40 est présente préférentiellement dans le système de conduction ventriculaire (Gourdie et al., 1993a). Les études de détection de connexines ont été faites par immunohistochimie en utilisant des anticorps monoclonaux.

La connexine 43 serait le principal déterminant de la conduction intercellulaire dans les ventricules et la connexine 40 serait le principal déterminant de la conduction dans les oreillettes, mais l'absence de ces deux connexines serait compensée par d'autres connexines cardiaques comme la connexine 45 (Thomas SA et al., 1998, Simon MA. Et al., 1998).

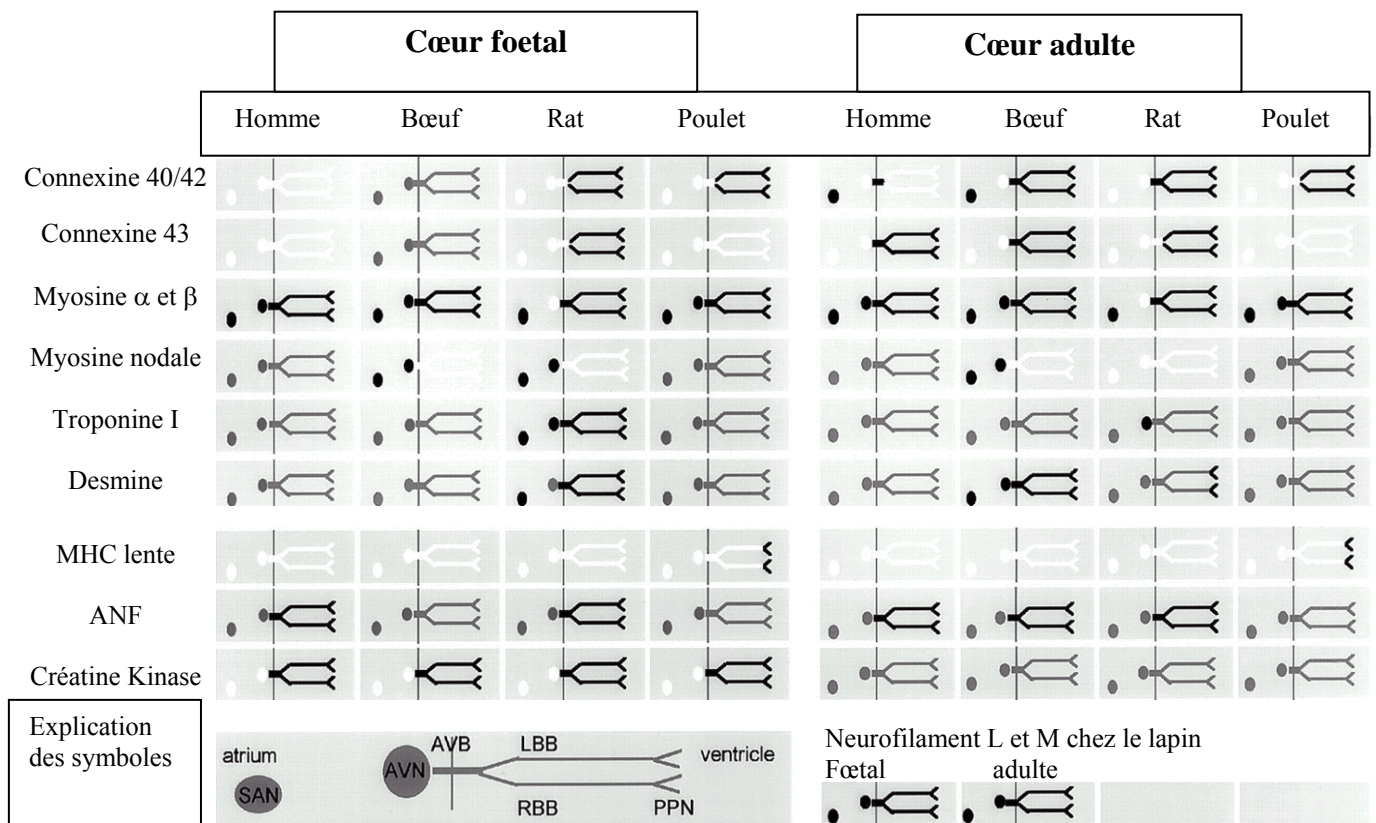


Tableau 4 : Profils d'expression dans le système de conduction cardiaque dans le cœur foetal et adulte, chez l'homme et les autres espèces les plus étudiées (Moorman AF et al., 1998).

L'explication des symboles est dans la partie inférieure de la figure. Le profil d'expression de ces gènes dans les myocytes auriculaires ou ventriculaires n'est pas présenté.

Explication des symboles

SAN : nœud sinusal, AVN : nœud auriculoventriculaire, AVB : Faisceau de His, LBB : Branche gauche, RBB : Branche droite, PPN : réseau de Purkinje, MHC : Chaîne lourde de myosine.

Blanc : pas d'expression, Noir : il y a une expression, Gris : expression non étudiée.

Des anomalies des connexines des myocytes cardiaques aboutissent à des anomalies électriques, induisant des arythmies cardiaques (souris et mouton) (van der Velden HM et al., 1998).

Les souris hétérozygotes Cx43^{+/-} survivent sans anomalie apparente, tandis que les souris invalidées Cx43^{-/-} meurent par asphyxie après la naissance et présentent des malformations cardiaques avec atrésie pulmonaire et d'autres malformations conotruncales (Réaume AG et al., 1995). Les souris hétérozygotes Cx43^{+/-} ont une vitesse de conduction réduite à la surface des ventricules, et cette réduction de la vitesse s'aggrave avec l'âge, avec un élargissement important des complexes QRS à l'ECG (Thomas SA et al., 1998).

Les souris invalidées hétérozygotes Cx40 présentent des anomalies de conduction au niveau du système His-Purkinje et au niveau des nœuds sinusal et auriculo-ventriculaire (Simon A M et al., 1998, Kirchhoff S et al., 1998).

II.4.3. Les protéines contractiles

les deux isoformes α et β de la chaîne lourde de myosine (MHC pour Myosin Heavy Chain, codé par le gène *MYH7* localisé en 14q11-q12) ont été observées dans le système de conduction cardiaque (nœuds sinusal et auriculoventriculaire et réseau de Purkinje) dans la plupart des espèces : l'homme, le bovin, le poulet et le rat (tableau 4) (Kuro-o M et al., 1986, de Groot IJM et al., 1988, Wessels A et al., 1991, Komuro I et al., 1987, Sartore S et al., 1981, Gorza L et al., 1986, Sartore S et al., 1978, Dechesne CA et al., 1987, de Groot IJM et al., 1989, Moorman AF et a., 1998). Chez le bovin, la chaîne lourde de myosine β est présente dans le nœud auriculo-ventriculaire et est plus élevée que le contenu du β dans le myocarde atriale (Komuro I et al., 1987).

Chez le bovin, un nouveau type de chaîne lourde de myosine : la myosine nodale, qui appartient aux isoformes des chaînes lourdes de myosine musculaire squelettique fœtale, a été décrite dans le nœud sinusal et auriculoventriculaire du cœur adulte (Gorza et al., 1986, Gorza et al., 1988b). Cette myosine nodale est exprimée depuis la 4^{ème} semaine de la vie embryonnaire du bovin dans le nœud sinusal primaire, tandis que son expression apparaît plus tard (12^{ème} semaine) dans le nœud auriculoventriculaire. Cette isoforme de myosine nodale n'a pas été observée ni dans les oreillettes, ni dans les ventricules ou le réseau de Purkinje. Elle est donc spécifique du nœud (Gorza et al., 1988b). L'étude a été faite par immunohistochimie avec des anticorps polyclonaux de la chaîne lourde de myosine α , β et muscle squelettique fœtal.

Chez le rat cette isoforme de myosine nodale a été localisée dans les nœuds à partir du 13^{ème} jour de développement embryonnaire (Gorza et al., 1988c), mais elle disparaissait après la naissance. La troponine I lente (TnI) est présente dans tout le système de conduction du rat durant la vie fœtale, cependant elle devient confinée au nœud auriculoventriculaire après la naissance (Gorza L et al., 1993, Schiaffino S et al., 1997). Il s'agit de la même troponine qui est présente dans les muscles squelettiques. Ce qui reflète la persistance du phénotype embryonnaire dans les cellules nodales puisque la TnI lente squelettique est en fait un marqueur embryonnaire plutôt qu'un marqueur du muscle squelettique.

Chez le poulet on observe spécifiquement dans le système de conduction ventriculaire par rapport aux myocytes auriculaires et ventriculaires, une myosine lente, qui s'accumule durant le développement, une chaîne lourde de myosine musculaire squelettique lente (sMYHC) (Sartore et al., 1978, Gonzalez-Sanchez et al., 1985), une chaîne lourde de myosine atriale (aMYHC) (de Groot et al., 1987), et une protéine liant la myosine H (MyBP-H) (Alyonycheva T et al., 1997) dans le réseau de Purkinje du cœur fœtal et adulte. Ces protéines sont présentes dans les muscles squelettiques mais ne le sont pas dans le muscle cardiaque. De plus on observe une présence faible des protéines comme la troponine I,

une protéine spécifique du muscle cardiaque (Gorza L et al., 1993), et la protéine C liant la myosine (cMyBP-C) (Gourdie et al., 1998, Takebayashi-Suzuki et al., 2000).

II.4.4. Les protéines cytosquelettiques

II.4.4.1. Desmine

La desmine est une protéine cytosquelettique de 53 kDa, codée par le gène *DES* localisé en 2q31, spécifique des muscles, qui appartient à la super-famille des filaments intermédiaires. Il existe cinq classes de filaments intermédiaires : les kératines (forment les tonofilaments des cellules épithéliales), les neurofilaments (présents dans les axones des neurones centraux et périphériques de vertébrés), la protéine fibrillaire gliale, la vimentine (rôle structural, elle maintient en place le noyau ou d'autres organites dans la cellule) et les filaments de desmine. La protéine desmine, qui est responsable de l'intégrité de structure et de fonction des myofibrilles du muscle squelettique et cardiaque, se trouve à la périphérie des disques Z. Elle forme un réseau reticulé transversal et perpendiculaire au grand axe de chaque fibre musculaire. Elle ancre et oriente tous les disques Z voisins, si bien que toutes les myofibrilles sont alignées et produit le motif strié des cellules, et elle attache les bandes Z des myofibrilles à la membrane plasmique et nucléaire.

La protéine desmine est le constituant majeur des filaments intermédiaires des fibres de Purkinje (Thornell LE et al., 1981). Virtanen et al. (1990), par immunohistochimie sur le cœur bovin, ont trouvé que les anticorps antidesmine réagissent avec les cellules de Purkinje, les cellules cardiaques et musculaires. La desmine phosphorylée est présente dans la totalité du système de conduction (nœuds, His, Branches et Purkinje) du cœur bovin adulte (Kjörell U et al., 1987), et elle constitue un marqueur important de ce système (Thornell et al., 1981, Kjörell U et al., 1987, Virtanen I et al., 1990, Forsgren S et al., 1980 et 1983).

Chez le rat, dans le cœur foetal, la protéine desmine est révélée dans la totalité du système de conduction sauf le nœud auriculoventriculaire. Dans le cœur adulte, elle est confinée dans le réseau de Purkinje.

Cette présence de desmine dans le système de conduction a permis de supposer qu'elle peut jouer un rôle dans la réduction de stress mécanique durant la systole et la diastole dans les myocytes du système de conduction (Thornell et al., 1981, Eriksson et al., 1979). Eriksson et collaborateurs (1979) ont montré qu'un niveau élevé de desmine dans le système de conduction est présent dans les fibres de Purkinje hautement différenciées chez les Ongulés alors qu'un faible niveau est présent dans les fibres de Purkinje pauvrement différenciées comme chez le rat et la souris. Aucune étude n'a été faite chez l'homme pour l'expression du gène desmine dans le système de conduction cardiaque (tableau 4).

L'analyse du promoteur du gène desmine a montré qu'un élément activateur du muscle squelettique fonctionne dans les cellules du système de conduction chez le poulet mais pas dans les myocytes cardiaques (Li Z et al., 1993).

La desmine est impliquée dans une myopathie squelettique associée à une cardiomyopathie dilatée et des troubles de conduction pouvant provoquer une mort subite (CMD1G) (Dalakas MC et al., 2000) et à des cardiomyopathies restrictives.

II.4.4.2. Neurofilament

Il existe trois types de neurofilaments chez les mammifères (70, 150 et 200 kDa), nommé respectivement L (léger), M (moyen) et H (lourd). Les neurofilaments appartiennent à la classe IV des filaments intermédiaires, ils contiennent un motif « *central coiled domain* » permettant l'assemblage des filaments. Ils sont présents dans les cellules neuronales, et ils constituent un marqueur excellent de ces dernières. Des études ont montré que les neurofilaments L et M sont des marqueurs pour le système de conduction entier (noeuds, His, branches, Purkinje) dans le cœur fœtal et adulte du lapin (Gorza et al 1989, Vitadello M et al., 1990, Gorza et al, 1988a,). Le neurofilament M est spécifique du tissu de conduction chez le lapin, puisqu'il n'est présent ni dans les myocytes auriculaires ni dans les myocytes ventriculaires. Ceci a été démontré par Hybridation in Situ et par immunohistochimie. Mais, la présence de ce neurofilament M n'a pas été confirmée ni chez l'homme ni chez le rat. Une

expression transitoire a été décrite dans les myocytes cardiaques du cœur fœtal chez le poulet (Benett et Dilullo, 1987).

II.4.5. Créatine Kinase

Dans le muscle cardiaque, il existe deux isoformes cytosoliques de créatine kinase. Ces isoformes existent sous forme d'homodimère et d'hétérodimère, connues comme MM, MB et BB (M pour muscle et B pour Brain : cerveau). Un niveau élevé de la créatine kinase M a été observé dans le système de conduction embryonnaire chez l'homme, le bovin, le rat et le poulet (Moorman AF et al., 1998, Forsgren S et al., 1983, Hasselbaink HDJ et al., 1990, Lamers WH et al., 1989).

II.4.6. Facteur Natriuretique Atrial (Atrial Natriuretic factor : ANF)

L'ANF est codé par le gène *NPPA* localisé en 1p36.21. Il appartient à la famille des peptides homologues de « natriuretic » qui est impliquée dans la régulation des fluides corporels et la balance des électrolytes. Dans le système de conduction humain, fœtal et adulte, l'ANF est localisé dans le faisceau de His et ses branches, mais pas dans les nœuds (Wharton J et al., 1988). Sa présence a été également observée dans le système de conduction ventriculaire du cœur adulte chez le bovin (Hansson M et al., 1993), le porc (Toshimori H et al., 1988), le lapin (Anand-Srivastava Mb et al., 1989) et le rat (Cantin M et al., 1989). Dans le cœur fœtal du poulet, l'ANF est absent des parties proximales des branches, mais il est présent dans les parties distales des branches (Houweling AC et al., 2002). Cependant, l'ANF n'est pas spécifique du tissu de conduction, puisqu'il est présent dans les myocytes cardiaques auriculaires et ventriculaires.

II.4.7. La calréticuline

La calréticuline est codée par le gène *CARL* localisé en 19p13.2. C'est une protéine chaperonne liant le Calcium, localisée dans la lumière du reticulum endoplasmique, ayant diverses fonctions dont la régulation de l'homéostasie calcique intracellulaire, la régulation de l'adhésion cellulaire, la modulation de l'expression de certains gènes et la conformation des protéines (Michalak M. et al., 1999). Son expression est très élevée dans le cœur fœtal au stade précoce, mais elle est diminuée après la naissance. Cette expression serait contrôlée par deux facteurs de transcription Nkx2.5 et COUP-TF1 (*Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor 1*), qui joueraient des rôles antagonistes. Csx/Nkx2.5 activerait l'expression de la calréticuline, alors que COUP-TF1 serait impliqué dans la répression post-natale (Guo L. et al., 2001).

L'invalidation de ce gène est létale durant l'embryogenèse (14.5 dpc chez la souris), à cause d'une diminution de la masse de cellules ventriculaires due à une augmentation de l'apoptose des myocytes cardiaques. Des souris transgéniques, surexprimant la calréticuline cardiaque, présentent des troubles de conduction auriculo-ventriculaires progressifs, une bradycardie sinusale avec une prolongation de la conduction auriculo-ventriculaire, suivie d'un bloc complet et d'une mort subite (Nakamura K. et al., 2001). Ces souris ont une dilatation des oreillettes et des ventricules avec une dégénérescence cellulaire, une forte diminution des connexines 40 et 43 et des courant calciques de type L ($I_{Ca,L}$), une surexpression d'*ANP* (*Atrial Natriuretic Peptide*) et de *BNP* (*Brain Natriuretic Peptide*). Elle est peut être impliquée dans le repliement de la connexine et le rassemblement des jonctions gap. La calréticuline jouerait un rôle important dans le développement cardiaque en intervenant dans la voie transcriptionnelle Ca^{2+} /calcineurine/NF-AT/GATA4 par modulation de la libération du Calcium du reticulum endoplasmique (Mesaali N. et al., 1999).

La diminution de l'expression de la calréticuline après la naissance est essentielle pour le développement du système de conduction cardiaque, surtout pour les nœuds sinusal et auriculoventriculaire.

Jusqu'à présent aucune étude n'a exploré les gènes spécifiquement exprimés dans le tissu de conduction de cœur adulte. En plus la plupart des données ont été obtenues chez le poulet, le lapin, le bovin et les petits rongeurs : Il sera donc difficile d'extrapoler ces résultats à l'homme.

D'autres travaux ont été menés pour mettre en évidence des gènes et des EST exprimés dans de cœur adulte ou en cours de développement (Hwang D.M., et al , 1997, Bortoluzzi et al., 2000, Dai et al., 1999, Fung et al.,1996, Liew et al., 1997, Tanaka et al., 1996, Ton et al., 2000). Ces travaux ont été réalisés sur des ARN prélevés des oreillettes et des ventricules, donc, à priori, pas à partir de tissu de conduction.

Des progrès majeurs pour la compréhension du système de conduction cardiaque pourront être faits grâce à plusieurs types de méthodologies comme la constitution de banques d'ADNc des tissus de conduction, et l'étude des souris transgéniques, qui montrent des variations régionales d'expression de transgènes.

II.5- Hypothèses des troubles de conduction

Les principales causes de ralentissement de la conduction cardiaque sont : - une diminution de l'excitabilité ou de couplage électrique intercellulaire, due à des anomalies des canaux ioniques cardiaques, - une diminution du couplage des jonctions communicantes, - une anomalie phénotypique du système de conduction, - des changements de l'architecture cellulaire cardiaque (Antzelevitch C. et al., 1991, Cabo C. et al., 1994, Shaw R.M. et Rudy Y. 1997, Rohr S . et al., 1998, Kucera J.P. et al., 1998).

III. Blocs de conduction

Les troubles du rythme cardiaque peuvent être secondaires à des anomalies de la genèse de l'impulsion (automatisme) ou de la propagation de l'impulsion (réentrées et troubles de conduction). A l'étage ventriculaire ils seront responsables d'extrasystoles, de tachycardies, de torsades de pointe et de fibrillations ventriculaires. Les maladies des troubles du rythme cardiaque sont, par exemple, le syndrome de QT Long, le syndrome de Brugada et les blocs de conduction cardiaque.

III.1. Les blocs de conduction

Les blocs de conduction sont dus à un ralentissement ou un arrêt de l'onde de dépolarisation au niveau des différentes structures du système de conduction, à la jonction entre le noeud sinusal et l'oreillette, dans les oreillettes, à la jonction auriculo-ventriculaire, dans le faisceau de His , ou encore au niveau du tissu de conduction ventriculaire.

III.1.1. Différents types de bloc de conduction

On différencie plusieurs types de blocs de conduction selon le siège et le degré de l'atteinte, mais les blocs auriculo-ventriculaire (BAV) représentent les formes les plus graves.

III.1.1.1. Le bloc de branche

Le bloc de branche droit ou gauche est dû, respectivement, à un ralentissement ou un arrêt de la conduction dans la branche droite ou dans la branche gauche du faisceau de His. Des blocs sur les branches de division de la branche gauche peuvent encore donner un hémibloc antérieur ou postérieur gauche.

De plus, le bloc peut être incomplet ou complet suivant qu'il s'agisse d'un ralentissement de la conduction ou d'un arrêt complet. La portion de cœur qui ne reçoit pas normalement l'onde de dépolarisation est tout de même atteinte par des voies détournées, mais avec un certain retard. Ce retard se traduit par une modification du tracé de l'électrocardiogramme (ECG). Le complexe QRS (qui correspond à la contraction des ventricules) est élargi en cas de bloc de branche suite à un retard d'activation du ventricule, et la durée de QRS permet de déterminer s'il s'agit d'un bloc de branche complet ou incomplet.

Le bloc de conduction d'une hémibranche ou d'une branche est asymptomatique, c'est-à-dire, qu'il ne se traduit par aucun signe ou symptôme. Il est découvert lorsqu'un ECG est pratiqué. Si ce trouble de conduction est secondaire à une affection cardiaque (infarctus myocardique), c'est l'affection cardiaque qui sera symptomatique.

III.1.1.2. Le bloc auriculoventriculaire (BAV)

Il existe 4 types de blocs BAV selon le type du blocage, le retard entre l'onde P (contraction de l'oreillette) et le complexe QRS (contraction des ventricules), permettant ainsi de déterminer le degré du bloc auriculo-ventriculaire. On distingue:

III.1.1.2.1. BAV asymptomatiques

III.1.1.2.1.a- Le BAV du 1^{er} degré : correspond à un allongement de la durée de l'espace PR ($>$ à 0.20 sec, mesuré du début de l'onde P jusqu'au début du complexe QRS) de l'électrocardiogramme (ECG) (figure 5).

III.1.1.2.1.b- Le BAV du 2^{ème} degré : il arrive que l'onde P ne soit pas suivie d'un complexe ventriculaire. On trouve deux sous-groupes.

III.1.1.2.1.b.1- BAV du 2^{ème} degré de type I : le bloc est progressif, l'allongement de la conduction auriculo-ventriculaire se poursuit jusqu'au blocage de l'activité auriculaire (allongement du PR jusqu'à l'onde P bloquée).

III.1.1.2.1.b.2- BAV du 2^{ème} degré type 2 : blocage intermittent survenant sur un fond de conduction auriculo-ventriculaire stable, normal ou prolongé (un passage de conduction sur 2, sur 3, voire sur 4).

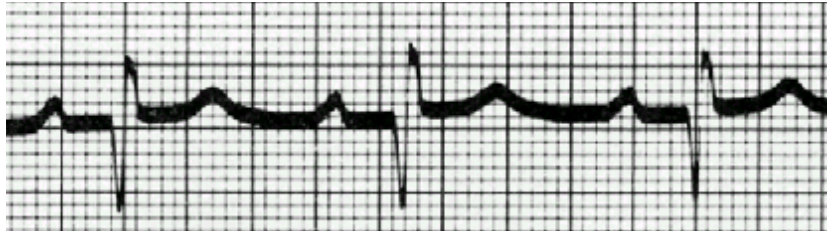


Figure 5 : BAV du 1^{er} degré

III.1.1.2.2. BAV symptomatique :

BAV du 3^{ème} degré : le bloc de conduction auriculo-ventriculaire complet se traduit par une fréquence de battement des ventricules qui est très lente car les ventricules qui sont complètement isolés des oreillettes ne sont plus atteints par les ondes de dépolarisation de celle-ci. Heureusement des cellules du faisceau de His et/ou de ses branches sont capables de générer des ondes de dépolarisation à une fréquence plus lente que le noeud sinusal. La fréquence ventriculaire tombe à 30 ou 40/mn (normale : 70/mn). Ce très grand ralentissement cardiaque se traduit par des sensations vertigineuses, un malaise ou une mort subite, et nécessite la pose d'un pace maker (figure 6).

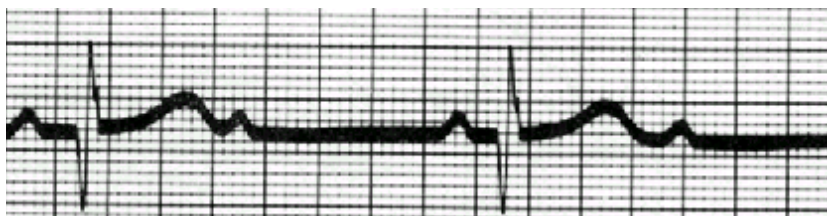


Figure 6: BAV du 3^{ème} degré

III.1.1.2.3. Etiologie des BAV

Les BAV peuvent être acquis ou héréditaires :

III.1.1.2.3.1- Les BAV acquis : d'évolution courte, ils peuvent résulter d'un infarctus du myocarde récent, ou chronique suite à des altérations cardiaques définitives. Il existe également des BAV d'origine idiopathique, en particulier la maladie d'Adams-Stokes, qui résultent généralement d'une dégénérescence fibreuse primitive frappant les voies de conduction.

Le BAV du nouveau-né (ou du fœtus) est le plus souvent secondaire à une maladie de système maternelle (lupus érythémateux disséminé). Ce bloc semble être lié au passage dans le sang fœtal d'anticorps maternels qui détruisent les voies de conduction du fœtus.

III.1.1.2.3.2- Les BAV héréditaires : ils peuvent être responsables de mort subite prénatale, infantile ou adulte. La proportion des troubles de conduction cardiaque d'origine familiale reste mal évaluée. En tenant compte de l'âge d'apparition des troubles (Carp C.C. 1957, Sarachek N.S. et Leonard J.J. 1972), on différencie :

- **Les BAV congénitaux du nourrisson** peuvent être isolés ou associés à des cardiopathies congénitales telles que les communications interauriculaires ou interventriculaires (Bizarro R.O. et al., 1970, Smith N.M. et Ho S.Y. 1994).

- **Les troubles de conduction familiaux d'évolution progressive** s'expriment dans la majorité des cas de manière retardée à l'âge adulte, mais sont susceptibles parfois de se révéler dès l'enfance.

III.2- Origine génétique des blocs de conduction isolés et historique

Les blocs de conduction ont une incidence élevée puisque 5% des enfants et 10% des adultes de plus de 65 ans présentent un bloc de branche droite. Dans la plupart des cas, l'étiologie reste inconnue.

Morquio, en 1901, a décrit une première famille présentant un syndrome associant des syncopes, bradycardie et des cas de mort subite. Osler, en 1903, décrivait une famille avec bradycardie et syncopes. Aylward, en 1923, décrit une bradycardie congénitale chez deux sœurs jumelles chez lesquelles une étude électrocardiographique a ensuite révélée un bloc auriculo-ventriculaire complet.

Deux études plus récentes ont montré une incidence accrue de ces troubles dans les familles de patients atteints de trouble de conduction (Morgans et al., 1974, Greenspahn et al., 1976). Morgans a retrouvé 10 malades au sein d'un groupe de 66 apparentés au 1^{er} degré à des patients porteurs d'un bloc auriculo-ventriculaire, incidence qu'il estime supérieure à celle attendue dans la population générale. Grenspahn a comparé l'incidence des troubles de conduction (bloc de branche) entre un groupe contrôle et un groupe de 134 parents au 1^{er} degré de 44 malades porteurs d'un bloc bifasciculaire. Il a diagnostiqué 10 individus atteints dans le groupe contrôle contre 24 dans le 2^{ème}, et conclut que les apparentés des individus avec un bloc de conduction avaient beaucoup plus souvent des blocs de conduction que la population contrôle, suggérant ainsi l'existence d'une tendance familiale de ces troubles. En effet, de nombreux cas de troubles de conduction familiaux ont été publiés (Gazes , 1965 , Lynch et al.,1973 ; Sarachek ,1972, ; Schaal ,1973, Stéphan 1979). Certains concernent des blocs de branches (Combrink et al. 1962 , Simonsen et al.1970, Schaal et al. 1973, Stéphan 1954, 1978, 1979), des dysfonctionnements du nœud sinusal (Spellberg 1971, Brink et al 1977, Sarachek et al 1972), des blocs auriculoventriculaires (Stéphan 1961, Gazes et al. 1965, Simonsen et al.,1970, Sarachek et al. ,1972, Brink et al 1977, Gambetta et al., 1973) et des troubles du rythme auriculaire (Gould et al. 1957, Allensworth et al., 1969, Williams et al. 1972).

III.3. Les blocs de conduction héréditaires associés

Les blocs de conduction cardiaque héréditaires progressifs peuvent être isolés ou associés à d'autres maladies cardiaques ou systémiques familiales. Parmi les maladies systémiques familiales présentant des degrés variables de blocs de conduction, il existe la dystrophie musculaire d'Emery Dreifuss (Emery et al., 1989), la dystrophie myotonique de Steinert, l'ataxie de Friedreich, les collagénoses systémiques et l'hémochromatose. Des anomalies de conduction auriculo-ventriculaire sont associées à des cardiomyopathies dilatées où on trouve des blocs de conduction progressifs de type BAV de 1^{er} et 2^{ème} degrés évoluant vers un bloc complet, associés à une dysfonction sinusale. On trouve également des troubles de conduction associés à des communications interauriculaires de type Ostium secundum, au syndrome de Holt-Oram, et à des cardiomyopathies arythmogènes de ventricule droit. Dans certains syndromes les études génétiques ont permis de localiser le gène impliqué, d'autres n'ont pas abouti car il s'agit parfois des maladies paucigéniques (tableau 5).

Tableau 5 : Les blocs de conduction associés à des cardiopathies. CMD : Cardiomyopathie dilatée, CIA : Communication interauriculaire, CARVD : Cardiomyopathie arrhythmogène du ventricule droit, OS : Ostium Seccundum

Nom	Symptômes	Localisation	Gène	Référence
CMD1A	CMD, Bradycardie sinusale, BAV1, arythmie ventriculaire	1p11-1q1	?	Kass S et al., 1994
CMD1E + ARVD5	CMD, Anomalies rythme sinusal, bloc de conduction	3p22-p25	?	Olson TM et al., 1996
CMD1F	CMD, Bloc de conduction, Mort subite, faiblesse musculaire	6q23	?	Messina DN et al., 1997
CMD+surdité CMD1J	CMD, Bloc de conduction , Surdité	6q23-q24	?	Schonberger J et al., 2000
CMD1G	CMD, dystrophie musculaire, bloc de conduction	2q31	Desmine	Li D et al., 1999
EMERY-DREIFUSS lié � l'X	CMD, bloc de conduction, blocage des coudes et chevilles, perte de force	Xq28	Emerine	Bione S et al., 1994
EMERY-DREIFUSS AD	BAV, CMD, Anomalie du sinus, arythmie ventriculaire	1q11-q23	Lamine A/C	Bonne G et al., 1999
CIA	CIA-OS, BAV	5q35	NKX2.5	Schott JJ et al., 1998
CIA	CIA-OS, BBDe	?	?	Stéphan E et al., 2000
Holt-Oram	CIA, anomalies cong�nitaless de la colonne radiale	12q24.1	TBX5	Basson CT et al., 1997
CARVD	CARVD4, BBG	2q32.1-q32.3	????	Rampazzo A et al., 1997

III.4. Les troubles de conduction héréditaires isolés

Les troubles de conduction les plus fréquents sont le bloc de branche droit. Ils peuvent être isolés ou associés à d'autres blocs, tels que les blocs auriculo-ventriculaires, les hémiblocs antérieurs ou postérieurs gauches ou d'autres anomalies mineures de l'ECG mais sans aucune malformation cardiaque.

III.4.1. Formes et aspects cliniques des blocs de conduction familiaux isolés

III.4.1.1. Electrocardiogramme

Il existe trois principaux types de blocs de conduction progressifs, en fonction de la localisation de l'atteinte du tissu de conduction et l'ECG.

A. PFHB I (Progressif Familial Heart Block type I) ou ICCD (Isolated Cardiac Conduction defects)

Un premier type de bloc de conduction, appelé PFHBI (Progressive Familial Heart Block type I), est caractérisé par une atteinte sélective des branches du faisceau de His. Les troubles de conduction sont principalement des blocs de branche droit, associés ou non à des hémiblocs antérieurs ou postérieurs gauches, évoluant vers un bloc complet. A l'ECG la durée de l'intervalle QRS est allongée alors que les durées des intervalles PR et QTc sont normaux (Combrinck J.M. et al., 1962, Simonsen E.E. et Madsen E.G. 1970, Schaal S.F. et al., 1973, Brink et al., 1977, Stephan E. 1978, Stephan E. et al., 1985, Stephan E. et al., 1997).

B. PFHB II (Progressif Familial Heart Block type II)

Un second type de troubles de conduction progressifs, appelé PFHB de type II (Brink et al., 1977), est caractérisé par une atteinte sélective du tissu de conduction au dessus de la bifurcation du tronc commun du faisceau de His. Les blocs de conduction sont de type blocs auriculoventriculaires de

différents degrés (1^{er}, 2^e, 3^e), évoluant plus ou moins vers un bloc complet. La durée de l'intervalle QRS est normale, alors que celle de l'intervalle PR est allongée. Une bradycardie sinusale est présente (Lenègre J. et al., 1970, Lynch H.T. et al., 1973, Lynch H.T. et al., 1975).

C. La maladie de Lenègre et Lev

Un troisième type de blocs de conduction progressifs serait caractérisé par une atteinte de l'ensemble du tissu de conduction. Tous les types de blocs de conduction peuvent être trouvés dans une même famille : des BAV de différents degrés et des troubles intraventriculaires (bloc de branche droit, gauche, hémibloc antérieur ou postérieur gauche), ainsi que des blocs du rythme sinusal (bradycardies) (Gazes P.C. et al., 1965, Sarachek N.S. et Leonard J.J. 1972, kennel A.J. 1981). La durée de l'onde P et des intervalles PR et QRS sont allongées. Ces blocs de conduction sont appelés aussi maladie de Lenègre ou de Lev (Lenègre J. et Moreau P.H.1963, Lev M. 1964, Lev M. et al., 1970). Ces blocs ne sont jamais congénitaux.

III.4.1.2. Etudes anatomopathologiques et histologiques

Il existerait une très bonne corrélation entre les aspects électriques et les lésions des voies de conduction intracardiaque trouvées à l'examen histologique (Lenègre J. et Moreau P.H. 1963).

Dans les troubles de conduction progressifs de type I, des études histologiques post-mortem ont montré que l'interruption de la conduction était due à la présence d'une dégénérescence fibreuse progressive des voies hissiennes, touchant le tronc commun, les parties proximales des deux branches, et les extrémités distales du faisceau de His, ce qui explique l'élargissement du complexe QRS (Husson G.S. et al., 1973, Tsagaris T.J. et al., 1967, kennel A.J. 1981, Stephan E. et al., 1978), les nœuds sinusal et auriculoventriculaire étaient normaux.

Dans les troubles de conduction de type II, le tronc commun et les branches du faisceau de His seraient normaux, mais le nœud auriculoventriculaire présenterait différents types d'anomalies : une travée fibreuse continue sur la moitié postérieure isolant le nœud auriculoventriculaire du myocarde auriculaire commun, ou une destruction du nœud de Tawara remplacé par du tissu fibro-adipeux et séparé du myocarde auriculaire par une nappe de tissu graisseux (Lenègre J et al., 1970, Waxmann M.B. et al., 1975). Waxman MB et al., (1975) avait décrit une famille présentant un BAV complet avec bradycardie sinusale, fibrillation atriale avec un complexe QRS normal. L'étude histologique a montré une fibrose importante du nœud sinusal, moins importante du nœud auriculoventriculaire et légère au niveau du faisceau de His, avec une interruption de la connection entre le nœud auriculoventriculaire et le faisceau de His.

La maladie de Lenègre serait caractérisée par une dégénérescence fibrotique diffuse du système de conduction, atteignant les parties distales des deux branches, alors que la maladie de Lev serait caractérisée par une fibrose du faisceau de His et des parties proximales des deux branches (Stephan E. et al., 1985).

III.4.1.3. Evolution et Hétérogénéité clinique

L'apparition des symptômes varie de la naissance à l'âge adulte, mais se développent en général à l'âge adulte (45 ans en moyenne) (Sarachek NS et al., 1972, Lynch et al., 1973, Stéphan E, 1978, 1979, Simonsen EE et al., 1970, Steenkamp WFJ 1972). L'évolution peut être progressive, avec un risque accru de mort subite (Evans et al., 1949, Tsagaris et al., 1967, Sarachek N.S. et al., 1972, Schaal et al., 1973, Lynch et al., 1973, Brink et al., 1977) Les blocs de conduction sont caractérisés par une altération progressive de la conduction principalement à travers le faisceau de His et ses branches (Stephan E., 1961, Lynch H.T. et al., 1973, Kennel A.J. et al., 1981, Barak M. et al., 1987). Un bloc complet peut aussi apparaître de façon précoce et brutale (Gazes P.C. et al., 1965, Sarachek N.S. et Leonard J.J. 1972, Godin J.F. et al., 1973, Lynch H.T. et al., 1975). De nombreuses publications ont confirmé l'existence au sein d'une même famille de troubles de conduction progressifs apparus dès

l'enfance et de troubles apparus à l'âge adulte (Schaal S.F. et al., 1973, Stéphan E., 1978, 1979). Environ 10 % des personnes atteintes ont une aggravation de leur trouble de conduction en 20 ans imposant la mise en place d'un stimulateur cardiaque (*pacemaker*). Il semble exister des disparités entre les familles où certaines présenteraient des formes moins sévères que d'autres (Stéphan E. et al., 1997).

III.5. Prise en charge et traitement

Il n'y a pas de traitement pour les blocs de branches ou hémibranches qui sont toujours asymptomatiques. Le bloc auriculo-ventriculaire du premier degré nécessite une recherche de la cause et une surveillance. Le bloc auriculo-ventriculaire du deuxième degré nécessite des examens complémentaires à l'ECG (enregistrement de 24 heures de l'ECG, éventuellement exploration électrophysiologique intracardiaque).

Le bloc auriculo-ventriculaire complet est une urgence. Il faut l'accélérer temporairement par la mise en place d'un *pacemaker*.

III.6. Diagnostic prénatal

Seule l'échocardiographie fœtale peut mettre en évidence un bloc auriculo-ventriculaire complet. Il est possible de voir que les oreillettes et les ventricules battent indépendamment les uns des autres. La fréquence lente des ventricules peut entraîner une diminution du débit cardiaque avec insuffisance cardiaque. Il est possible d'accélérer la fréquence cardiaque par la mise en place d'un système d'entraînement par une "pile".

III.7. Génétique moléculaire des troubles de conduction héréditaires progressifs isolés.

La transmission de ces troubles de conduction est autosomique dominante (Segall et al., 1961, Combrink et al., 1962, Spellberg et al., 1971, Sarachek et al., 1972, Waxman et al., 1975, Brink et al., 1977, Stephan et al., 1978, 1979), rarement autosomique récessive (Husson et al., 1973). Plus tard, plusieurs équipes ont identifié des grandes familles atteintes de troubles de conduction héréditaires progressifs et ont confirmé que le mode de transmission est autosomique dominante, avec une expressivité et une pénétrance variable.

III.7.1. Loci et gènes identifiés

Jusqu'à présent, il y aurait au moins trois loci, ou trois gènes différents qui seraient impliqués dans les troubles de conduction familiaux progressifs isolés. Le premier locus est celui qui est lié au chromosome 19q13.3 (gène inconnu), le deuxième est celui qui est lié au chromosome 3p21.1 et le gène muté responsable a été identifié il s'agit du gène *SCN5A*, qui est le seul gène connu à présent pour la maladie de Lenègre. Le troisième est celui qui est lié au chromosome 16q23-q24 (gène inconnu), et un quatrième locus pas encore localisé chez des familles atteintes de la maladie de Lenègre. Ces données confirment l'hétérogénéité génétique des troubles de conduction cardiaque familiaux isolés.

III.7.1.1. Localisation du PFHB I sur 19q13.3

Stephan E. avait décrit en 1978 une très grande famille libanaise (Liban Sud), fondée par un ancêtre polygame qui présentait une bradycardie, des syncopes à répétition et qui est décédé de mort subite à 60 ans. Il a engendré en cinq générations plus de 400 descendants, dont 338 ont pu être examinés par le professeur Stéphane entre 1974 et 1993. Pour chacun des individus le Pr. Stéphane a enregistré les ECG plusieurs fois au cours du suivi qui a duré environ 20 ans. Dans cette famille 43 sujets sont atteints d'un trouble de conduction cardiaque intraventriculaire. Cette famille présente une ségrégation

de troubles de conduction variables selon les individus et variables avec le temps : 1 cas de bloc trifasciculaire, 10 cas de bloc bifasciculaire (BBD avec HBAG), 10 cas de bloc bifasciculaire (BBD avec HBPG), 14 cas de bloc monofasciculaire (BBD), 1 cas de BBDi avec HBPG , 4 cas de HBAG et 3 cas de BAV y compris le premier ancêtre, ayant entraîné la mort subite (Stéphan E. 1979, De Meeus et al., 1995)(figure 7). La pénétrance est nettement différente entre les hommes (70%) et les femmes (50%) (Stéphan et al., 1979, 1997).

A partir de cette grande famille, un premier locus de troubles de conduction progressifs isolés a été identifié sur le chromosome 19q13.3 entre les marqueurs (exclus) D19S606 et D19S571 situés à 10 cM l'un de l'autre (De Meeus A. et al., 1995).

Cette même localisation a été rapportée par une équipe sud-africaine en étudiant 3 familles présentant un bloc auriculo-ventriculaire isolé d'évolution progressive, descendant d'un ancêtre commun portugais et d'une huguenote qui auraient émigré en Afrique du Sud en 1696. Dans cette forme familiale tous les sujets atteints ont une progression de la maladie vers un bloc complet qui nécessite la pose d'un pacemaker. Le locus morbide a été localisé à 10 cM télomérique par rapport au gène de la Dystrophie Myotonique et proche du gène de la kallikréine (Brink et al., 1995). Plus tard, l'intervalle a été réduit à 8 cM entre D19S112 et D19S246, puis à 4 cM entre D19S606 et D19S866 (Bardien-Kruger S et al., 2002).

Ces résultats montrent donc qu'un même gène localisé en 19q13.3 pourrait être impliqué dans ces familles, libanaises et sud-africaines, et pourrait donc avoir un rôle central dans le système de conduction cardiaque. Le premier gène étudié est le gène KCNA7 qui code pour un canal potassique Kv1.7, et il a été exclu comme étant responsable de bloc de conduction cardiaque lié au 19q13.3 (Bouvagnet P. communication personnelle, Bardien-Kruger S et al., 2002).

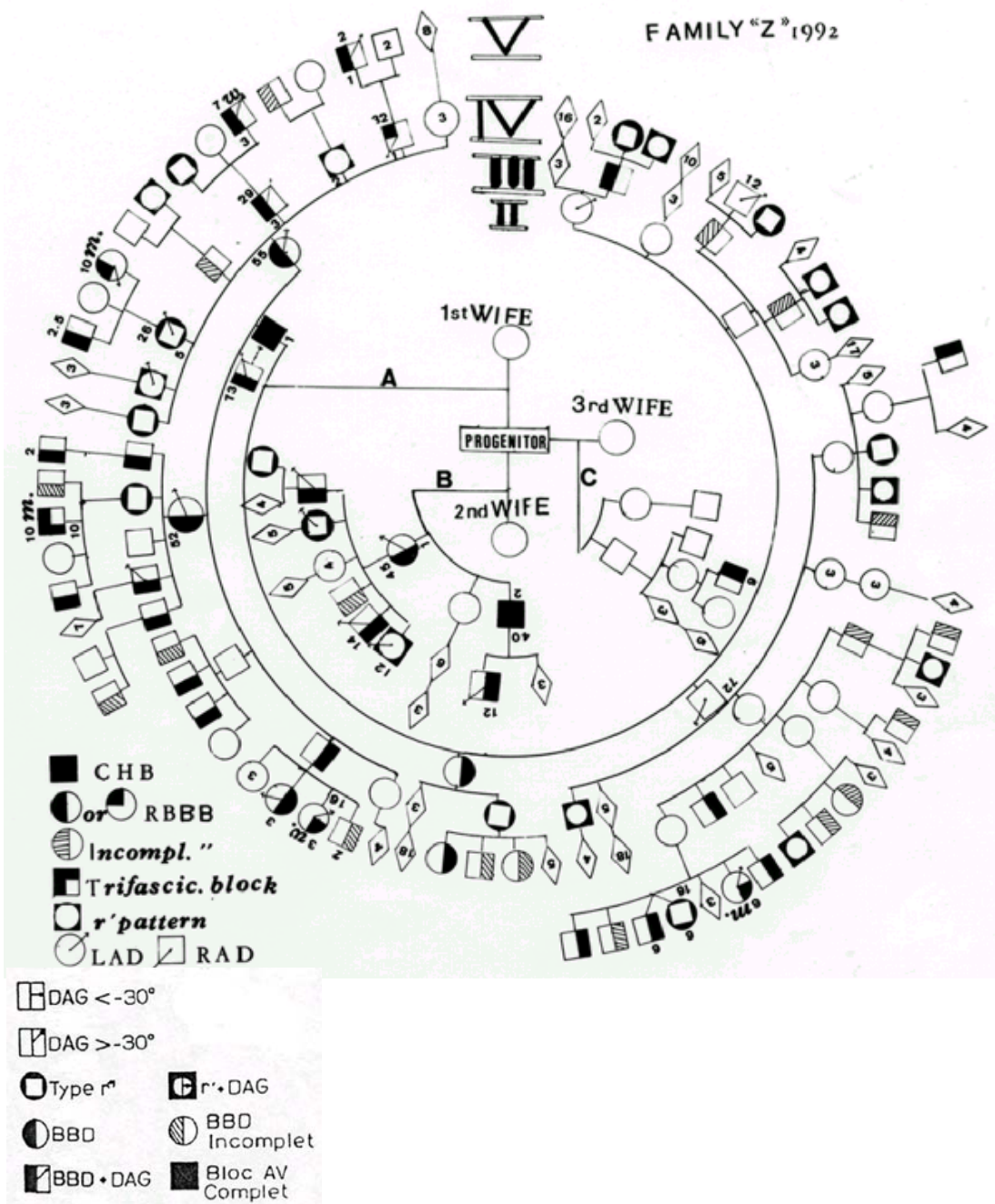


Figure 7 : La famille libanaise découverte par le Pr. E. Stéphan dans les années 70. Les symboles sont présentés en bas à gauche.

III.7.1.2. Localisation en 16q23.3-16q24

F. Kyndt, en 2002, décrivait une famille française comportant environ 150 membres, parmi lesquels 88 individus ont été examinés. Parmi ces derniers 12 individus sont atteints : 3 patients portaient des *pacemaker* en raison de syncopes ou de BAV complet, 5 patients présentaient un bloc de branche droit dont trois avaient aussi un hémibloc antérieur gauche, 2 patients présentaient un hémibloc antérieur gauche isolé, et deux patients avaient un intervalle PR allongé. Sept individus ont été considérés comme phénotype indéterminé.

L'analyse de liaison a permis de localiser la mutation en 16q23.3-16q24 à 19 cM d'intervalle, entre les marqueurs D16S518 et D16S402. Le gène n'a pas encore été identifié (Kyndt F. 2002).

III.7.1.3. Gène responsable de la maladie de Lenègre et Lev

Schott J.J. et al., en 1999, avait décrit une grande famille française (>150 membres), répartie sur quatre générations qui fut découverte grâce à un individu atteint de bloc de branche droit présentant des syncopes. Son frère présentait également un bloc de branche droit, et une sœur avait un BAV complet et des syncopes. Dans cette famille 15 sujets étaient atteints de blocs de conduction et présentaient différents aspects : 5 patients présentaient un bloc de branche droit, deux patients présentaient un bloc de branche gauche, 3 patients présentaient un hémibloc antérieur ou postérieur gauche, et huit patients avaient un intervalle PR prolongé (>210 ms). Quatre patients ont reçu un *pacemaker* en raison de syncopes et de BAV complets.

Dans cette famille, l'analyse de liaison a permis de localiser la mutation en 3p21.1 et le premier gène responsable de bloc de conduction isolée progressive a été identifié. Il s'agit du gène *SCN5A*.

III.7.1.4. Autre locus

En 2002, F. Kyndt décrivait également deux autres familles, atteintes de la maladie de Lenègre, avec des cas qui ont nécessité la pause de *pacemaker*. Les analyses de liaison génétiques ont permis d'exclure le locus de troubles de conduction isolés en 19q13.3, en 3p21.1 et 16q23-q24.

III.8. Pathologie moléculaire du gène *SCN5A* chez l'homme

Le premier gène identifié comme étant responsable de la maladie de Lenègre est donc *SCN5A* (Schott et al., 1999). *SCN5A* code la sous-unité α d'un canal sodique cardiaque. Des mutations dans le gène *SCN5A* sont responsables également du syndrome de QT long de type 3 et du syndrome de Brugada, à transmission autosomique dominante (Wang Q. et al., 1995, Chen Q. et al., 1998, Schott et al., 1999, Grant A.O. 2001). Dans les troubles de conduction et le syndrome de Brugada, il y aurait une perte de fonction du canal sodique, tandis que dans le syndrome de QT long il y aurait un gain de fonction du canal sodique (Bezzina CR et al., 2001).

III.8.1. Mutations « perte de fonction » : blocs de conduction isolés

Des mutations dans le gène *SCN5A* ont été identifiées chez des familles atteintes de troubles de conduction isolés progressifs d'apparition retardée. La plupart de ces mutations ont une expression autosomique dominante. Les principales mutations concernant les troubles de conduction sont présentées dans le tableau 6. Les études d'expression du canal muté dans des modèles cellulaires différents ont montré une altération de l'inactivation rapide du canal sodique et une réduction de la densité du courant I_{Na} qui provoqueraient une diminution de l'excitabilité et donc un ralentissement de la conduction.

Mutation	Position au niveau du canal	Effet sur le canal	Phénotype	Référence
Mutation d'épissage IVS22+2 T>C	Protéine tronquée à partir du S4 du DIII	Adressage normal, perte de fonction de l'allèle muté	Bloc de conduction	Schott JJ et al., 1999 Probst V et al., 2003
DelG5280	Protéine tronquée à partir de la boucle S5-S6 du DIV	ND	Bloc de conduction	Schott JJ et al., 1999
p .G298S	Entre S5-S6 Boucle P du DI Partie extracellulaire	ND	Bloc de conduction	Wang DW et al., 2002
p. T512I	Partie intracellulaire entre DI et DII	Augmentation de l'état d'inactivation intermédiaire du canal muté	Bloc de conduction	Wang DW et al., 2002
p.L461V	Partie intracellulaire entre DI et DII	ND	Bloc de conduction BAV 2 ^{ème} et 3 ^{ème} degré	Wang DW et al., 2002
p.C154G	Partie intracellulaire entre DI et DII	Anomalie de la sensibilité au potentiel Diminution du courant I _{Na}	Bloc de conduction	Tan HI et al., 2001
p. D1595N	S3 du DIV	Altération de l'inactivation rapide Diminution du courant I _{Na}	Bloc de conduction	Wang DW et al., 2002
p. S1382I	Entre S5-S6 du DIII Boucle P extracellulaire	ND	Bloc de conduction	Kyndt F 2002

Tableau 6 : Les principales mutations dans le gène SCN5A responsables de bloc de conduction cardiaque. Ces mutations sont hétérozygotes.

S : segment, D : Domaine, ND : non déterminé, p. C154G : changement au niveau de la protéine (Dunnen JT et al., 2000).

Par ailleurs des mutations des deux copies du gène *SCN5A* ont été décrites chez des patients atteints de trouble de conduction sévères. Bezzina et al (2003) ont décrit des mutations hétérozygotes composites (W156X) et (R225W) chez un enfant atteint de troubles de conduction sévère. Sa sœur est morte à cause de troubles de conduction grave, porteuse de ces deux mutations : W156X a été héritée du côté paternel et R225W du côté maternel, alors que les deux parents avaient apparemment des ECG normaux. L'étude d'expression de la mutation W156X dans des ovocytes de xénopes n'a pas produit un courant, tandis que la mutation R225W (qui neutralise la 3^{ème} Arginine du « voltage sensor ») était responsable d'une diminution importante du courant et du nombre de canaux sodiques fonctionnels. L'étude histologique du cœur de la fille décédée a montré des lésions de cardiomyopathie dilatée et des anomalies dégénératives sévères du système de conduction. Ces anomalies peuvent être secondaires aux anomalies du canal sodique et ont contribué à la sévérité de ce syndrome chez cette fille.

Toutes ces mutations altéreraient la fonction du canal sodique, mais aucune corrélation entre la position de ces mutations dans le canal et l'effet observé n'a encore été trouvée. Ces mutations donneraient des canaux sodiques non fonctionnels et donc la baisse du nombre de canaux sodiques fonctionnels serait à l'origine d'une diminution de la vitesse de propagation de l'influx cardiaque et provoquerait ces troubles de conduction.

III.8.2. Mutations « perte de fonction » : syndrome de Brugada

Le syndrome de Brugada est une fibrillation ventriculaire idiopathique avec une mort subite, caractérisé avant l'événement fatal par un sus-décalage du segment ST, un aspect de bloc de branche droit, un intervalle QT normal et parfois des troubles de conduction auriculo-ventriculaire (Chen Q et al., 1998). C'est une maladie autosomique dominante avec pénétrance incomplète qui affecte d'une manière prédominante les hommes.

Des mutations dans le gène *SCN5A* ont été identifiées dans des petites familles atteintes du syndrome de Brugada par étude de liaison (Chen Q et al., 1998), et de cas sporadiques (Bezzina CR et al., 2001).

Plusieurs types de mutations ont été décrites (figure 8). Les mutations identifiées dans ce syndrome diminuent la fonction du canal sodique cardiaque. Deux principaux mécanismes ont été décrits : certaines mutations génèrent des canaux non fonctionnels, alors que d'autres mutations accélèrent l'inactivation rapide et ralentissent la réactivation des canaux.

III.8.3. Mutations « gain de fonction » : le syndrome de QT Long de type 3

Les mutations du gène *SCN5A* associées au syndrome du QT Long de type 3 perturbent l'inactivation rapide du canal. Elles sont responsables d'une ouverture persistante du canal, générant ainsi un courant sodique persistant pendant la phase de plateau de potentiel d'action cardiaque, qui retarde la repolarisation des myocytes. Ceci se traduit par une prolongation de l'intervalle QT et prédispose les patients à des tachycardies ventriculaires polymorphes appelées torsades de pointes. Plusieurs mutations ont été identifiées (figure 8). En général les mutations associées au syndrome du QT Long de type 3 se trouvent près des domaines qui influencent l'inactivation rapide du canal. Les mécanismes moléculaires pour lesquels la partie C-terminale influence l'inactivation du canal restent obscurs.

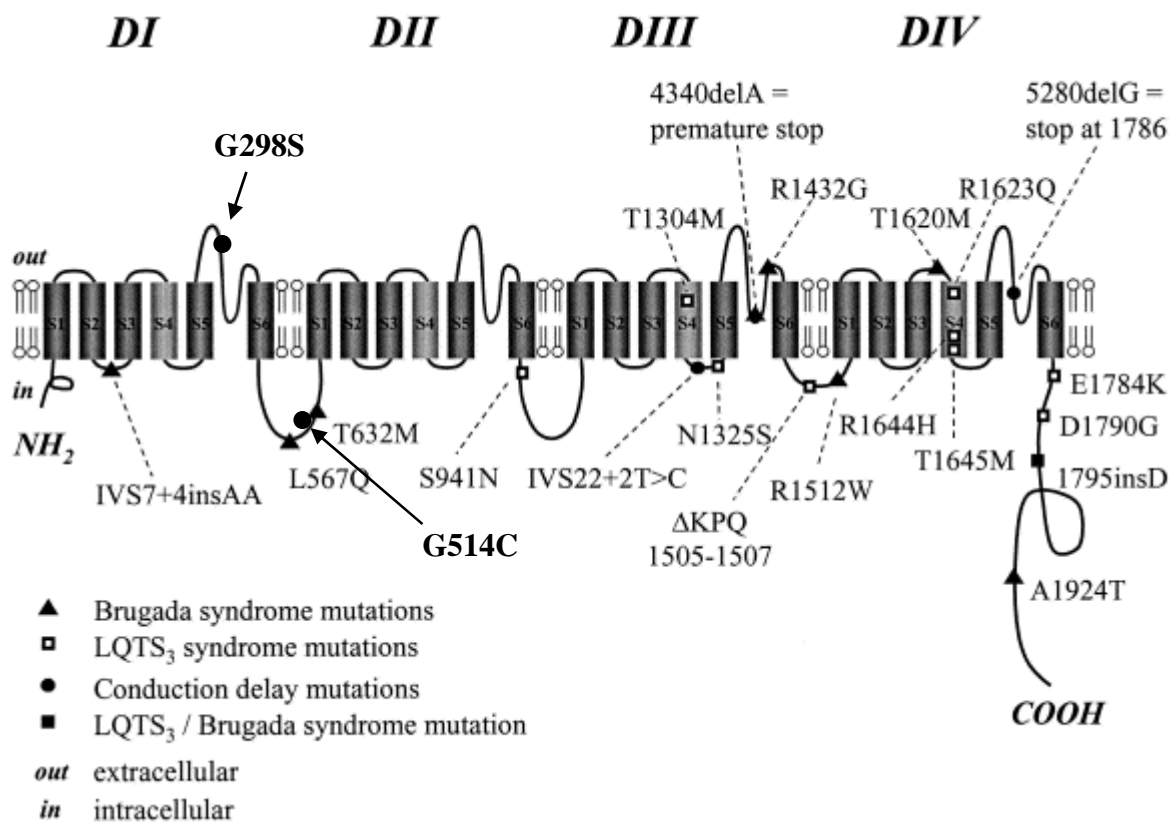


Figure 8 : Une représentation diagrammatique du canal sodique cardiaque humain et la localisation de principales mutations associées aux troubles de conduction cardiaque isolés, le syndrome de Brugada et le syndrome de QT long. Une même mutation peut résulter de deux phénotypes différents (page suivante)(une modification d'après Bezzina CR et al., 2001).

III.8.4. Mutations du gène *SCN5A* responsables de plusieurs syndromes différents

Plusieurs mutations sont spécifiques d'un syndrome donné, mais une même mutation au sein de la même famille peut être responsable de deux syndromes différents (bloc de conduction associé au Brugada, bloc de conduction associé au QT Long, Brugada associé au QT Long), on parle dans ce cas de «chevauchement de syndromes» (tableau 7). Comment peut-on expliquer la présence de deux phénotypes différents pour une même mutation ?

La mutation G1406R, entre les domaines DIII-S5 et DIII-S6 du canal *SCN5A*, est responsable à la fois de bloc de conduction isolé et du syndrome de Brugada dans deux branches de la même famille (Kyndt F. et al., 2001). L'étude de l'expression du canal sodique muté a montré la perte totale de la fonction du courant sodique, mais un adressage intracellulaire normal de la protéine. Dans cette famille, on observe que les patients atteints du syndrome de Brugada sont des hommes, alors que 6 sur 7 atteints de troubles de conduction isolés sont des femmes. En général, les hommes atteints du syndrome de Brugada sont plus nombreux que les femmes. Selon les auteurs les hormones sexuelles peuvent influencer l'électrophysiologie cardiaque et en particulier la repolarisation cardiaque qui pourrait être responsable de différences phénotypiques dans cette famille. La mutation *SCN5A* seule n'expliquerait pas cette différence phénotypique mais l'existence d'un gène modulateur, ségrégeant de façon apparemment simple dans les différentes branches de cette famille, pourrait expliquer cette différence de phénotype.

Une mutation d'insertion d'un acide aminé (A1795insD) dans la partie C-terminale du canal *SCN5A* dans une famille présentant à la fois le syndrome de Brugada et QT long a été identifiée. L'étude d'expression du canal portant cette mutation a montré une anomalie de l'inactivation rapide, aboutissant à un courant persistant pendant la phase de plateau du potentiel d'action, et une prolongation de la repolarisation cardiaque (Veldkamp MW et al., 2000, Baroudi G et al., 2000) qui correspond aux mécanismes du QTL3 (Bennett PB et al., 1995). En même temps cette mutation entraîne un ralentissement de la vitesse d'inactivation et une diminution de canaux sodiques

fonctionnels qui sont compatibles avec les anomalies associées au syndrome de Brugada (Dumaine R 1999, Wan X 2001). On trouve également une diminution fonctionnelle du canal muté qui pourrait être la cause principale du syndrome de Brugada (Baroudi G et al., 2001). Cependant, Bezzina C. et coll. (2001) propose que les mécanismes responsables du syndrome de Brugada restent à clarifier.

La mutation V1777M dans le domaine C-terminal de SCN5A est responsable du QT long 3 associé à un BAV fonctionnel du 2^{ème} degré de type 1. Le patient portant la mutation à l'état homozygote présente un phénotype sévère, tandis que les autres portant la mutation à l'état hétérozygote ont une forme très modérée de QTL3 (Lupoglazoff J.M. et al., 2001).

Ces résultats soulignent la complexité des phénotypes différents qui peuvent être associés aux mutations du gène SCN5A. Certaines mutations identifiées dans les familles atteintes de troubles de conduction et du syndrome de Brugada (exemple G1406R du canal SCN5A) entraînent une perte totale de fonction du canal muté. Les résultats des études électrophysiologiques ne permettent pas d'expliquer ces différences phénotypiques et il semble que d'autres facteurs environnementaux ou génétiques soient impliqués dans cette variabilité d'expression phénotypique.

Les techniques d'électrophysiologie et des simulations informatiques grâce à des modèles prédictifs ont permis de corréler les conséquences fonctionnelles des mutations trouvées aux différents phénotypes observés. Mais si les mécanismes associés au syndrome du QT long de type 3 semblent relativement simples, ceux qui sont associés au syndrome de Brugada ou aux troubles de conduction isolés ne sont pas encore éclaircis.

Mutation	Position au niveau du canal	Effet sur le canal	Phénotype	Référence
p. G1406R	Entre S5-S6 du DIII Boucle P du DIII extracellulaire	Adressage normal, perte de fonction du courant I _{Na}	Bloc de conduction + Syndrome de Brugada	Kyndt F. et al., 2001
p. S1382I (X)	Entre S5-S6 du DIII Boucle P du DIII extracellulaire	ND	Bloc de conduction + Syndrome de Brugada	Kyndt F. et al., 2001
DelG3816 (exon20)	Codon stop prématuré	ND	Bloc de conduction + Syndrome de Brugada	Kyndt F. et al., 2001
p. V1777M*	Domaine C-termianl	ND	QT long 3 + BAV 2:1	Lupoglazoff JM et al., 2001
p. A1795insD	Domaine C-termianl	Altération de l'inactivation rapide et un courant persistant, Diminution du courant I _{Na}	QT long + Syndrome de Brugada	Bezzina C et al., 2001

Tableau 7 : Les principales mutations dans le gène SCN5A et les phénotypes associés. Toutes ces mutations sont à transmission autosomique dominante. Sauf la mutation V1777M ; S : segment, D : Domaine, P : au niveau de la protéine. ND : non déterminé .

* : Cette mutation a été trouvée dans la même famille à l'état homozygote et hétérozygotes .

IV. Localisation et identification des gènes

IV.1. Principe

Plusieurs démarches peuvent permettre d'identifier le gène responsable d'une pathologie ou d'un phénotype donné lorsque la protéine impliquée n'est pas connue : la génétique inverse et l'étude de gènes candidats.

La génétique inverse ou clonage positionnel permet de localiser sur un chromosome, puis d'identifier le gène responsable d'une maladie génétique dont le défaut biochimique est inconnu. L'analyse de liaison génétique est basée sur la coségrégation d'un allèle d'un ou plusieurs des marqueurs étudiés avec le phénotype malade au sein d'une famille présentant la maladie d'une génération à l'autre. Les marqueurs utilisés sont des séquences polymorphes de l'ADN repartis sur l'ensemble du génome, et dont la localisation chromosomique est connue. Les marqueurs les plus fréquemment utilisés sont les marqueurs microsatellites (répétition d'une courte séquence d'ADN, dont le nombre de répétition est variable) pour lesquels des cartes denses ont été développées (Dib C. et al., 1996). Plus récemment des cartes denses de marqueurs bialléliques ou SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) sont en cours de développement. Les SNPs sont situés tous les 300 à 1000 pb, ils peuvent exister à l'intérieur des gènes et avoir une importance fonctionnelle (Wang D.G. et al., 1998), et éventuellement être utilisés pour délimiter un intervalle génétique dans le cas où les marqueurs microsatellites sont non informatifs.

Le succès de cette méthode dépend en premier lieu de l'informativité de la famille, de la proximité de ces marqueurs avec le gène, et de la densité des marqueurs dans la région du gène.

Le concept d'homozygotie par filiation (Identity By Descent) ou « homozygosity mapping », décrit par Lander et Botstein (1987), est spécialement adapté à l'étude de liaison génétique des maladies récessives dans les familles consanguines. Il s'agit de repérer la zone génomique homozygote (le même allèle) chez tous les individus atteints et issus d'un ancêtre commun. En effet, les individus atteints d'une maladie à transmission récessive et issus d'une union consanguine, ont hérité le même

allèle muté, de chacun de leurs parents. L'individu est dit « homozygote par consanguinité » et sera alors porteur de deux copies du gène muté, identique par descendance (IBD, Identity By Descent). Les gènes localisés par cette méthode sont très nombreux.

L'ensemble des données génotypiques est soumis à un traitement statistique (Méthode de Lod score) par analyse informatique afin de déterminer si la liaison génétique est significative ou simplement due au hasard. Cette analyse est basée sur une estimation de la fréquence de recombinaison entre le marqueur génétique et le gène délétère. Plus les deux loci sont éloignés, plus les chances de recombinaison au cours des méioses sont élevées. L'analyse de Lod Score (Logarithme de l'Odds) est calculé par le logiciel FASTLINK version 3.0P (Lathrop 1985).

Pour une valeur de taux de recombinaison Θ donnée, le Lod score Z est le logarithme décimal du rapport des probabilités suivantes :

$$Z(\Theta) = \log_{10} \frac{\text{probabilité que les 2 locus soient génétiquement liés}}{\text{probabilité que les 2 locus ne soient pas génétiquement liés}}$$

On considère un lod score supérieur à 3 comme une preuve de liaison significative. Pour déterminer la localisation chromosomique approximative du gène morbide et l'intervalle de liaison génétique, on estime la fréquence de recombinaison entre le gène et une série de marqueurs génétiques.

Une fois la localisation chromosomique établie, l'étape suivante consiste à identifier le gène responsable par l'approche du gène candidat.

Un gène candidat est un gène dont la fonction suggère qu'il pourrait être compatible avec le phénotype observé. Cette approche étudie la relation entre une variation de séquence d'ADN dans un gène candidat et un phénotype, en comparant les fréquences alléliques entre les sujets atteints et des contrôles sains.

La stratégie des gènes candidats peut être complémentaire de la génétique inverse ou utilisée d'emblée, si la fonction biochimique est suffisamment caractérisée pour permettre de cibler les recherches sur un nombre restreint de gènes, ou par homologie des phénotypes avec des modèles animaux de la maladie dont le gène est connu. Mais dans la plupart des cas cette approche intervient après la démonstration d'une liaison génétique avec une région chromosomique. Guilbot et Delague et al. (2001) après localisation de la maladie CMT4F sur le chromosome 19q13, ont pu identifier le gène Periaxin comme étant responsable de CMT4F en se basant sur un modèle animal, puisque les souris invalidées homozygotes periaxin *prx* ^{-/-} présentent une démyélinisation du système nerveux périphérique. Les similitudes frappantes observées entre les signes cliniques des patients atteints de CMT4F et les phénotypes de la souris invalidée du gène *Prx* ^{-/-}, et la synténie du chromosome 7 chez la souris et le chromosome 19 chez l'homme a permis de tester ce gène comme gène candidat.

D'autres équipes ont pu identifier un gène responsable d'une maladie génétique sans identifier une localisation au préalable comme par exemple le gène PAX2 responsable de syndrome de *renal Coloboma* (Sanyanusin P et al., 1996).

Un autre moyen de repérer des gènes candidats qui seraient exprimés spécifiquement dans le tissu concerné par la maladie est la méthode d'étude de l'expression différentielle des gènes par l'hybridation soustractive (RDA : *Representational Difference Analysis*) (voir la page suivante).

Une approche récente pour identifier un gène est la génomique intégrative. Mootha et al. en 2003 ont pu identifier le gène muté responsable du syndrome de Leigh type canadien français (LSFC : *Leigh Syndrome French-Canadian type*) par la méthode de la génomique intégrative, qui consiste à intégrer les informations globales concernant l'ADN, l'ARNm et la protéine. Après une localisation de la mutation sur le chromosome 2p16-21 à un intervalle de 2 Mb, ils ont utilisé 4 groupes de bases de données sur l'expression des ARN, et ils ont attribué un score sur tous les gènes humains présentant une similarité d'expression des ARN à des gènes mitochondriaux connus. Puis par une étude des protéines extraites des mitochondries, ils ont classé les gènes humains dont les produits protéiques

pouvaient interagir avec les mitochondries. Par association de toutes ces données ils ont repéré un seul gène dans cet intervalle qui, après identifications de mutations, est responsable de cette maladie.

IV.2. La RDA : *Representational Difference Analysis*

La RDA ou analyse des différences entre deux représentations est une méthode de soustraction et d'amplification permettant d'éliminer les fragments d'ADNc communs entre deux tissus comparés. Elle permet ainsi d'amplifier les ADNc spécifiques d'un tissu par rapport à un autre. Ces ADNc sont ensuite facilement identifiables par séquençage et par comparaison avec des banques de séquences.

Pour identifier les transcrits spécifiques du tissu de conduction nous avons choisi comme modèle animal le bovin : le tissu de conduction est visible à l'œil nu permettant ainsi son isolement (contrairement à l'être humain). De plus, il est possible d'avoir accès à ces tissus peu de temps après l'abattage de l'animal. Les deux populations des ARNm ont été extraites d'une part du tissu de conduction (on cherche les gènes spécifiques de ce tissu) et d'autre part du myocarde pour faire la soustraction.

IV.2.1. Principe et historique

La technique de la RDA est une adaptation de l'hybridation soustractive génomique. Elle a été mise au point en 1993 par Lisitsyn et al. dans le but de comparer deux génomes complexes, pour par exemple, la mise en évidence de réarrangements génétiques. Plus tard Hubank et Schatz (1994) adaptent cette technique à la comparaison de deux populations d'ADNc (RDA-ADNc) afin d'identifier les gènes dont l'expression est responsable des différences entre une cellule différenciée et une cellule souche, entre un phénotype mutant et un phénotype sauvage. Pour pouvoir enrichir l'ADN ou l'ADNc une

digestion avec une enzyme de restriction sera réalisée, suivie d'une ligation avec des adaptateurs et amplification par PCR pour préparer les "représentations". La répétition d'étapes de soustraction et d'enrichissement cinétique permettra de purifier des fragments de restriction présents dans une des deux populations de fragments d'ADN mais pas dans l'autre. Cette digestion permet également de réduire la complexité du génome (Lisitsyn et al., 1993), et permet d'avoir des fragments de longueur moyenne de 256 pb assurant ainsi son amplification par PCR (puisque la PCR de la RDA permet d'amplifier des fragments allant de 150 à 1000pb). La différence entre la RDA génomique et la RDA-ADNc vient du fait qu'une population d'ADNc dérive d'environ 15 000 gènes différents dans une cellule typique, représentant ainsi 1 à 2% du génome total. La méthode de RDA-ADNc est présentée par la figure 10 dans matériel et méthodes.

La technique de la RDA a permis l'identification des nouveaux gènes responsables des maladies génétiques tel que la dystrophine responsable de la dystrophie musculaire de Duchenne (Kunkel LM et al., 1985), et d'identifier un nouveau gène, qui code pour la Stéréociline exprimée exclusivement dans l'oreille interne, et responsable de la surdité localisé sur le chromosome 15q21-q22 (Verpy E et al., 2001).

Matériel et Méthodes

Matériel et Méthodes

I. Etude de liaison et gènes candidats

I.1. Familles étudiées

Nous effectuons la recherche des mutations sur 10 patients atteints de bloc de conduction cardiaque issus de cinq familles différentes (voir les arbres généalogiques dans le chapitre résultats et discussion) : deux familles libanaises, deux familles françaises et une famille allemande.

I.1.1. Famille libanaise L1

Généalogie et description clinique

Cette famille est déjà décrite (page 57)

- recherche de nouveaux individus : Lors de séjours au Liban, nous avons établi le contact avec la famille libanaise L1, afin de rechercher des nouveaux individus. Des ECG ont été enregistrés, et une collecte de sang a été réalisée. L'extraction d'ADN a été effectuée à l'Université Saint Joseph à Beyrouth.

I.2. Etape bio-informatique

L'étape bioinformatique consiste à rechercher dans les bases de données les séquences des gènes et des marqueurs polymorphes dans la région génomique à tester, grâce au projet de séquençage du génome humain (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Les séquences disponibles sont sous forme de « contigs », mais il existe encore des zones non séquencées (trous) et non ordonnées. Cette recherche est complétée par certains logiciels : BLAST (Basic Local Alignment Search Tool : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Pour les réactions de PCR, les amorces seront

choisies par le logiciel OSP (Oligo Search Program) dans les parties introniques encadrant les exons pour les différents gènes.

I.3. Marqueurs polymorphes

Les marqueurs polymorphes testés sur 19q13.3 sont les suivants : du côté centromériques à telomérique, D19S606 (AFMb030we1), D19S596 (AFMa133zh9), GYS1, D19S879 (AFMa283yh1), HRC intB, D19S604 (AFMb002ve1), D19S867 (AFMa115wg5), D19S866 (AFMa110yd1), D19S904 (AFMb040xc5), D19S246, KLK1, D19S601 et D19S571 (AFM347ze1). Les marqueurs AFM sont les marqueurs qui ont été identifiés par Généthon (Dib C et al., 1996)

I.4. Recherches de nouveaux marqueurs polymorphes non mentionnés dans les banques de données

La recherche de nouveaux marqueurs polymorphes dans l'intervalle 19q13.3, au niveau de marqueur D19S879 et HRCintB, a été faite pour tester l'hypothèse d'un effet fondateur afin d'éventuellement réduire l'intervalle génétique de la mutation. Les séquences génomiques contenant les marqueurs d'intérêt sont analysées avec le logiciel *RepeatMasker*. Ce dernier identifie toutes les séquences répétées du génome humain (Alu, LINE, MIR ou autre), afin d'avoir des amorces spécifiques du locus des séquences répétées simples ((CA)_n, (TC)_n, (CCA)_n, (TCC)_n, autres). Les amorces choisies seront utilisées pour amplifier l'ADN d'individus sains et non apparentés pour rechercher un polymorphisme (variation de la taille de produit d'amplification). Lorsqu'un polymorphisme est confirmé la paire d'amorce sera utilisée sur les ADN des patients des familles étudiées, pour tester si les allèles des deux familles libanaises, de la famille française et sud-africaine, sont les mêmes.

I.5. Détermination de la taille des allèles des marqueurs polymorphes microsatellites

Chaque microsatellite est amplifié par PCR à l'aide d'un couple d'amorce, dont une des deux est marquée par un fluorophore FAM, HEX ou TET. Il émet une fluorescence respectivement bleue, jaune, ou verte, selon le fluorophore utilisé. Les produits sont ensuite séparés selon leur taille par électrophorèse en gel polyacrylamide dénaturant (Long Ranger 5%-Urée) sur un séquenceur ABI PRISM 377 (Applied Biosystems). Les résultats des gels sont analysés à l'aide des logiciels GENESCAN 3.1 et GENOTYPER 2.1 (Applied Biosystems).

I.6. Recherche d'anomalie génique

I.6.1. SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*)

La SSCP ou conformation polymorphe des ADN simples brins est une technique permettant de détecter la présence de variations de séquences dans un produit PCR, grâce à la différence de mobilité des molécules d'ADN simple brin (Orita et al, 1989).

Après la mise au point des conditions des PCR pour chaque couple d'amorce, les produits de PCR seront testés par SSCP.

Après avoir été amplifiés les produits PCR sont dénaturés à 95°C. Les deux monobrans sont ensuite déposés sur un gel de polyacrylamide non dénaturant. Chaque monobrin, lors de la migration, va alors se replier sur lui-même, formant une sorte de « pelote » appelé conformère. Le repliement est fonction de la séquence du brin et de la température. Les molécules ayant chacune des conformations différentes présenteront une migration électrophorétique différente.

Ensuite l'ADN est révélé par coloration au nitrate d'argent et on observe pour un même échantillon différentes bandes correspondantes aux différentes conformations des monobrans. Des variations de

profils peuvent être visionnées en comparant les bandes obtenues pour différents échantillons à celles obtenues avec l'ADN témoin.

Pour chaque produit de PCR les conditions optimales de séparation sont recherchées. Les paramètres pouvant varier sont la température et le temps de migration ainsi que la concentration en acrylamide, et le rapport acrylamide : bisacrylamide.

Les quatre températures de migration testées pour chaque fragments de PCR sont : 7°C, 20°C, 30°C et 40°C. Les différentes concentrations d'acrylamide testées sont : 10%, 12% et 15%. Les différents rapports acrylamide : bisacrylamide sont : 19 :1, 29 :1 et 37,5 :1, avec ou sans glycérol.

La taille des fragments étudiés en SSCP ne doit pas dépasser environ 360 pb, sinon le taux de détection des variations de séquence chute. Les produits de PCR plus longs peuvent être digérés par une enzyme de restriction ayant un seul site de coupure et générant deux fragments de taille différente d'environ 80 à 100 pb.

Les produits montrant des anomalies de migration seront séquencés.

I.6.2. Séquençage

Les produits de PCR obtenus à partir d'ADN génomique ont été séquencés dans les deux sens selon la méthode de Sanger, avec le kit de séquençage fluorescent Big Dye Terminator Cycle sequencing Ready reaction kit (Applied Biosystems) sur un séquenceur ABI PRISM 377 (Applied Biosystems). Les résultats ont été analysés à l'aide des programmes Sequencing Analysis 3.3, Sequence Navigator 1.0.1 (Applied Biosystems), et le logiciel Acembly pour l'analyse des séquence.

I.6.3. Clonage

Afin de séquencer une partie de l'exon 1 du gène HRC (nommé : ex1P3), dont la taille est d'environ 1 kb, nous avons cloné ce fragment de PCR après digestion par l'enzyme de restriction *Bst*UI dans un plasmide. Dans un premier temps, nous avons utilisé le TOPO TA cloning® Kit Dual Promoter PCR®TOPO Vector (Invitrogen) (le principe en sera détaillé plus tard). Mais les essais de clonage n'ont pas réussi car l'addition d'un résidu A à l'extrémité 3' après digestion par *Bst*UI a été inefficace. Nous avons utilisé un autre vecteur : pBluescript II KS+ (figure 9).

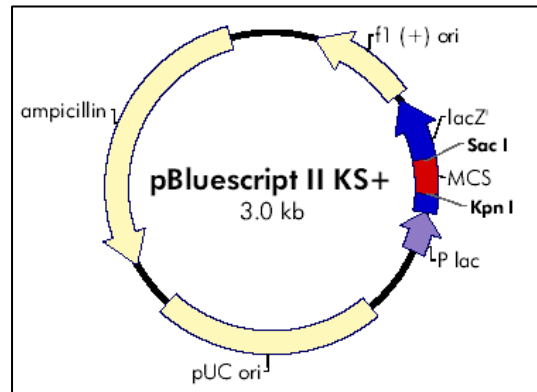


Figure 9 : pBluescript II KS+

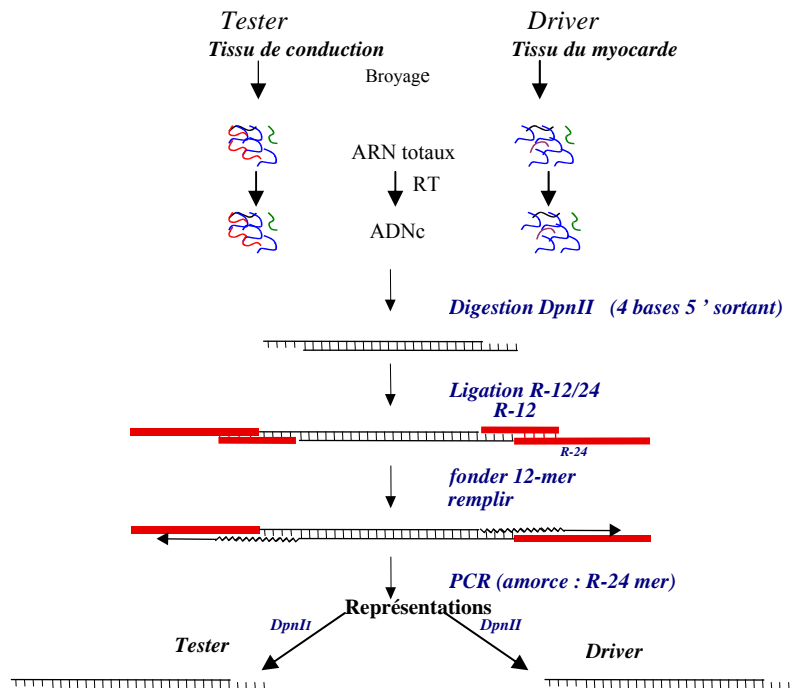
Ce plasmide est digéré par deux enzymes de restriction (*Bam*H1 et *Hinc*II), permettant d'une part de linéariser le plasmide et d'autre part de libérer un site *Bam*H1 5' sortant et un site *Hinc*II à bout franc pour permettre l'hybridation entre le plasmide et l'insert préparé ainsi.

Afin de cloner l'ex1P3, l'insert devrait contenir de séquence GATC correspondant au site de restriction de *Bam*H1, donc il sera amplifié à l'aide des amorces utilisées pour l'amplification classique de l'exon 1P3, mais contenant chacune un site de coupure par *Bam*H1 en 5'.

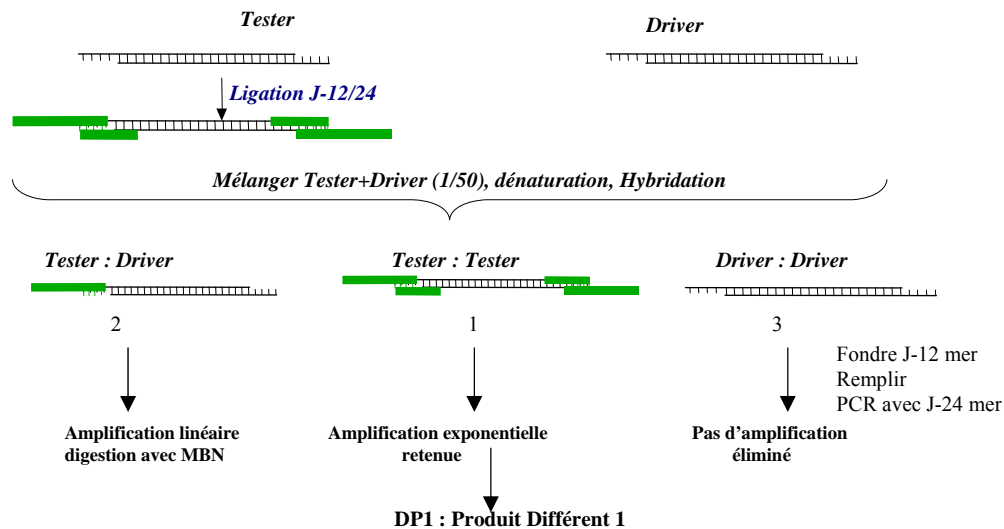
Le produit de PCR de l'exon 1 sera digéré par *Bst*UI qui coupe à bout franc et libère deux fragments (environ 400 et 600 pb possédant un site *Bam*H1). L'insert ainsi préparé est ligaturé (*T4 DNA ligase*) dans le pBluescript II KS+ ouvert avec *Bam*H1 et *Hinc*II.

II. RDA : Representational Difference Analysis

II.1. Principe



A : Obtention de la représentation à partir du tissu choisi. Ceci est réalisé en parallèle pour chacun des deux tissus. Les quantités d'ADNc sont trop petites pour pouvoir être manipulées. Il faut donc réaliser une amplification. Afin d'amplifier de manière équivalente toutes les espèces d'ADNc, une paire d'adaptateurs unique est liée à l'ensemble ds ADNc, en tirant profit du site DpnII. Une amorce unique permet ainsi l'amplification de tous les ADNc. On obtient de cette façon deux représentations : le tester et le driver.



B : Etapes d'hybridation soustractive et d'amplification sélective. Après une digestion avec DpnII pour les deux représentations, un nouvel adaptateur est lié au tester, ce qui le différencie du driver. Les deux représentations sont mélangées. Lors de l'hybridation, il y a une compétition entre driver et tester en ce qui concerne les séquences communes. Le driver étant utilisé en excès, la plupart des séquences du tester qui sont aussi dans le driver se retrouvent piégées sous la forme 2. La PCR amplifie uniquement les brins d'ADNc qui possèdent le J-24-mer. Ainsi, seules les molécules de type 1, spécifiques du tester, sont amplifiées de façon exponentielle. Le produit de PCR, DP1, est donc enrichi en ces séquences.



C : *Réitération des étapes de soustraction et d'amplification sélective. DP : Produit différent. A chaque itération, le ratio tester : driver est diminué, afin d'augmenter la stringence. Une quatrième itération peut être réalisée, avec un ratio de 1 :8000 000. Les produits de différence sont mis à migrer sur gel. Les bandes obtenues sont clonées, séquencées et identifiées par recherche d'homologie sur les bases de données.*

Figure 10 : *Les différentes étapes de la RDA. A : Obtention de la représentation à partir du tissu choisi. B : Etapes d'hybridation soustractive et d'amplification sélective. C : Réitération des étapes de soustraction et d'amplification sélective*

II.2. Obtention des tissus

Les tissus de conduction du myocarde de cœur de bovins ont été prélevés une heure après la mort de l'animal, à l'abattoir Corbas à Lyon, à partir de plusieurs cœurs. Les cœurs sont immédiatement disséqués pour prélever les tissus, puis les échantillons tissulaires sont introduits dans de l'azote liquide jusqu'à l'extraction des ARN totaux. Au total, 36 cœurs ont été disséqués au cours de cette étude.

II.3. Coupes Histologiques

Des coupes histologiques et des colorations ont été réalisées sur chaque tissu prélevé pour vérifier qu'il s'agit bien du tissu recherché. Les coupes ont été réalisées au service d'anatomo-pathologie de l'hôpital cardiologique de Lyon, et elles ont été analysées par un anatomo-pathologiste (Dr A.Tabib). La coloration des coupes était l'hématoxyline-phloxine-safran.

II.4. Oligonucléotides

les séquences des oligonucléotides pour la RDA sont les suivantes* :

R-24 : 5' -AGC ACT CTC CAG CCT CTC ACC GCA -3'

R-12 : 5'- *GAT* CTG CGG TGA-3'

J-24 : 5'- ACC GAC GTC GAC TAT CCA TGA ACA -3'

J-12 : 5'- *GAT* CTG TTC ATG -3'

N-Bgl-24 : 5'- AGG CAA CTG TGC TAT CCG AGG GAA-3'

N-Bgl-12 : *GAT* CTT CCC TCG-3'

Ces oligonucléotides sont purifiés en HPLC.

* : les bases en italiques sont les bases du site *DpnII*, et les bases soulignées sont les bases complémentaires entre les 12 et 24 mer.

II.5. Obtention de représentations de deux tissus

II.5.1. Extraction des ARN totaux de tissu de conduction et du myocarde

Les tissus ont été découpés en petits morceaux de 400 à 800 mg et broyés dans de l'azote liquide. L'extraction d'ARN totaux a été effectuée avec le « Trizol » (Invitrogen, Life Tech.) selon le protocole du fabricant. En bref, 1 ml de Trizol a été mélangé à 100 mg de tissu pendant 5 min, puis avec du chloroforme (200 µl pour 1 ml d'homogénat). Une agitation vigoureuse pendant 15 sec est réalisée, suivie d'une centrifugation à 12000 g pendant 15 min à 4°C, permettant de séparer l'homogénat en trois phases : la phase inférieure phénol-chloroforme rouge, l'interphase de couleur blanchâtre contenant les ADN et les protéines et la phase aqueuse supérieure contenant les ARNs. Ces ARN sont récupérés, précipités avec l'isopropanol (0.5 ml pour 1 ml du trizol), centrifugés à 12000 g pendant 10 min à 4°C, lavés avec l'éthanol à 75%, séchés à l'air libre et repris dans 100 µl d'eau sans RNase.

La concentration en ARN est mesurée au spectrophotomètre (1 unité de DO = 40 µg d'ARN simple brin/ml). La qualité est vérifiée sur un gel d'agarose dénaturant (formaldéhyde). Les ARN sont ensuite précipités par l'acétate d'ammonium (0,25 M final) et l'éthanol à 100% absolu (2,5 volumes) puis conservé à -70°C.

Les ADN génomiques pouvant contaminer les ARN doivent être éliminés par une digestion avec de la DNase (kit « DNA-free » Ambion). La qualité des ARN est à nouveau vérifiée sur gel et l'absence d'ADN génomique est confirmée par la PCR avec une paire d'amorce exonique située de part et d'autre d'un intron d'un gène de ménage comme l' α -Tubuline.

II.5.2. Purification des ARNm

Les ARNm sont purifiés à partir d'environ 600 µg d'ARN totaux, sur des colonnes poly-dT (Poly(A) Quick mRNA Isolation Kit, Stratagène). Le volume obtenu étant important (800 µl), les ARNm sont

précipités par ajout de 0,1 volume d'acétate d'ammonium 3 M, 2 ml d'éthanol absolu et 10 µl de glycogène (co-précipitant, 20 µg/µl, Roche) et sont congelés une nuit à -70°C.

II.5.3. Transcription inverse des ARNm de deux tissus

II.5.3.1. Synthèse du premier brin d'ADNc

Environ 4 à 5 µg d'ARNm de chacun des deux tissus (tissu de conduction et le myocarde) sont repris dans 12 µl d'eau. Pour chacun 8 µl sont utilisés pour la RT et les 4 µl restant sont utilisés comme témoin négatif. Ces solutions d'ARNm sont incubées avec 500 ng d'oligo dT (Promega) pendant 10 min à 70°C pour déplier les ARN totaux. Les oligo dT s'hybrident aux queues poly-A utilisées comme amorce pour la transcription inverse. Pour la synthèse du premier brin d'ADNc sont ajoutés sur glace : 4 µl du tampon *first strand buffer* (Invitrogen, Life Tech.), 1 µl de dNTP 20 mM (Genaxis), 2 µl de DTT 0,1 M (Dithiothreitol, anti-oxydant), 40 U de *RNasin* (Inhibiteur des RNases, Promega), 200 U de *Superscript II RT* (Invitrogen, Life Tech.) ou 1 µl d'eau pour les témoins négatifs de -RT dans un volume final de 20 µl. La solution obtenue est placée 1 h 20 min à 42°C (température optimale de la *Superscript II*) (figure 11).

II.5.3.2. Synthèse du deuxième brin d'ADNc de tissu de conduction et du myocarde

Pour la synthèse du deuxième brin sont ajoutés sur glace : 41 µl d'eau, 16 µl du tampon *second strand buffer* (Invitrogen, Life Tech.), 1,6 µl de dNTP 20 mM, 5 U d'*E coli DNA ligase* (Biolabs), 24 U d'*E coli DNA Polymerase* (Invitrogen, Life Tech.), 1 U d'*E coli RNase H* (Invitrogen, Life Tech.), dans un volume final de 80 µl. La solution obtenue est placée 2 h à 16°C. La RNase H digère partiellement les brins d'ARNm hybridés au premier brin d'ADNc, fournissant ainsi des extrémités 3' à l'ADN polymérase d'*E coli*. A partir de celles-ci elle synthétise le brin d'ADN complémentaire, en dégradant de 5' en 3' en avant de sa progression les fragments d'ARNm qui restent. La ligase d'*E coli*

lie les brins ainsi formés. 6 U de *T4 DNA Polymerase* (Invitrogen, Life Tech.) sont ensuite ajoutées. Une première incubation de 30 min à 16°C permet à cette enzyme de dégrader les extrémités sortantes des queues poly-A. Puis une incubation de 15min à 70°C assure l'inactivation des enzymes. Les ADNc obtenus sont précipités (0,1 volume Acétate de sodium 3M, 2,5 volume Ethanol absolu, 40 µg Glycogène, une nuit à -20°C) (figure 11).

II.5.3.3. Contrôle de la Transcription inverse

Après la synthèse du premier brin d'ADNc, une PCR du gène GAPDH humain ou bovin est réalisée sur les échantillons traités ou non à la *Superscript II* en utilisant 1 µl du produit de la RT. Eventuellement une PCR de l' α 3-Tubuline est aussi réalisée, avec des amorces dans deux exons adjacents afin de reconnaître un produit d'amplification d'une séquence génomique de celui d'une séquence d'ADNc sur la base de leur taille.

Synthèse du 1^{er} brin d'ADNc par Transcription inverse

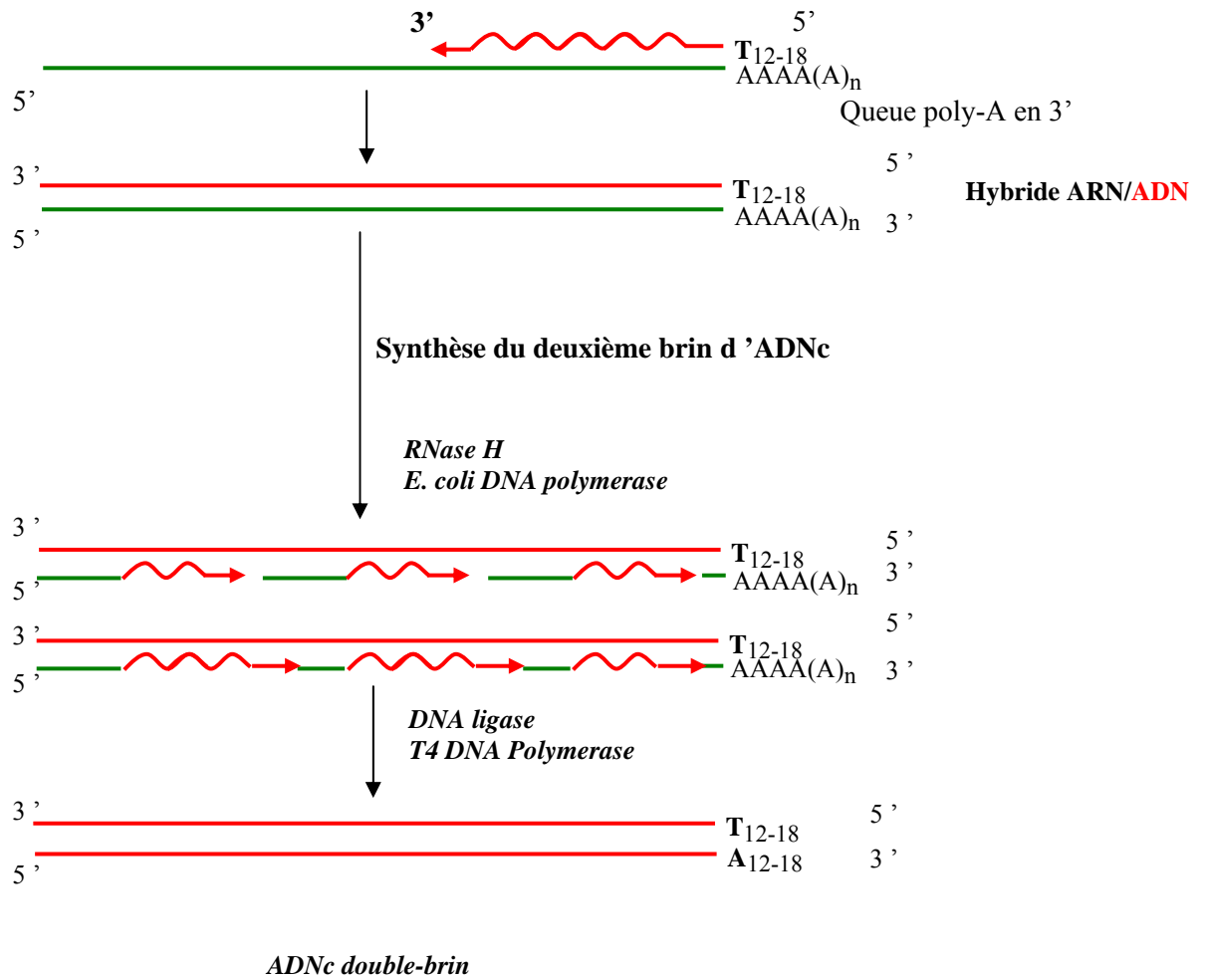


Figure 11 : Synthèse du premier et du deuxième brin d'ADNc.

II.5.4. Digestion des ADNc de deux tissus (tissu de conduction et du myocarde) par *DpnII*

Après précipitation les ADNc de deux tissus (tissu de conduction et de myocarde) sont repris dans 40 µl d'eau stérile et sont traités avec l'enzyme de restriction *DpnII* (Biolabs), à raison de 4 U/µl final dans du tampon *DpnII*, dans un volume final de 50 µl, puis placés 4 h à 37°C. L'enzyme est inactivée pendant 20 min à 65°C. Les produits obtenus sont précipités (0,1 volume acétate de sodium 3 M, 2,5 volume éthanol absolu, 20 µg Glycogène, une nuit à -20°C).

Pour tester l'efficacité de la digestion par *DpnII*, on réalise une PCR avec un couple d'amorce amplifiant une séquence d'ADNc contenant un site *DpnII*. Nous avons choisi les amorces du gène GAPDH humain qui amplifie une séquence GAPDH bovine portant une site *DpnII*.

II.5.5. Ligation avec les adaptateurs R – Bgl-24

Les ADNc des deux tissus (tissu de conduction et de myocarde) digérés sont précipités et lavés à l'éthanol à 70% et repris dans 28 µl H₂O. 14 µl d'ADNc sont utilisés pour la ligation avec les adaptateurs R. Les ADNc sont mélangés avec 16 µg de l'amorce R-24 mer et 4 µg de l'amorces R-12 mer, 6 µl Tampon *T4 DNA Ligase* (Biolabs), dans un volume finale de 57 µl.

Afin de réaliser l'hybridation entre les amorces R-24 et R-12 et l'ADNc, le mélange est chauffé pendant une minute à 50°C, puis la température est descendue de 50°C à 10°C pendant 40 min avec un abaissement d'un degré /min. Ensuite la ligation a lieu après l'ajout de 3 µl de la *T4 DNA Ligase* (400 U/µl, Biolabs), et une incubation à 14°C pendant 24 h (voir figure).

Les produits de la ligation seront dilués en ajoutant 140 µl de TE (10 mM Tris, pH 7,5, 2 mM EDTA).

II.5.6. Optimisations des conditions d'amplification pour générer les représentations (tissu de conduction et myocarde)

L'étape clé de la RDA consiste à amplifier par PCR les deux représentants (tissu de conduction et myocarde) avec les amorces R-24.

Avant d'amplifier, il faut mettre au point les meilleures conditions d'amplification des deux représentants : - la concentration en ADNc ligaturé aux amorces R (ou produit de ligation), - le nombre de cycles de PCR.

Pour cela des PCR ont été réalisées en faisant varier : la quantité de produit de ligation (produit de l'étape précédente), et le nombre de cycles.

Pour tester différentes quantités de produits de ligation, différents volumes sont utilisés : 1, 2, 4 et 6 μ l, (3 tubes pour chaque volume), dans une réaction de PCR décrite ci-après : 5 μ l de tampon PCR 10X, 4 μ l MgCl₂ (50 mM), 6 μ l dNTP (2,5 mM), 0,5 μ l R-Bgl-24 (1 mg /ml) et H₂O qsp 49 μ l.

Chauffer ce mélange à 72°C pendant 5 min pour éliminer les amorces 12 mer. Ajouter 1 μ l de Taq polymérase (2.5 U/ μ l), et incuber les tubes à 72°C pendant 5 min pour remplir les extrémités 3' de l'ADNc. Faire 34 cycles : 95° pendant 1 min, 72°C pendant 3 min (hybridation et élongation à 72°C) et prélever des aliquots de 10 μ l après chaque cycle entre les 18ème et 24ème cycles, puis tous les 2 cycles jusqu'au 34ème. Comparer le profil d'amplification des deux représentants en déposant sur un gel d'agarose pour chaque échantillons (afin d'éviter le biais d'amplification des deux représentants).

II.5.7. Générations de représentations (tissu de conduction et myocarde)

Après la détermination du meilleur nombre de cycles pour une quantité d'ADNc, on réalise des PCR pour générer les représentations (plusieurs séries de 16 tubes de 50 μ l de volume).

Les produits de PCR sont regroupés pour chaque représentation, extraits par phénol/chloroforme/alcool isoamylique, puis chloroforme/alcool isoamylique, précipités par l'isopropanol en présence de NaCl 4 M, incubés pendant 20 min sur glace, puis centrifugés à 14000

rpm pendant 15 min à 4°C. Le culot est lavé avec de l'éthanol à 80% et repris dans de l'eau stérile et dosé.

II.5.8. Générations du *driver* (myocarde)

300 µg des représentations précédentes du myocarde sont digérées par *DpnII* dans un volume final de 750 µl, avec 75 µl de tampon *DpnII* 10X et 40 µl d'enzyme *DpnII* (10 U/µl) avec une incubation de 4 h à 37°C.

Le produit de la digestion est extrait par phénol/chloroforme/alcool isoamylique, suivi de chloroforme/alcool isoamylique, puis précipité avec 0,1 volume d'acétate de sodium (pH 4,6) et de l'isopropanol, incubé 20 min sur glace, puis centrifugé à 14000 rpm pendant 15 min à 4°C. Le culot est lavé avec de l'éthanol à 80% et repris dans de l'eau stérile afin d'obtenir 0,5 µg/µl.

II.5.9. Générations du *tester* (tissu de conduction)

10 µg de représentation précédentes du tissu de conduction sont digérées avec 10 µl de tampon *DpnII* 10X et 10 µl d'enzyme *DpnII* (10 U/µl) dans un volume final de 100 µl, l'incubation dure 4h à 37°C.

Le produit de la digestion est extrait par phénol/chloroforme/alcool isoamylique, suivi de chloroforme/alcool isoamylique, puis précipité avec 0,1 volume d'acétate de Sodium (pH 4,6) et de l'Isopropanol, incubé 20 min sur glace, puis centrifugé à 14000 rpm pendant 15 min à 4°C. Le culot est lavé avec de l'éthanol à 80% et repris dans 50 µl d'eau stérile.

II.5.10. Purification du *tester* (tissu de conduction) des amorces R-Bgl-24

Afin d'effectuer une deuxième ligation avec les amorces J-Bgl-24, les amorces R-Bgl-24 doivent être éliminées, par passage du produit de PCR purifié sur des colonnes séphacryl S-400 (Pharmacia), suivi d'une centrifugation à 735 g (2630 rpm centrifugeuse Eppendorf 5810 R, rotor à angle fixe de 95 mm de rayon) pendant 2 min à température ambiante. Il faut vérifier les ADNc après digestion, et après colonne en déposant un aliquot dans un gel d'agarose.

II.6. Etape de l'hybridation soustractive

II.6.1. Ligation du *tester* (tissu de conduction) avec les amorces J-Bgl-24

La réaction de ligation se fait comme suivant : 2 µg du *tester* (purifié des amorces R-Bgl-24), 8 µg des amorces J-Bgl-24, 4 µg J-Bgl-12, 6 µl Tampon *T4 DNA Ligase* (Biolabs), et H₂O qsp 57 µl.

L'hybridation entre les amorces J-24, J-12 et l'ADNc, s'effectue en chauffant le mélange de la réaction pendant une minute à 50°C, puis en descendant la température de 50°C à 10°C pendant 40 min avec un abaissement d'un degré/min. La ligation a lieu après l'ajout de 3 µl de *T4 DNA Ligase* (400 U/µl, Biolabs), et une incubation de 4 h à 13°C et de 16 h à 14°C. Les produits de la ligation sont dilués en ajoutant 140 µl TE (10mM Tris, pH 7,5, 2mM EDTA) à une concentration finale de 10ng/µl. Il faut vérifier l'efficacité de la ligation en réalisant une PCR avec les amorces J-Bgl-24 comme sens et l'amorce antisens du gène GAPDH bovin à 67°C et à 70°C.

II.6.2. Hybridation soustractive

0,5 µg d'ADNc du *tester* (tissu de conduction) liés avec les amorces J-Bgl-24 sont mélangés avec 25 µg d'ADNc du *driver* (myocarde) avec un rapport de 1:50, et 300 µl du TE sont ajoutés. Ce mélange est extrait par phénol/chloroforme/alcool isoamylique, suivi de chloroforme/alcool isoamylique, précipité avec 16 µl NaCl 4 M et 400 µl d'isopropanol, incubé 20 min sur glace, puis centrifugé à 14000 rpm pendant 15 min à 4°C. Le culot est lavé 2 fois avec de l'éthanol à 70% et séché à l'air libre. Il est repris dans 4 µl du tampon EEX3 (30 mM EPPS, pH 8 à 20°C, 3 mM EDTA), par plusieurs pipetages, vortexé pendant 2 min, incubé 5 min à 37°C, vortexé et microcentrifugé. La solution est mise dans un nouveau tube PCR, et une goutte de l'huile minérale est ajoutée. Les ADNc du *tester* et du *driver* sont dénaturés 6 min à 98°C, refroidis à 67°C et 1 µl de NaCl 5 M est ajouté afin d'ajuster la concentration en sels. Le mélange est incubé 24 h à 67°C.

Le produit de soustraction est dilué de sorte que la concentration finale soit de 1,25 ng/µl, en ajoutant 8 µl TE (contenant 5 µg/µl d'ARN de levure, Ambion) par pipetages successifs, puis 23 µl de TE, et enfin 362 µl de TE.

II.6.3. Obtention de DP1 (produit différent 1 = produit de la première soustraction)

II.6.3.1. Produit de soustraction amplifié 10X

Faire une PCR de 16 tubes ayant un volume final de 50 µl, comme suit :

5 µl de produit de l'hybridation, 5 µl de tampon PCR, 4 µl MgCl₂ (50 mM), 6 µl dNTP (2,5 mM), et H₂O qsp 48 µl. Chauffer ce mélange à 72°C pendant 3 min pour éliminer les amorces J-12 mer. Ajouter 1 µl de Taq polymérase (2.5 U/µl) et incubé les tubes à 72°C pendant 5 min pour remplir les extrémités 3' de l'ADNc. Incuber les tubes à 80°C, et ajouter 1 µl J-Bgl-24 (0,5 µg/µl), faire 10 cycles à 95°C pendant 1 min et à 70°C pendant 3 min ; avec une élongation finale à 72°C pendant 10 min.

Les produits de PCR sont regroupés en un tube, et extraits par phénol/chloroforme/alcool isoamylique, puis par chloroforme/alcool isoamylique. Ils sont ensuite précipités avec du NaCl et de l'isopropanol en présence de 5 µg de glycogène, incubés sur glace pendant 20 min. Ce mélange est centrifugé à 14000 rpm pendant 15 min à 4°C. Le culot obtenu est lavé avec de l'éthanol à 80% et repris dans 40 µl d'eau stérile.

II.6.3.2. Digestion par le *Mung Bean Nuclease (MBN)*

20 µl du produit de soustraction amplifié 10X sont digérés avec *Mung Bean Nuclease (MBN)*, pour enlever l'ADN simple brin, en ajoutant 4 µl de tampon *MBN* 10X, et 2 µl de l'enzyme *MBN* (10 U/µl, Biolabs) dans un volume final de 40 µl. La réaction est incubée à 30°C pendant 30 min.

Le produit de la digestion est extrait par phénol/chloroforme/alcool isoamylique, puis par chloroforme/alcool isoamylique, précipité avec du NaCl et de l'isopropanol en présence de 5 µg de glycogène, incubé sur glace pendant 20 min, puis centrifugé à 14000 rpm pendant 15 min à 4°C. Le culot obtenu est lavé avec de l'éthanol à 80% et resuspendu dans 200 µl d'eau stérile.

La réaction de PCR finale pour générer **DP1** est la suivante (un volume total de 800 µl réparti dans 16 tubes) : 5 µl de produit de digestion avec *MBN*, 5 µl de tampon PCR 10X, 4 µl de MgCl₂ (50 mM), 6 µl de dNTP (2,5 mM), 0,5 µl de J-Bgl-24 (1 mg/ml) et complétée avec de l'eau jusqu'au 49 µl. Incuber à 95°C pendant 1 min, à 80°C, ajouter 1 µl de Taq polymérase (2,5 U/µl), et faire 30 cycles à 95°C pendant 1 min, à 70°C pendant 3 min puis à 72°C pendant 10 min. Ces produits sont regroupés, extraits par phénol/chloroforme/alcool isoamylique, puis par chloroforme/alcool isoamylique, précipités avec du NaCl et de l'isopropanol, incubés 20 min sur glace, puis centrifugés à 14000 rpm pendant 15 min à 4°C. Le culot obtenu est lavé avec de l'éthanol à 80% et repris dans 50 µl d'eau stérile, on obtient ainsi **DP1 (difference product 1)**.

II.6.4. Purification de DP1 des amorces J-Bgl-24

5 µg de DP1 sont digérées avec 10 µl du tampon *DpnII* et 10 µl *DpnII* (10 U/µl) dans un volume final de 100 µl, avec une incubation de 4h à 37°C.

Le produit de la digestion est extrait par phénol/chloroforme/alcool isoamylique, suivi de chloroforme/alcool isoamylique, précipité avec 0,1 volume d'acétate de sodium (pH 4,6) et d'isopropanol, incubé 20 min sur glace, puis centrifugé à 14000 rpm pendant 15 min à 4°C. Le culot est lavé avec de l'éthanol à 80% et repris par 50 µl d'eau stérile.

Afin d'effectuer une deuxième ligation avec les amorces N-Bgl-24, les amorces J-Bgl-24 doivent être éliminées, par passage du produit de PCR purifié sur des colonnes séphacryl S-400 (Pharmacia), et sont centrifugées à 735 g pendant 2 min à température ambiante. Il faut vérifier les ADNc ou DP1 après digestion, et après colonne en déposant sur gel d'agarose.

II.7. Réitération des étapes de soustraction et d'amplification sélective

II.7.1. Ligation de DP1 avec les amorces N-Bgl-24

La réaction de la ligation se fait comme suivant : 1 µg du DP1 purifié des amorces J-Bgl-24, 8 µg des amorces N-Bgl-24, 4 µg N-Bgl-12, 6 µl Tampon *T4 DNA Ligase* (Biolabs) et H₂O qsp 57 µl.

L'hybridation entre les amorces N-24, N-12 et DP1, se fait en chauffant la réaction pendant une minute à 50°C, puis en descendant la température de 50°C à 10°C pendant 40 min avec un abaissement d'un degré /min. Puis, la ligation a lieu après l'ajout de 3 µl de *T4 DNA Ligase* (400 U/µl ,Biolabs) et une incubation à 13°C pendant 4 h et à 14°C pendant 16 h.

Les produits de la ligation sont dilués en ajoutant 140 µl TE (10 mM Tris, pH 7,5, 2 mM EDTA) de façon à avoir une concentration finale de 5 ng/µl.

II.7.2. Obtention de DP2, DP3 et DP4

Il suffit de procéder comme précédemment mais avec quelques différences :

Pour DP2, on mélange 250 ng de DP1 lié au N-24 avec 25 µg du *driver* (ADNc de myocarde obtenu par l'étape II.5.8) (rapport de 1/100).

Pour l'obtention de DP3, la réaction de la ligation se fait comme suit : 1 µg DP2, 4 µg J-Bgl-24 (2 mg/ml), 2 µg J-Bgl-12 (1 mg/ml), 3 µl Tampon *T4 DNA Ligase* (Biolabs) et H₂O qsp 28,5 µl.

L'hybridation entre les amorces J-24 et J-12 et DP2, se fait en chauffant la réaction pendant une minute à 50°C, puis en descendant la température de 50°C à 10°C pendant 40 min avec un abaissement d'un degré /min. Puis, la ligation a lieu après l'ajout de 1,5 µl de *T4 DNA Ligase* (400 U/µl, Biolabs) et une incubation à 13°C pendant 4 h et à 14°C pendant 14 h. Les produits de la ligation sont dilués en ajoutant 140 µl TE (10 mM Tris, pH 7,5, 2 mM EDTA) afin d'avoir une concentration finale de 5 ng/µl, et on hybride 50 ng de DP2 liés aux amorces J-24 avec 40 µg du *driver* (ADNc de myocarde obtenu à l'étape II.5.8) (rapport de 1 : 800).

Pour l'obtention de DP4, 200 pg de DP3 lié aux amorces N-24 sont mélangés avec 25 µg du *driver* (ADNc de myocarde obtenu à l'étape II.5.8) (rapport de 1/125 000, 1/250000), et l'hybridation a lieu toujours à 67°C pendant 20 heures.

II.8. Analyse de l'efficacité de la soustraction

Cette analyse peut être réalisée soit par PCR soit par analyse d'hybridation pour estimer l'efficacité de la soustraction. Une étude de la cinétique d'amplification sur un gène de ménage comme le gène GAPDH est indispensable pour vérifier si la soustraction est efficace, en réalisant une PCR avec les amorces du gène GAPDH bovin (pas de site *DpnII*), sur les produits avant soustraction et après

soustraction. Pour cela on prend 5 µl d'aliquot à 18 cycles, puis à 23, 28 et 33 cycles, et ils sont déposés sur gel d'agarose.

II.9. Clonage de DP4

Les différentes bandes de produits DP4 sont excisées du gel après séparation par migration électrophorétique dans un gel d'agarose à un point de fusion faible. 4 bandes de taille différente ont été obtenues (environ 250, 300, 400 et 500 pb et plus). Cette séparation est nécessaire pour éviter le problème de clonage préférentiel des petits fragments. Puis les bandes sont purifiées avec le kit Qiagen (Gel Extraction Kit). Ces bandes sont ensuite clonées dans un vecteur de clonage pour le séquençage.

II.9.1. Principe de clonage TOPO TA

Le TOPO TA cloning® Kit Dual Promoter PCR®TOPO Vector (Invitrogen) a été utilisé pour cloner les produits de DP4. Ce vecteur est PCRII TOPO (Figure 12A) contient :

- un gène de résistance à l'ampicilline,
- un gène *LacZ*. A l'intérieur de ce gène, est introduit un site multiple de clonage (polylinker), c'est-à-dire une séquence polynucléotidique synthétique correspondant à une série de sites uniques, successifs, de coupure par des enzymes de restriction. Lors de l'insertion de l'insert, le gène *lacZ* est inactivé. Donc, les bactéries sont cultivées en présence d'IPTG (inducteur non métabolisable de l'opéron lactose) et de Xgal (galactoside dont la couleur passe de l'incolore au bleu lorsque il est clivé par la β galactosidase). Sur le milieu de culture utilisé, les colonies lac+, ne possédant pas l'insert, apparaîtront bleues. Alors que les colonies comportant un insert seront blanches,
- une base thymidine sortante en 3' (avec un groupement phosphore). En effet, la *Taq* polymérase a une activité transférase qui, en général, ajoute une adénosine à l'extrémité 3' du produit de PCR (insert),

- une Topoisomérase liée de façon covalente à la base extra T à chaque extrémité du vecteur (en 3'). Elle empêche le vecteur de se refermer sur lui-même.

L'hybridation du produit de PCR, grâce à l'adénosine terminale (s'hybridant avec la thymidine du vecteur) et la présence du groupement hydroxyle (l'extrémité 3' de l'amorce du produit de PCR n'est pas phosphorylée) provoquent la libération de la Topoisomérase I et la ligation entre le vecteur et l'insert (figure 12B).

Ensuite le plasmide (vecteur et insert) sera intégré dans des bactéries compétentes par choc thermique. Elles sont ensuite étalées sur des géloses LB + ampicilline + Xgal + IPTG, qui est un milieu sélectif permettant aux bactéries ayant incorporées le plasmide recombiné de se développer.

Le plasmide possède un gène de résistance à l'ampicilline, donc seules les bactéries ayant incorporées le plasmide seront capables de se développer sur le milieu de culture. Pour sélectionner les bactéries ayant incorporées le plasmide recombiné on utilise un second marqueur de sélection selon la couleur blanche ou bleue.

II.10. Extraction des plasmides

Des colonies blanches isolées sont repiquées, mises en culture dans 4 ml de milieu LB liquide, et incubées toute la nuit à 37°C sous agitation.

Les plasmides seront ensuite extraits par mini préparation, (Sambrook et al., 1989).

Environ 400 clones ont été obtenus : 50 à 60 clones par taille de fragment DP4. La présence d'un insert a été vérifiée par une digestion avec l'enzyme de restriction *EcoR1* (Figure 12A).

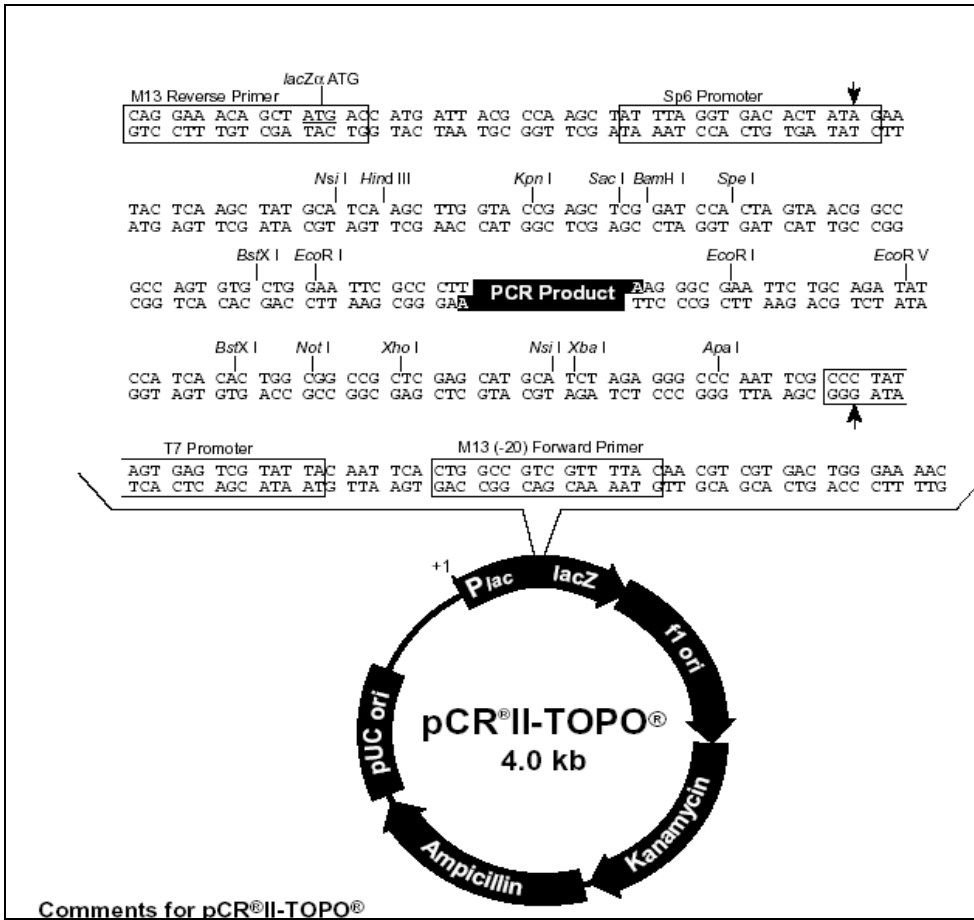


Figure 12A : Schéma du vecteur pCRII-Topo.

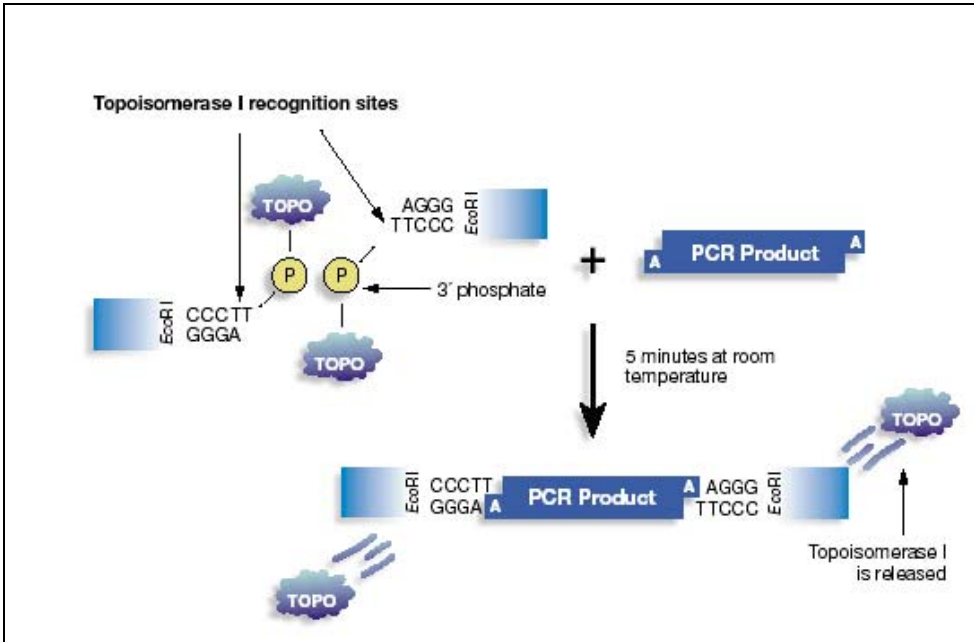


Figure 12B : Principe du TOPO TA Cloning.

II.11. Séquençage des plasmides

Nous avons séquençé les plasmides avec les amorces M13F (-20). Le séquençage des plasmides a été effectué comme précédemment.

II.12. Analyse des séquences et recherche d'homologie

Les séquences obtenues ont été corrigées puis analysées avec le logiciel *MacVector* pour supprimer la séquence du vecteur. Puis elles ont été enregistrées sous format « Fasta ». Puis, les homologies de séquence sur les bases des données a été réalisées avec le logiciel BLAST sur le site de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), en utilisant la recherche par BLAST avancé (Advanced Blast Search) et en choisissant les EST bovine (*Bos Taurus*) (Takasuga A et al., 2001, Smith TPL et al., 2001), ou sur les EST humains et autres. Les paramètres utilisés sont ceux les paramètres par défaut de BLAST, et avec un score seuil de 300.

II.13. PCR semi-quantitative

La PCR semi-quantitative a été effectuée en choisissant des amorces dans la séquence des différents clones obtenus après séquençage. La PCR a été faite avec 1 µl d'ADNc du tissu de conduction et du myocarde pendant 24 cycles.

II.14. Hybridation in situ

II.14.1. Préparation des ribosondes (sonde ARN)

1 µg de plasmide contenant un insert a été linéarisé par une enzyme de restriction adéquate dans les deux sens (*Bam*HI pour T7 et *Xho*I pour SP6 pour tous les plasmides), et utilisé comme matrice de transcription pour synthétiser les ribosondes sens et antisens nécessaires à l'hybridation. La synthèse de ribosonde a été faite selon les instructions du fabricant (« DIG RNA labelling kit », Roche

Diagnostic). 1 µg de plasmide linéarisé, 2µl NTP 10X (10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 6,5 mM UTP, 3,5 mM Dig-11-UTP), 2 µl tampon de transcription 10X, 1 µl inhibiteur Rnase (20 U/µl), 40 U SP6 ou T7 ARN polymérase, dans un volume final de 20 µl. Ce mélange est incubé à 37 °C pendant 2 h. Puis, 2 µl Dnase (10 U/µl) est ajouté pour détruire les ADN, et incubé pendant 15 min à 37 °C. La réaction est arrêtée en ajoutant 2 µl EDTA 0,2 M, pH 8. Le mélange est précipité avec de l'éthanol absolu et de l'acétate de Soduim (0.1 V), une nuit à -20 °C. Ce mélange est centrifugé à 13000 rpm pendant 30 min à 4 °C, puis lavé deux fois à l'éthanol 70%, le culot est repris dans 50 µl H₂O.

II.14.2. Coupes cryostats

Le tissu de conduction est découpé en petits morceaux, enrobé avec de l'OCT (Sakura, Tissue Teck) et mis directement dans l'azote liquide. Le tissu est découpé à 7 µm d'épaisseur, et les coupes sont récupérées sur des lames Superfrost (CML).

II.14.3. Réaction d'hybridation

Après une fixation des coupes dans du 4% paraformaldéhyde dans du PBS 1X pH 7,4, celles-ci sont rincées deux fois dans du PBS (5 min chacun). Puis elles sont traitées, ou non, à la protéinase K (10 µg/ml dans du PBS) pendant 15 min à 37 °C (la concentration et le temps d'incubation sont variables selon la sonde). Les coupes sont post-fixées dans du 4 % paraformaldéhyde dans du PBS 1X pH 7,4, pendant 5 min, suivi de deux lavages dans du PBS 1X. Puis les coupes sont déshydratées dans des bains d'éthanol successifs (70, 90, 100 %) pendant 5 min chacune, avant d'être séchées à l'air libre dans un endroit fermé.

La sonde ARN (2 µl) est dénaturée à 70 °C pendant 3 min, et mise directement dans de la glace. Puis elle est mélangée avec du tampon d'hybridation préchauffé à 45 °C (pour 100 µl, 45% Formamide, 6X SSC, 5X solution de Denhardt, 10 µg de l'ADN de sperme de saumon, 10 µg d'ARNt de levure, 10% sulfate de dextran). 100 µl du mélange (sonde + tampon d'hybridation) est déposé sur chaque

lame. Puis, chaque lame est recouverte avec une lamelle, et fixée avec de la colle (Kleer Tak). Les lames sont incubées une nuit à 45 °C dans une chambre humide.

II.14.4. Lavages et détection des sondes

Les lamelles sont éliminées, et les lames sont lavées dans du 6X SSC à 45°C (3X pendant 20 min chacun), puis dans du 2X SSC à température ambiante (2X pendant 10 min chacun), pour éliminer les hybridations non spécifiques. Puis lavage pendant quelques minutes dans le tampon A (Tris 100 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM) à température ambiante, puis une incubation dans le tampon A2 (tampon A, 2% serum de veau, 0.1 % Triton 100X) pendant 30 min à température ambiante. L'anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline (fragment Fab, Roche Diagnostic) est ajouté à 1/1000^{ème} ou 1/500^{ème} dans le tampon A2, appliqué aux lames, puis une incubation pendant 2 h à température ambiante en chambre humide est réalisée. Les lames sont ensuite lavées dans le tampon B (Tris 100 mM, pH 9.5, NaCl 150 mM, MgCl₂ 50 mM), 3 fois pendant 10 min chacune à température ambiante.

La révélation des coupes se fait par une incubation à l'abri de la lumière avec le chromogène NBT/BCIP (Nitro Blue Tétrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, Roche Diagnostic), en raison de 200 µl de cette solution pour 10 ml du tampon B, pendant 1 à 5 h. La réaction est arrêtée dans l'eau, les coupes sont contre-colorées, et observées directement sous un microscope.

Résultats et discussion

I. Etude de liaison et réduction de l'intervalle de la mutation

I.1. Etude familiale

I.1.1. Rappels

L'intervalle de la mutation lors de la localisation chez la grande famille libanaise L1 (figure 7), était borné par D19S606 (exclus) et D19S571 (exclus) à une distance génétique de 10 cM (De Meeus A et al., 1995) (figure 13). Cependant, les bornes centromérique et télomérique exactes de la mutation n'étaient pas bien définies.

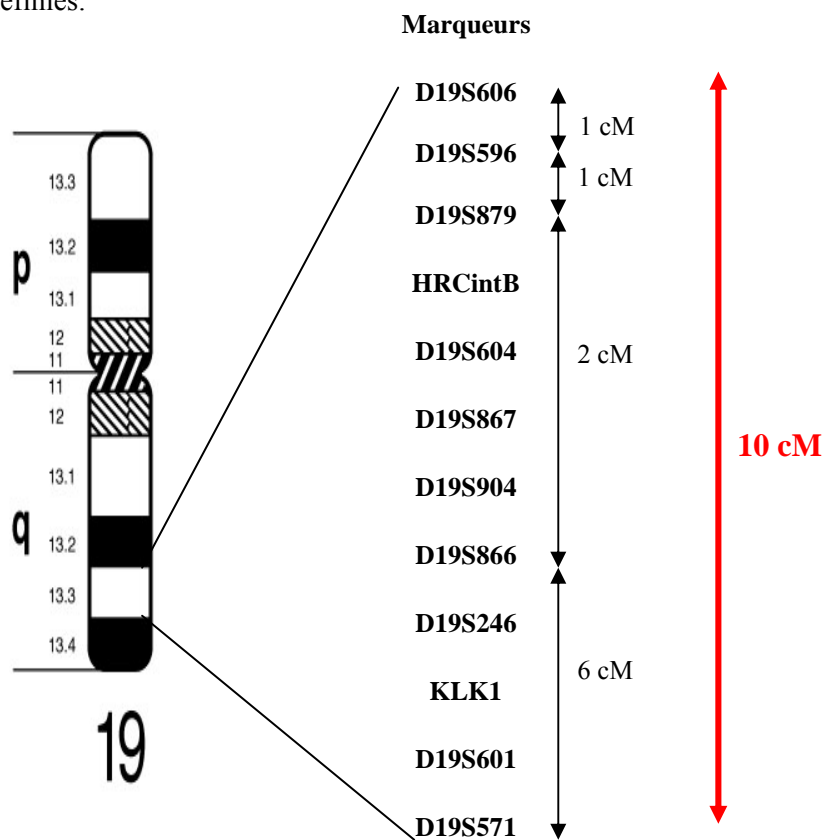


Figure 13 : L'intervalle génétique de bloc de conduction selon la grande famille libanaise L1 lors de la localisation, pour les marqueurs génotypés au locus morbide entre D19S606 (côté centromérique) et D19S571 (côté télomérique), et les distances génétiques entre les différents marqueurs. Les marqueurs HRC intB, D19S246, KLK1 et D19S601 sont des marqueurs non AFM, extraits de GDB et LLNL.

I.1.2. Recherche de nouveaux individus de la famille L1

Lors d'un séjour au Liban nous avons contacté la famille libanaise L1 dans le but d'avoir de nouveaux individus atteints, et dans l'espoir de trouver des recombinaisons chez les atteints afin de délimiter l'intervalle de la mutation. Les ECG ont été enregistrés pour 18 personnes, et la collecte du sang a été également faite en 2001.

I.1.2.1. Aspects cliniques

18 nouveaux individus ont été étudiés. Parmi eux : (figure 14):

- Un individu présente un BAV complet et a un pacemaker (II-1)
- un individu présentant un BBD complet avec un hémibloc antérieur gauche (III-6) (âge : 41 ans),
- une fille ayant un BBD complet (IV-1) (âge : 10 ans),
- un garçon ayant un BBD complet (IV-4) (âge : 5 ans).
- un garçon ayant un BBD complet, avec un intervalle QT allongé (IV-5) (âge : 4 ans).

I.1.2.2. Analyse de liaison

Les différents marqueurs du chromosome 19 entre D19S606 et D19S571 ont été testés pour tous les nouveaux individus, atteints et non atteints. Tous les atteints sont porteurs de l'haplotype lié à la maladie, et aucune recombinaison n'a été observée. Des porteurs hétérozygotes sains ont été trouvés (III-10, IV-3 et IV-6) (figure 14)

Les nouveaux individus atteints n'ont pas permis de réduire l'intervalle génétique de la mutation.

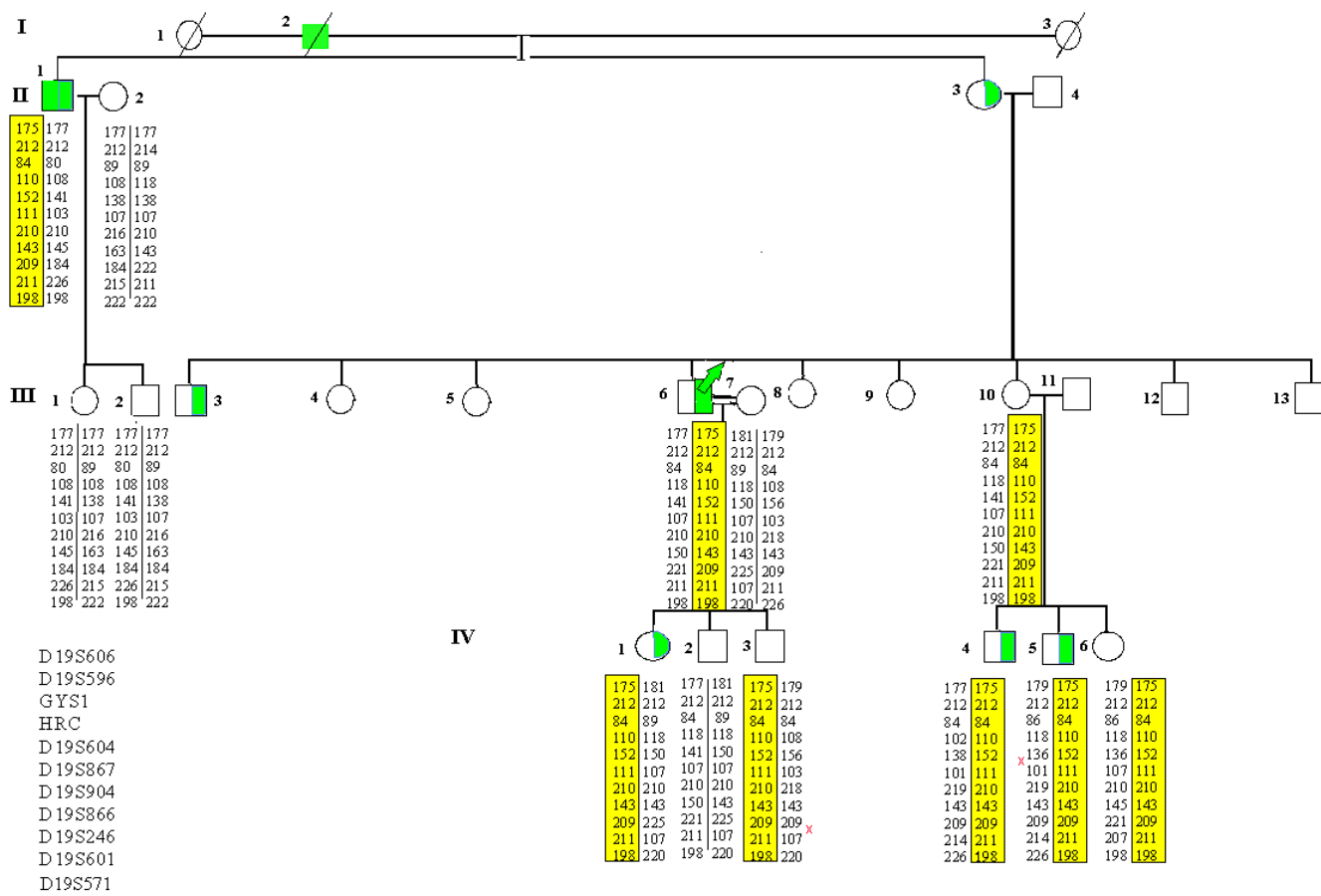
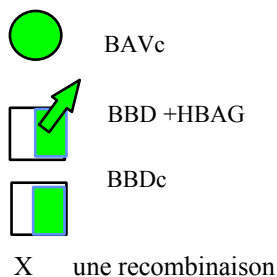


Figure 14 : Arbre généalogique de la famille H, une branche de la famille libanaise L1. Les marqueurs testés sont représentés en bas à gauche du centromère au télomère. Les haplotypes encadrés représentent la partie d'haplotype commune à la maladie



I.1.3. Famille libanaise L2

1.1.3.1. Généalogie et description clinique

Il s'agit d'une famille libanaise (figure 15) avec trois atteints seulement dont deux présentent un hémibloc antérieur gauche (II-1, II-3) et un individu avec un bloc de branche droit incomplet (BBDi) (III-6). Par ailleurs, cinq cas avec des ECG classés indéterminés ont été observés, puisqu'ils ne correspondent pas aux critères de bloc de conduction définis dans notre étude, et qu'ils ne sont pas tout à fait normaux.

1.1.3.2. Etude de liaison

L'analyse de liaison de cette famille L2, en utilisant les marqueurs microsatellites polymorphes du chromosome 19, D19S606 (AFMb030we1) du côté centromérique à D19S571 (AFM347ze1) du côté télomérique, a montré que les malades partagent le même haplotype, qui est compatible avec la mutation sur le chromosome 19q13.3 pour les marqueurs testés à 10 cM d'intervalle. Le calcul de lod score a donné une valeur maximale pour le marqueur D19S867 de 0.22 à $\theta = 0.00$ en bipoint. Nous avons estimé que la maladie est à pénétrance incomplète (70%) et que la fréquence de la mutation est de 1/10000 pour toute les familles.

Aucune recombinaison n'a été observée, mais trois individus sont porteurs sains (II-7, II-8, III-8), et des sujets classés indéterminés sont également porteurs de la mutation (II-6, III-1, III-3, III-11) (figure 15).

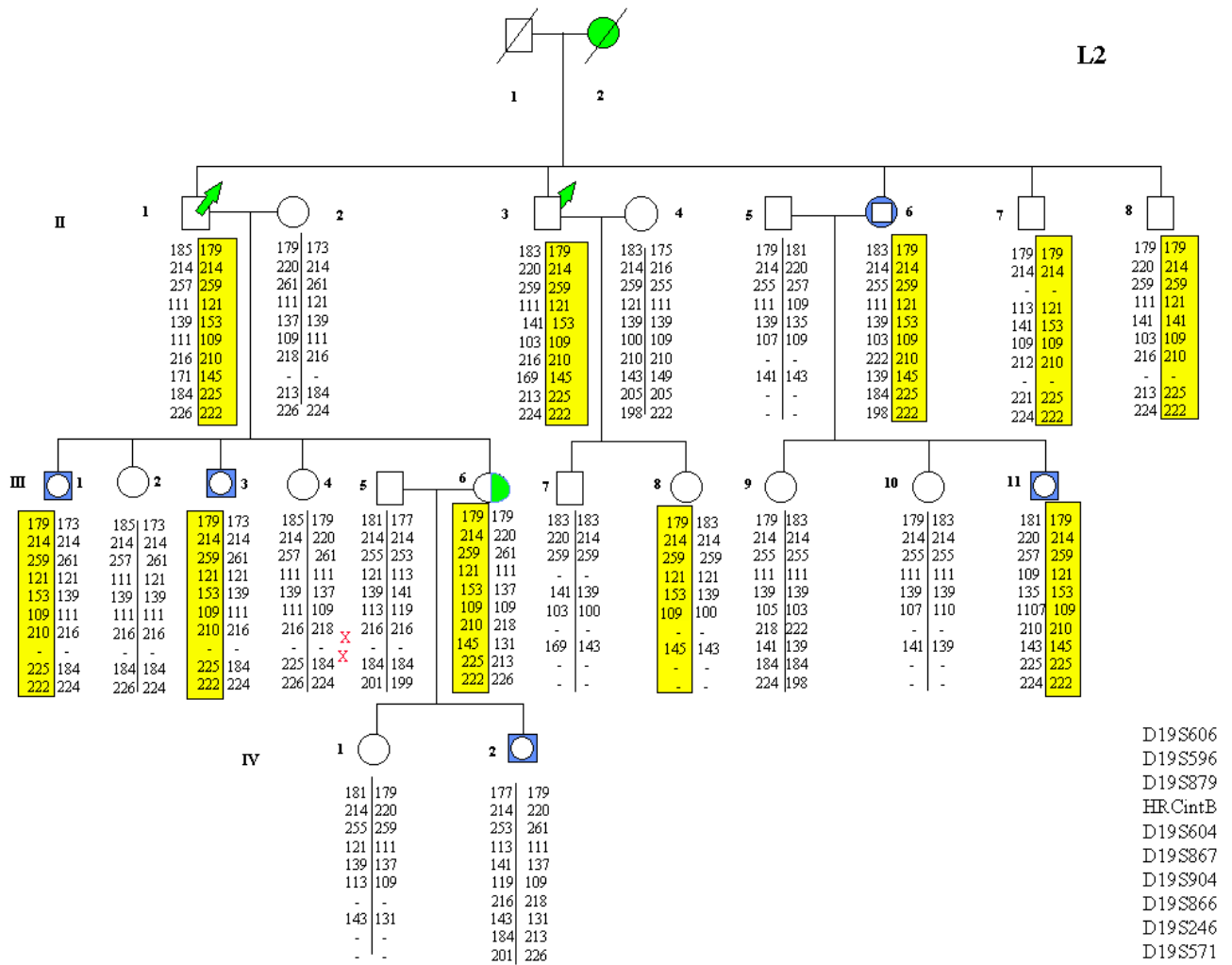


Figure 15 : Arbre généalogique de la famille libanaise L2. Les marqueurs testés sont représentés en bas à droite et sont présentés du centromère au télomère du 19q13.3. Les haplotypes encadrés représentent la partie d'haplotype commune aux malades.

- Hémibloc antérieur gauche
- Bloc de branche droit incomplet
- indéterminé
- X une recombinaison

I.1.4. Famille française F1

1.1.4.1. Généalogie et description clinique

Il s'agit d'une famille française originaire de Normandie, comportant 7 individus atteints de bloc de conduction cardiaque isolé (figure 16). Quatre individus (II-4, III-1, III-7 et IV-4) présentent un bloc auriculoventriculaire complet qui a nécessité la pose d'un pacemaker, et trois individus présentent un bloc de branche droit complet (BBDc) (III-5, IV-3) ou incomplet (BBDi) (III-8).

1.1.4.2. Etude de liaison

Les études de liaison avec les marqueurs du chromosome 19q13.3, D19S606 (AFMb030we1) du côté centromérique à D19S571 (AFM347ze1) du côté télomérique, a montré que les malades partagent le même haplotype, qui est compatible avec la mutation sur le chromosome 19q13.3 pour les marqueurs testés à 10 cM d'intervalle (figure 16). Une recombinaison a été observée chez l'individu (III-8) entre D19S606 et D19S596. Deux cas de pénétrance incomplète sont à remarquer : I-2 et II-3.

Le calcul de lod score a donné une valeur maximale pour le marqueur D19S604 de 1.30 à $\theta = 0.00$ en bipoint.

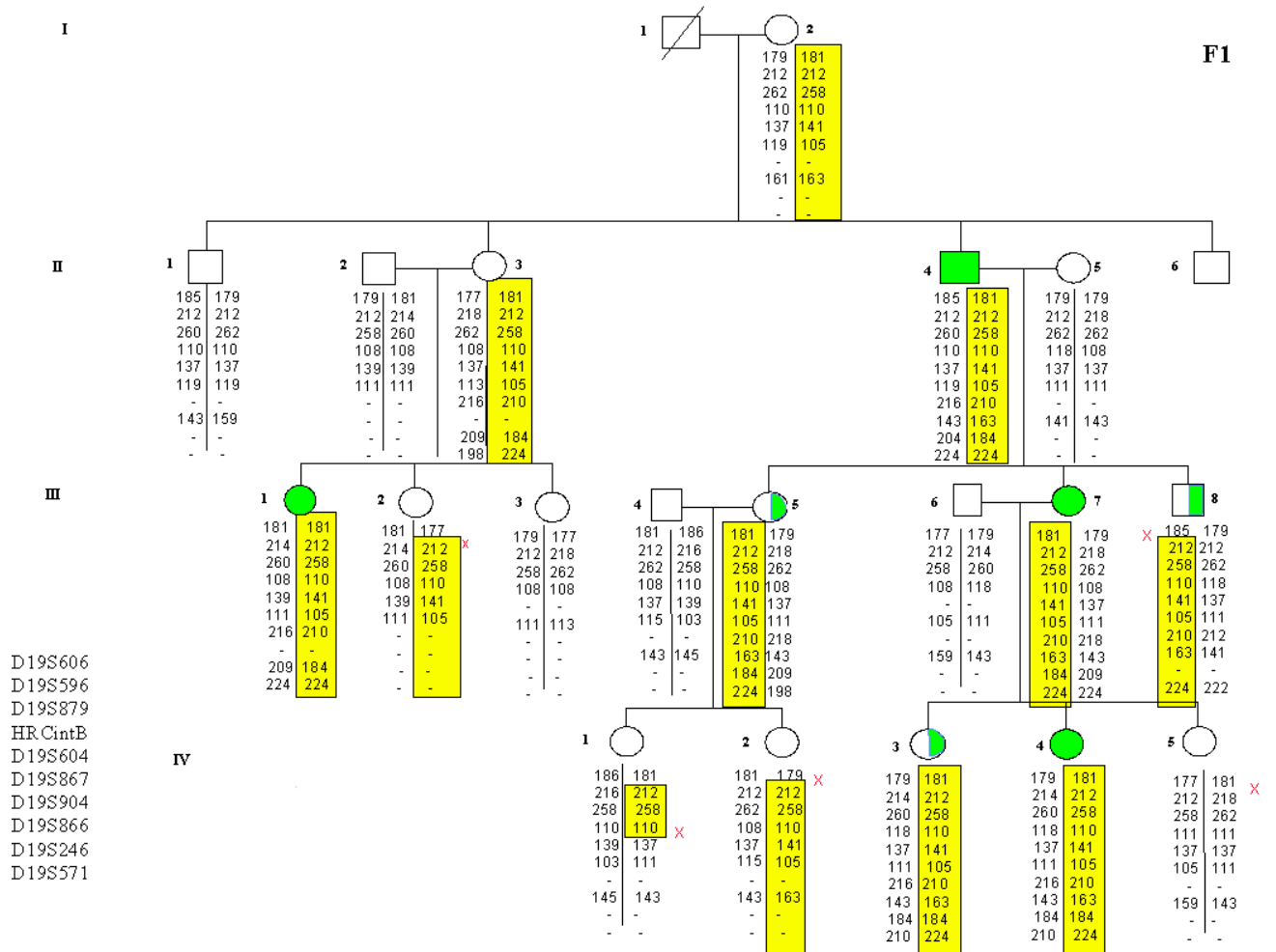


Figure 16 : Arbre généalogique de la famille française F1. Les marqueurs testés sont représentés en bas à gauche et sont présentés du centromère au télomère. Les haplotypes encadrés représentent la partie d'haploptype commune aux malades.

I.1.5. Famille française F2

I.1.5.1. Généalogie et description clinique

Cette famille a été découverte grâce à un individu ayant un bloc de branche droit complet (IV-2) qui a été référé à l'hôpital Cardiologique de Lyon. Il s'agit d'une famille française comportant 7 individus atteints de bloc de conduction cardiaque isolé (figure 17) : 1 individu présente un bloc de branche droit associé à un hémibloc antérieur gauche (II-1), 5 individus ont un bloc de branche droit complet (II-3, II-5, III-2, III-4 et IV-2) et un individu a un bloc de branche droit incomplet (III-1).

I.1.5.2. Etude de liaison

L'analyse de liaison de cette famille en utilisant les marqueurs microsatellites polymorphes du chromosome 19, D19S606 (AFMb030we1) du côté centromérique à D19S571 (AFM347ze1) du côté télomérique, a montré que les malades partagent le même haplotype qui est compatible avec la mutation sur le chromosome 19q13.3. Suite à une recombinaison chez l'individu (IV-2) entre les marqueurs D19S246 et D19S571, deux marqueurs supplémentaires ont été testés, D19S601 et KLK1 (Kallikréine 1). L'intervalle génétique pour cette famille est de 7 cM entre D19S606 et KLK1 (figure 17). On observe un individu (III-7) porteur hétérozygote sain de la mutation, confirmant ainsi la présence de la pénétrance incomplète de la maladie.

Le calcul de lod score a donné une valeur maximale pour le marqueur D19S866 de 0.75 à $\theta = 0.00$ en bipoint.

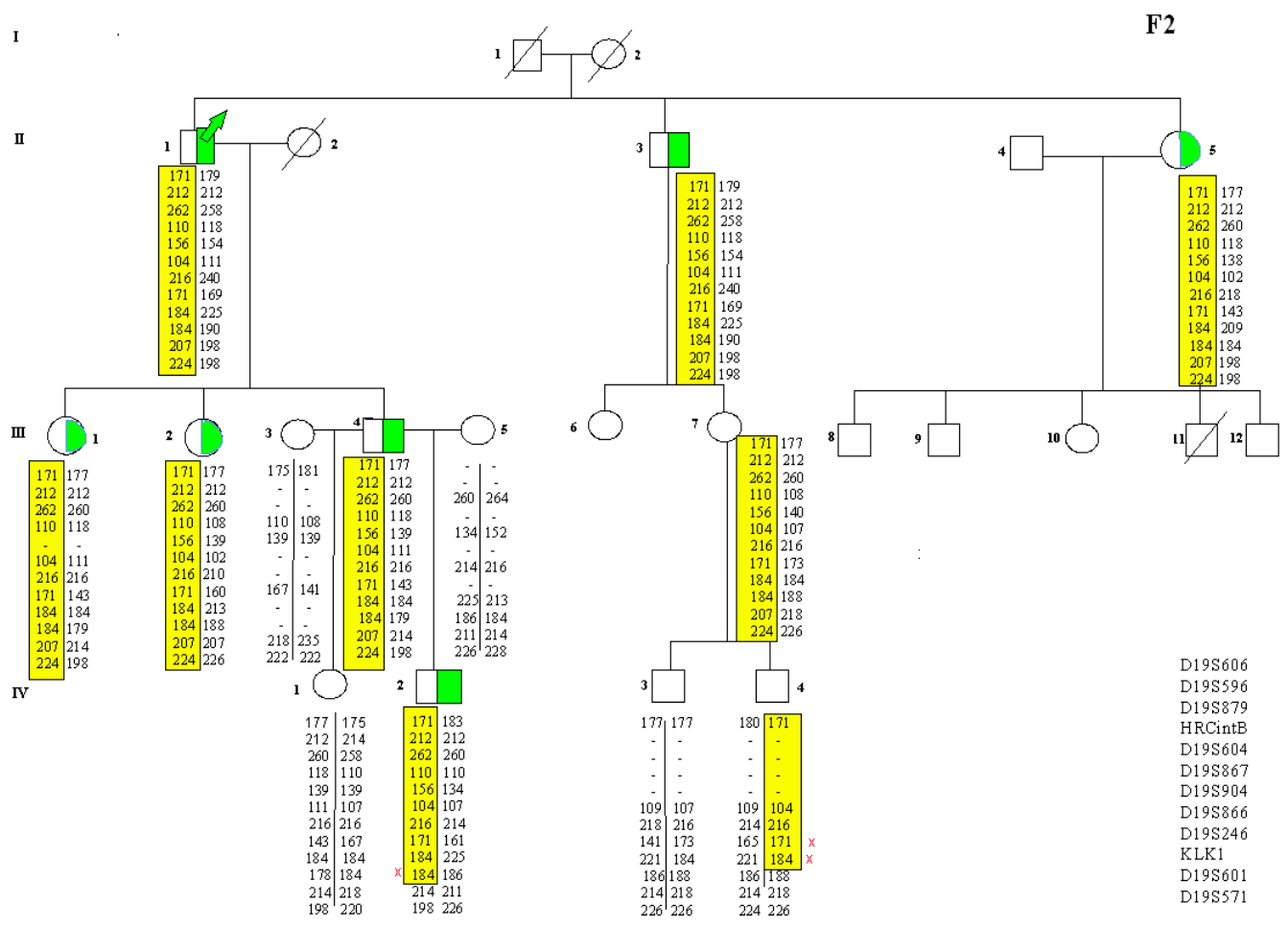


Figure 17 : Arbre généalogique de la famille française F2. Les marqueurs testés sont représentés en bas à droite et sont présentés du centromère au télomère. Les haplotypes encadrés représentent la partie d'haplotype commune aux malades.

I.1.6. Famille allemande G1

I.1.6.1. Généalogie et description clinique

Dans cette famille on trouve des blocs de conduction isolés ou associés à des malformations cardiaques (figure 18). Deux individus présentent un bloc de branche droit complet associé à un bloc d'hémibranche antérieur gauche (II-2, III-6), un individu présente un bloc de branche droit complet (III-5), deux individus ont un bloc de branche droit complet associé à un prolapsus de la valve mitrale (III-4, IV-1), un individu a un bloc auriculoventriculaire incomplet (IV-4) et un individu a une malformation cardiaque (III-15).

I.1.6.2. Etude de liaison

L'étude familiale a montré que les malades atteints du bloc de conduction isolé ou associé à des malformations cardiaques partagent les mêmes haplotypes, ce qui est compatible avec une mutation sur 19q13.3, entre les marqueurs D19S606 et D19S571 soit un intervalle de 10 cM (figure 18).

Le calcul de lod score a donné une valeur maximale pour le marqueur D19S246 de 0.95 à $\theta = 0.00$ en bipoint.

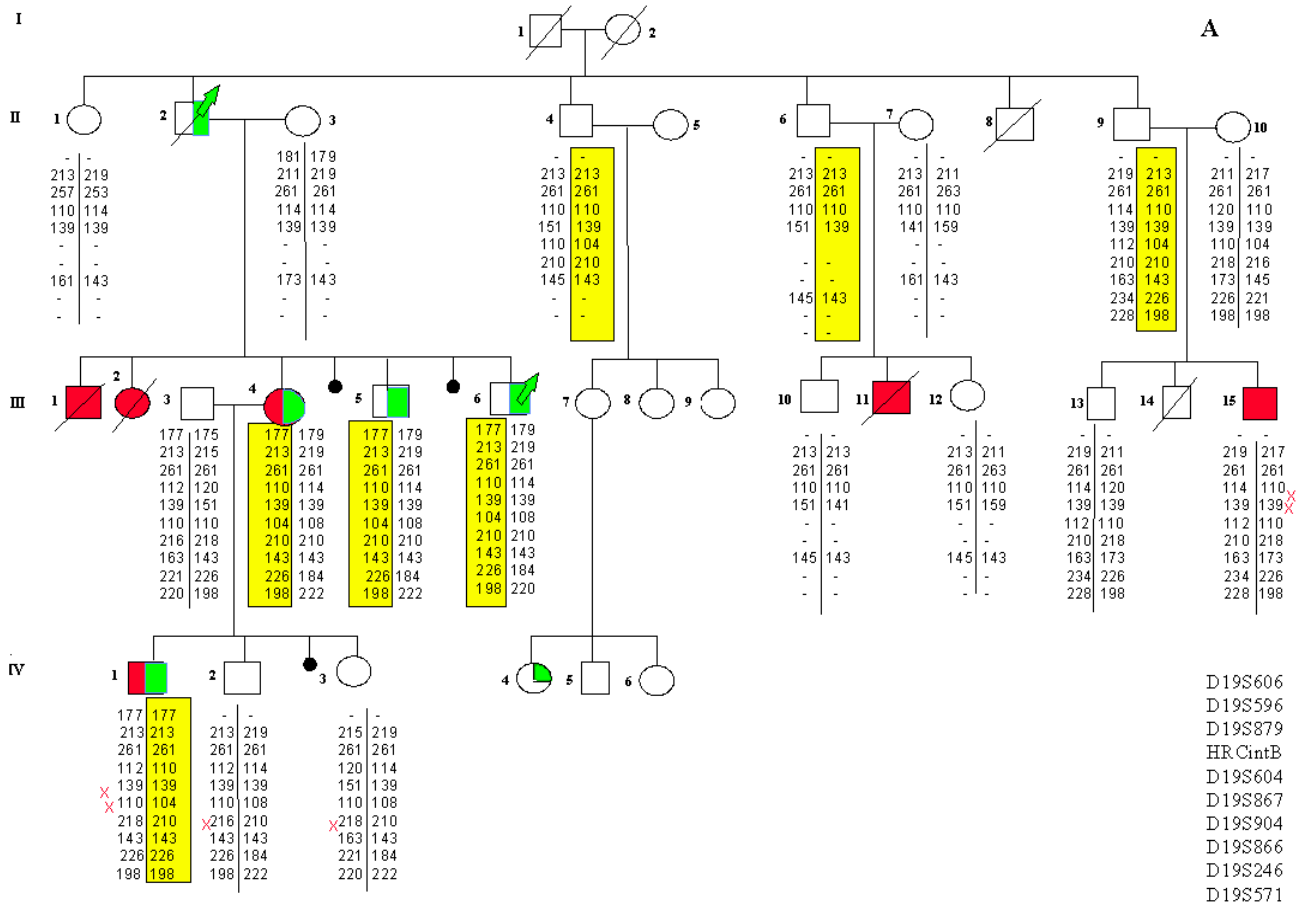


Figure 18 : Arbre généalogique de la famille Allemande A. Les marqueurs testés sont représentés en bas à droite et sont présentés du centromère au télomère. Les haplotypes encadrés représentent la partie d'haploptype commune aux malades.

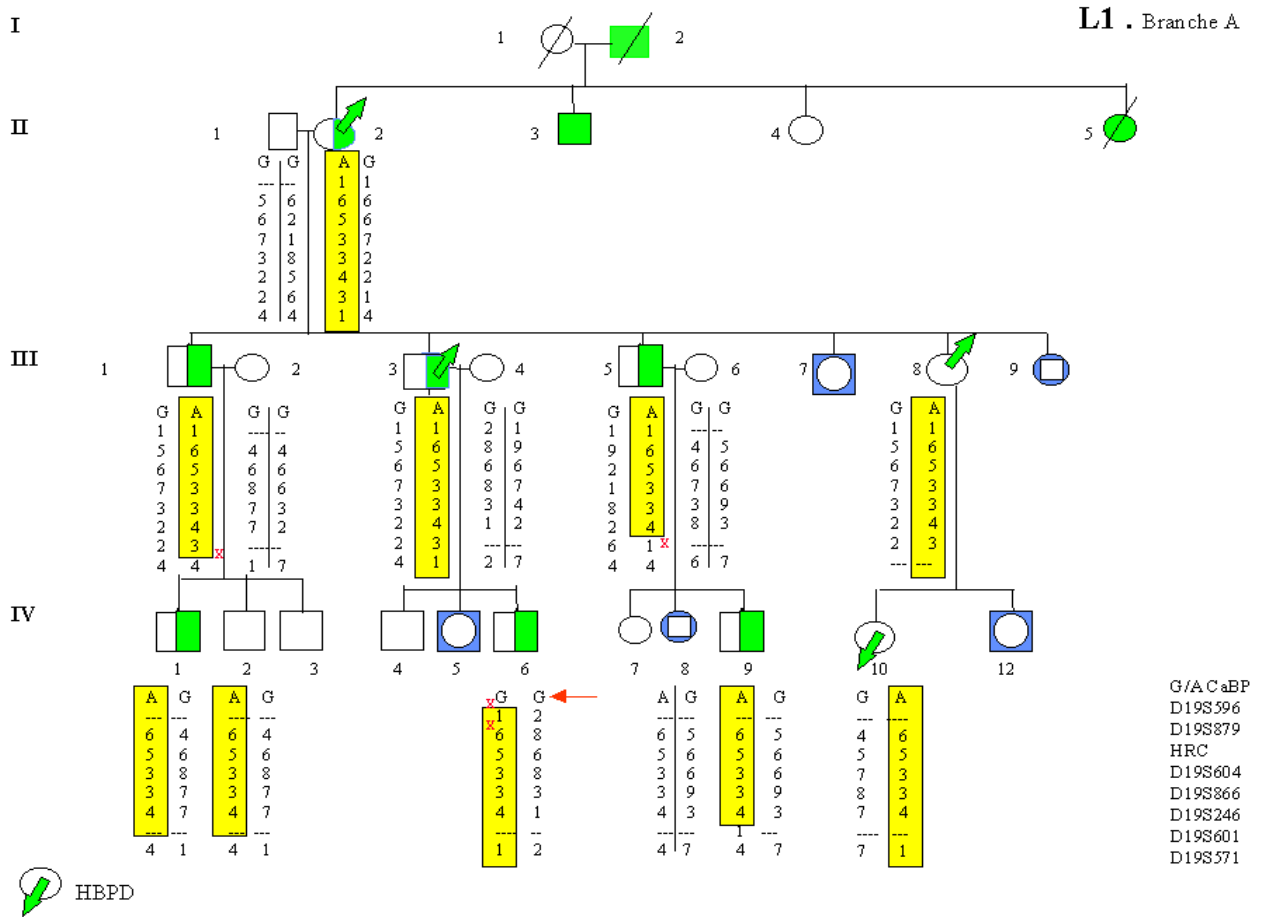


Figure 19A : La branche A de la famille libanaise L1. Les marqueurs testés sont présentés en bas à droite et sont présentés du centromère au télomère. Les haplotypes encadrés représentent la partie d'haplotype commune aux malades. On observe deux recombinaisons : chez le patient III-5 pour D19S601, et le patient IV-6 pour le SNP G/A dans le gène CaBP.

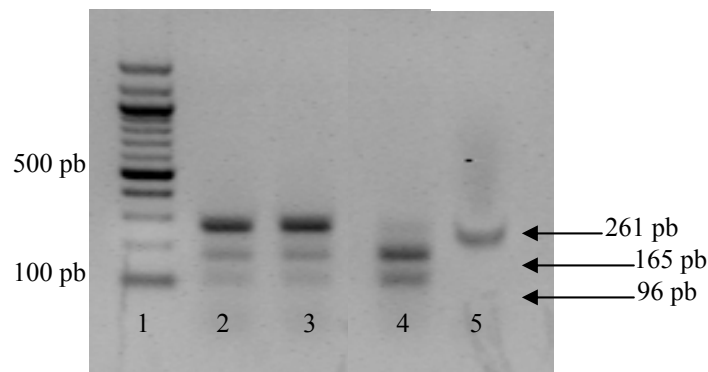


Figure 19B : L'analyse de restriction du polymorphisme G/A dans l'exon 4 du gène CaBP3/5, chez les malades de la branche A de la famille libanaise L1. 1 est un marqueur de taille, 2 est le patient II-2, 3 est le patient III-3, 4 est le patient IV-6, 5 est le produit de PCR avant digestion. L'enzyme de restriction *Acil* reconnaît le site GCGG dans l'exon 4 dont la taille est 261 pb et libère 2 fragments de 165 et 96 pb. Lorsqu'il s'agit d'un A à la place du premier G, *Acil* ne coupe pas. Après digestion, les patients hétérozygotes G/A ont 3 fragments de 261, 165 et 96 pb. Le patient IV-6 a seulement 2 fragments de 165 et 96 pb, puisqu'il a le génotype G/G.

I.2. Réduction de l'intervalle génétique

I.2.1. La grande famille libanaise L1

Suite à une recombinaison chez certains malades pour le marqueur D19S571 du côté télomérique, nous avons testé le marqueurs D19S601 dans cette grande famille. Nous avons observé une recombinaison chez certains malades pour D19S601 et cela nous a permis de réduire l'intervalle génétique de la mutations entre D19S606 (exclus) du côté centromérique et D19S601 (exclus) du côté télomérique (figure 19A). Cette exclusion du marqueur D19S601 a été également observée chez la famille française F2.

Plus tard l'étude des gènes candidats (chapitre suivant) a permis également de réduire l'intervalle génétique de la mutation grâce à un SNP identifié dans les gènes CaBP3 et CaBP5 dans cette famille, une transversion G>A à l'état hétérozygote (c. 338G>A et c.332G>A de la séquence codante du gène CaBP3 et CaBP5 respectivement) : tous les atteints de cette famille ont le génotype G/A sauf un seul individu atteint qui a le génotype G/G (figure 19B, ECG figure 20). L'intervalle génétique est réduit à environ 7 cM entre CaBP3/5 (exclus), côté centromérique et D19S601 (exclus), côté télomérique.

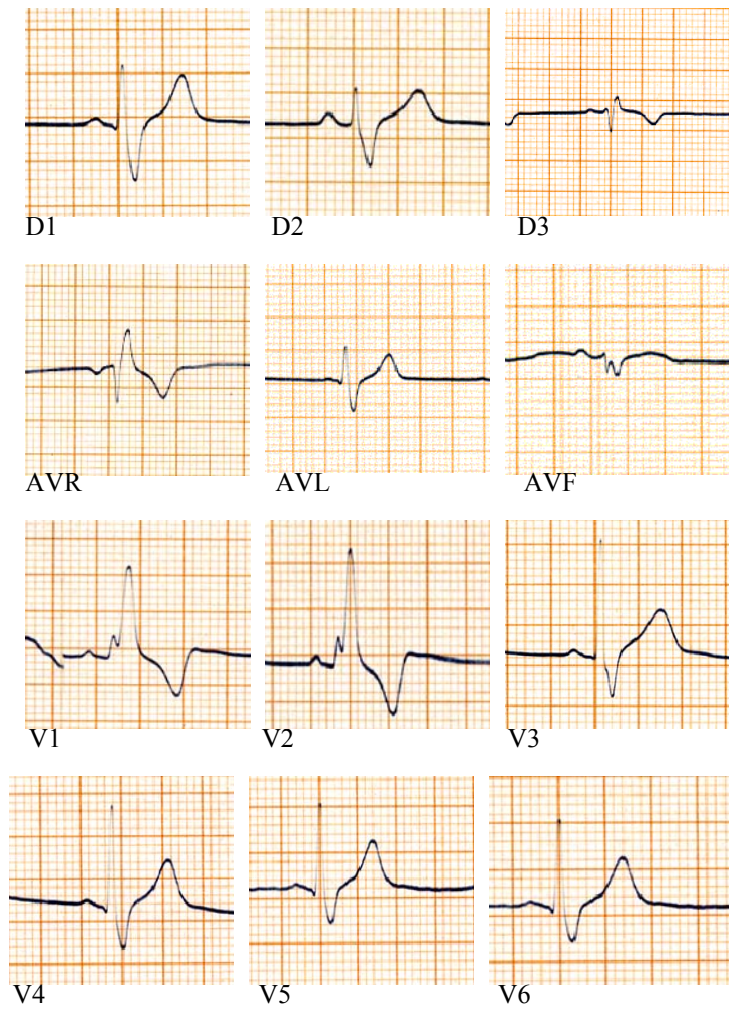


Figure 20 : L'électrocardiogramme du patient de la famille libanaise L1 qui a une recombinaison pour le polymorphisme G>A du gène CaBP3/5. Ce patient présente un BBD complet, observé par un élargissement du complexe QRS.

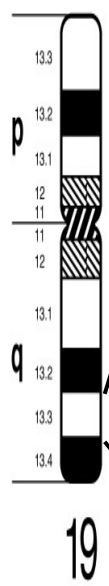
I.2.2. Effet fondateur

I.2.2.1. Principe

Une autre approche, pour réduire l'intervalle génétique, est l'effet fondateur qui consiste à chercher un ou plusieurs allèles communs entre deux ou plusieurs familles. Dans notre étude l'hypothèse d'un effet fondateur a été émise en supposant que d'une part les deux familles libanaises ont un ancêtre commun porteur d'une mutation « libanaise », et que d'autre part la famille française (originaire d'un huguenot normand) et la famille sud-africaine dont le couple fondateur est une huguenote et un portugais, ont un ancêtre commun porteur d'une mutation « huguenote ».

I.2.2.2. Pratique

Pour la famille sud-africaine on possède seulement de l'ADN de deux sujets atteints, et pour pouvoir déterminer la taille d'allèle associé à la maladie nous avons testé les marqueurs du 19q13.3. Les allèles qui sont communs entre les deux malades sont les allèles liés à la maladie. Pour tester l'hypothèse d'un effet fondateur, nous avons comparé les allèles associés à la maladie entre ces différentes familles (figure 21). Les malades des deux familles libanaises ont un allèle en commun seulement pour les marqueurs D19S596 et D19S879. Alors que les malades des familles sud-africaines et françaises ont un allèle en commun pour le marqueur D19S879 seulement (le marqueur D19S596 a un taux d'hétérozygotie faible de 0.54, et D19S879 a un taux d'hétérozygotie moyen de 0.76). Si cette hypothèse était confirmée l'intervalle de la mutation ne serait plus que de 2 cM, entre D19S596 et HRC. Pour confirmer cette hypothèse nous avons testé des marqueurs supplémentaires.



Marqueurs	Allemande	Libanaise1	Libanaise2	Française2	Française1	Sud-Africaine
D19S606	177	175	179	171	181	-
CaBP3/5	-	G/A	-	-	-	-
D19S596	213	214	214	212	212	221
D19S879	261	259	259	262	258	258/260
HRCintB	110	110	121	110	110	121
D19S604	139	152	153	156	141	138
D19S867	104	111	109	104	105	-
D19S904	210	210	210	216	210	-
D19S866	143	143	145	171	163	165
D19S246	226	209	225	184	184	-
KLK1	-	-	-	184	-	-
D19S601	-	211	-	207	-	-
D19S571	198	198	222	224	224	-

Figure 21 : Les haplotypes des différentes familles atteintes de bloc de conduction, pour les marqueurs génotypés au locus morbide entre D19S606 (côté centromérique) et D19S571 (côté télomérique). L'haplotype lié à la maladie est entouré en jaune pour chaque famille selon les événements de recombinaison. Les marqueurs en rouge sont les marqueurs qui ont la même taille d'allèle entre les deux famille libanaises ou entre la famille française F1 et la famille sud-africaine.

I.2.2.3. Résultats

Dans un premier temps nous avons testé le marqueur GYS1 situé entre D19S596 et D19S879, un gène qui code la glycogène synthétase et qui contient une séquence répétée de type (CA)_n (figure 22 et 23). Les deux familles libanaises ont des allèles de taille différente, alors que la famille française et la famille sud-africaine ont la même taille d'allèle, en faveur de l'hypothèse d'un « ancêtre commun huguenot ».

Nom	Type de Séquences répétées	Amorces	Taille en pb	Température en °C
AC008687der1	(CA)n	D : 5'- GAT TAG CCG AGT GTG GTG TC-3' R : 5'- AGC CTC CAA AAC ACA ACC AAG-3'	175	60 à62
AC008687der2	(ATG)n	D : 5'- ACA AGT TGG GTG TGA TGC AAG-3' R : 5'- TGG GGA GGA GGA AAA TGA GG-3'	245	60 à62
AC008687der3a* : D19S1194	(CA)n (TC)n	D : 5'- TCA CTC TCT CTC TCT CTC TC-3' R : 5'-AGA TGG GTA ATA GGT AAA GGG-3'	198	60
AC008687der3b	(CA)n (TC)n	D : 5'- CCC TTT ACC TAT TAC CCA TCT C -3' R : -5' GGT GCC TAT GTC CTT TGC TC-3'	136	60
AC008687der4	(CAT)n	D : 5'- ATG TTC CAG TTT CTC TCC TC-3' R : 5'- GGG GTT TTG AAG GTT GAA TAG-3'	273	58

Tableau 8a : les différents loci de séquences répétées et les différentes amorces pour les amplifier, AC008687der3a* : D19S1194 est le locus polymorphe. Les noms de loci ont été choisis comme suivant : AC008687 correspond au nom de la séquence génomique où ces loci ont été trouvés, cette séquence contient le marqueur polymorphe D19S879, der1,2,3A,3b et 4 ont été nommés arbitrairement.

Nom	Type de Séquences répétées	Amorces	Taille en pb	Température en °C
AC008891der1	(CAT)n	D : 5'- TTC TTC CTC GTC TCT GTG GC-3' R : 5'- ACT GAG TAT GGA CAC CAG GC-3'	126	62
AC008891der2	(TTC)n	D : 5'- CAT CAT CAT CAT CAT CGT C-3' R : 5'- GAT GAG GAT GAA GTT GTG-3'	268	58
AC008891der4* : D19S1193	(CA)n	D : 5'- TCC CTT CAC AAT ATA CCC-3' R : 5'-GTA GCA CTT TGA AAG ACC-3'	210	52

Tableau 8b : les différents loci des séquences répétées et les différentes amorces pour les amplifier, AC008891der4* : D19S1193 est le locus polymorphe. Les noms de loci ont été choisis comme suivant : AC008891 correspond au nom de la séquence génomique où ces loci ont été trouvés, cette séquence contient le gène HRC, der1, 2 et 4 ont été nommés arbitrairement.

I.2.2.4. Recherche et identification de nouveaux marqueurs polymorphes dans la région entre D19S879 et HRC non mentionnés sur les bases de données

Dans un deuxième temps nous avons cherché d'autres marqueurs entre D19S879 et HRC, dans le but de tester et de confirmer l'hypothèse de l'effet fondateur entre les deux familles française et sud-africaine. Les séquences génomiques contenant les marqueurs d'intérêt (AC008687 contient D19S879 et AC008891 contient HRC) sont analysées avec le logiciel *RepeatMasker* qui identifie toutes les séquences répétées du génome humain de type ((CA)_n, (TC)_n, (CCA)_n, (TCC)_n, autres). Les amorces choisies ont été utilisées pour amplifier l'ADN d'individus sains et non apparentés pour rechercher un polymorphisme (variation de la taille de produit d'amplification). Lorsqu'un polymorphisme est confirmé la paire d'amorce sera utilisée sur les ADN des patients des familles étudiées. Au total 8 nouveaux loci de séquences répétées ont été testés (tableau 8a et 8b), et seulement deux loci étaient polymorphes, cela nous a permis d'identifier 2 nouveaux marqueurs polymorphes (disponibles maintenant sur les bases de données (www.gdb.org) nommés D19S1194 - près de D19S879 - et D19S1193 - près de HRC) (figure 22 et 23).

La figure 22 montre les différents marqueurs étudiés, ainsi que leurs distances génétiques et physiques.

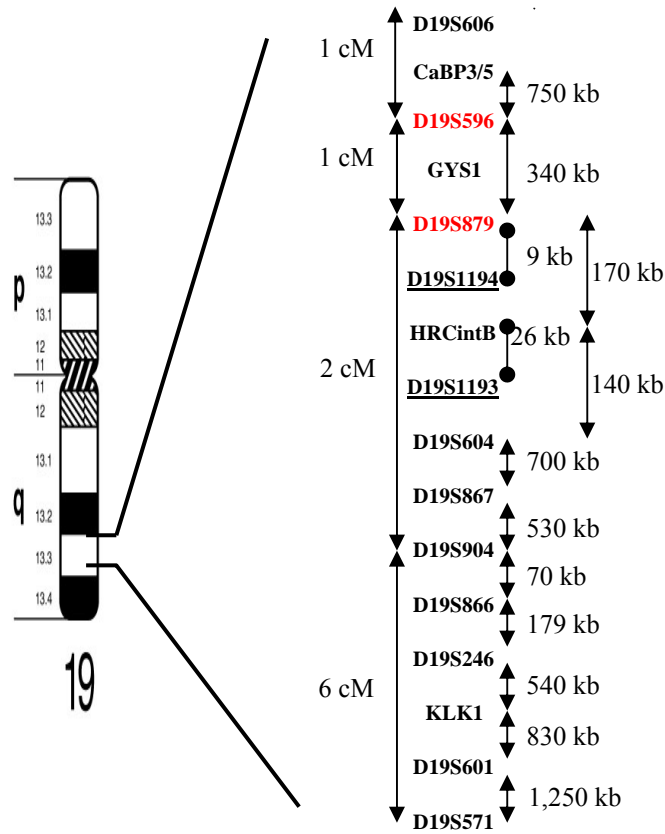


Figure 22 : L'intervalle génétique de bloc de conduction pour les marqueurs au locus morbide entre D19S606 (côté centromérique) et D19S571 (côté télomérique). Les distances génétiques entre les différents marqueurs sont présentées à gauche, et les distances physiques sont présentées à droite. Les distances ont été calculées par intégration de données extraites de différentes bases de données : GDB, NCBI, LLNL. . Les marqueurs GYS1, HRC intB, D19S246, KLK1 et D19S601 sont des marqueurs non AFM, extraits de GDB et LLNL. Les 2 marqueurs soulignés sont les nouveaux marqueurs polymorphes que nous avons identifié.

● L'ordre des marqueurs l'un par rapport à l'autre est inconnu

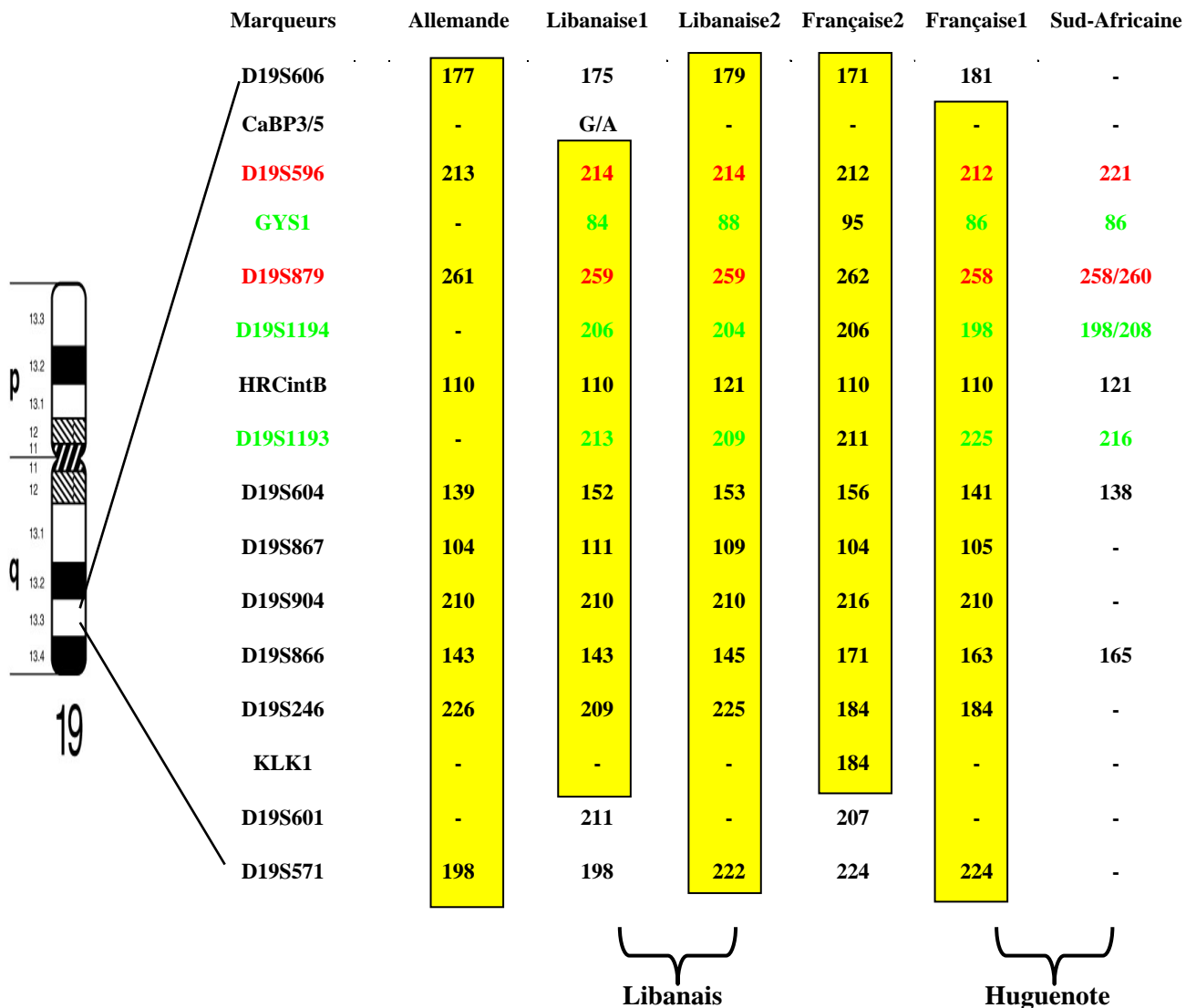


Figure 23 : Les haplotypes des différentes familles atteintes de bloc de conduction, pour les marqueurs génotypés au locus morbide entre D19S606 (côté centromérique) et D19S571 (côté télomérique). L'haplotype lié à la maladie est entouré en jaune pour chaque famille selon les événements de recombinaison. Les marqueurs en rouge sont les marqueurs qui ont la même taille d'allèle entre les deux famille libanaises ou entre la famille française F1 et la famille sud-africaine. Les marqueurs en vert sont les marqueurs supplémentaires qui ont été testés. D19S1193 et D19S1194 sont les nouveaux marqueurs polymorphes que nous avons identifiés et qui ne sont pas mentionnés sur les bases de données.

En comparant les tailles d'allèles pour les deux nouveaux marqueurs testés (D19S1193 et D19S1194), on observe que la taille d'allèle pour le marqueur D19S1193 entre la famille française et la famille sud-africaine est différente, alors que pour le marqueur D19S1194, l'allèle lié à la maladie chez la famille sud-africaine est inconnu (on possède seulement de l'ADN de deux atteints). Par conséquent, ces nouveaux marqueurs n'ont pas confirmé malheureusement l'hypothèse d'un effet fondateur, et l'intervalle génétique reste donc de 7cM entre CaBP3/5 (exclus) et D19S601 (exclus) pour nos familles, et à une distance physique d'environ 4 Mb.

Bardien-Kruger S et al. (2002) ont montré que dans la famille sud-africaine, l'intervalle de la maladie est borné entre D19S606 et D19S866, soit un intervalle de 4 cM.

L'intégration de toutes les données concernant les différentes familles nous permet de bien délimiter l'intervalle de la mutation entre CaBP3/5 et D19S866 soit un intervalle génétique de 4 cM et un intervalle physique d'environ 2.6 Mb (figure 24).

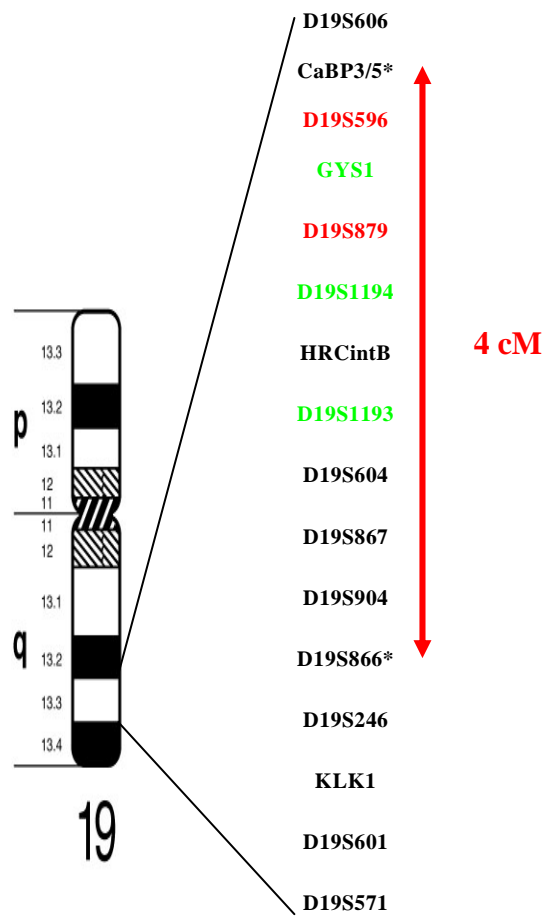


Figure 24 : L'intervalle génétique de bloc de conduction selon les différentes familles atteintes, pour les marqueurs génotypés au locus morbide entre D19S606 (côté centromérique) et D19S571 (côté télomérique). * : les marqueurs exclus.

I.3. Discussion

La grande famille libanaise L1 nous a permis de délimiter l'intervalle génétique de la mutation à 7 cM grâce à des événements de recombinaison. Cependant la recherche de nouveaux individus de cette grande famille L1 n'a pas pu réduire l'intervalle de la mutation. Les études de liaison chez les différentes familles ont montré que les malades partagent le même haplotype qui est compatible avec la mutation sur 19q13.3, mais le calcul de lod score a donné des valeurs inférieures à 3 du fait du nombre réduit des malades et de la non-informativité de certains marqueurs polymorphes. Ces familles n'ont pas permis de réduire l'intervalle de la mutation à moins de 7 cM à cause de l'absence de recombinaison dans cette région du chromosome 19q13.3 chez les atteints étudiés. Même dans la famille sud-africaine, où il y a beaucoup d'atteints, il n'a pas pu être observé de recombinaison plus centromérique que D19S866. L'intégration de données de toutes nos familles avec la famille sud-africaine a permis de réduire l'intervalle génétique de la mutation à 4 cM entre CaBP3.5 (exclus) du côté centromérique et D19S866 (exclus) du côté télomérique.

Quant à l'hypothèse qui a été émise d'un effet fondateur, en supposant que les deux familles libanaises ont un ancêtre commun porteur d'une mutation « libanaise », que la famille française et la famille sud-africaine descendent d'un ancêtre commun huguenot, elle ne s'est pas confirmée. Par comparaison des tailles d'allèles pour ces différentes familles, les deux familles libanaises ont un allèle en commun seulement pour les marqueurs D19S596 et D19S879. Alors que les malades des familles sud-africaines et françaises ont un allèle en commun pour le marqueur D19S879 seulement. Nous ne connaissons pas la fréquence allélique des marqueurs D19S596 et D19S879, mais nous connaissons leur taux d'hétérozygotie. Pour le marqueur D19S596 le taux d'hétérozygotie est faible à 0.54, et pour D19S879 le taux d'hétérozygotie est moyen à 0.76. Ce taux d'hétérozygotie s'applique aux deux familles libanaises puisque des études ont montré que la population libanaise est très proche de la population caucasienne (LeFranc G. et al., 1978). Nous avons alors testé des marqueurs supplémentaires entre ces deux marqueurs D19S596 et D19S879.

Les tailles d'allèles pour les différents marqueurs testés GYS1 (entre D19S596 et D19S879), D19S1194 et D19S193 entre les deux familles libanaises étaient différentes, excluant ainsi la présence d'un effet fondateur entre ces deux familles. Peut-être est-ce le hasard qui a fait qu'elles ont les mêmes tailles d'allèles pour les marqueurs D19S596 et D19S879, et aussi le faible taux d'hétérozygotie.

Concernant la famille française F1 et la famille sud-africaine, les deux familles ont les mêmes tailles d'allèles pour les marqueurs GYS1, D19S879. Ces résultats sont en faveur de l'hypothèse émise : un ancêtre commun « franco/sud-africain ». Tandis que pour le marqueur D19S1194 les deux familles ont un allèle en commun, mais la taille d'allèle qui est liée à la maladie chez le sud-africain est inconnue (on possède seulement deux échantillons d'ADN des individus atteints). Pour le marqueur D19S1193 des deux familles française et sud-africaine, les tailles d'allèles étaient différentes. Cependant pour la famille française et sud-africaine, l'hypothèse d'un effet fondateur n'est pas éliminée, au moins pour les marqueurs GYS1, D19S879 et D19S1194. Le recrutement d'autres atteints de la famille sud-africaine va permettre de confirmer cette hypothèse pour D19S1194.

Le recrutement d'autres familles atteintes de blocs de conduction isolés et liés au chromosome 19q13.3 permettrait peut être la réduction de l'intervalle génétique, surtout pour un chromosome aussi riche en gènes que le chromosome 19.

II. Gènes candidats

De nombreux gènes sont situés dans la région 19q13.3 définie par les marqueurs D19S606 et D19S571. Dans le cadre du séquençage du génome humain (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001) de nombreuses séquences génomiques de cette région sont maintenant disponibles dans les banques de données sous forme de « contigs », mais il existe encore des zones non séquencées et non ordonnées, et le nombre des gènes dans cette région va croissant. Dans un premier temps le choix des gènes a été limité entre les marqueurs D19S596 et D19S879, en se basant sur l'hypothèse d'un effet fondateur (comme les gènes U1-70K, BAX, NUCB1 et NT-4).

Nous avons cherché quels étaient les gènes qui pouvaient être impliqués, soit dans la génération de courant électrique (canaux ioniques), soit dans les transports de molécules, soit dans les interactions entre les cellules, et ceux qui étaient exprimés dans le cœur. Les travaux de recherche de mutation ont été réalisés sur l'ADN génomique puisqu'il est impossible d'obtenir les ARN des tissus concernés chez les malades.

Dans notre étude un changement de base qui ne change pas l'acide aminé, et qui est présent à l'état homozygote, a été considéré comme polymorphisme. Si cet changement de base change l'acide aminé, on a testé au moins 100 chromosomes normaux.

Les gènes candidats testés durant mon travail de thèse, du télomère au centromère, sont les suivants :

II.1. Etude du gène *KCNC3* ou *Kv3.3*

II.1.1. Choix du gène

Ce gène est localisé au niveau du marqueur D19S866, code un canal potassique de type *Shaw*, et considéré comme un candidat plausible pour les troubles de conduction. Le canal est constitué par l'association en tétramère des 4 sous-unités α , dont chacune est formée de 6 passages

transmembranaires. C'est un canal qui génère un courant potassique dépendant du potentiel, qui s'active et s'inactive rapidement. Le gène est composé de 4 exons, très riches en GC (69%), codant une protéine de 757 acides aminés. L'exon 1 possède 2 codons initiateurs en position 296 et 531 dans la séquence de l'ARNm, et l'exon 2 code les 6 passages transmembranaires. La protéine humaine représente une forte homologie avec celle du lapin, et 93% d'homologie avec celle de la souris et du rat pour les 659 premiers acides aminés, puis elles diffèrent au niveau du domaine C-terminal où se produisent des épissages alternatifs. Elle est exprimée dans de nombreux tissus notamment au niveau de la lentille et de la cornée des yeux (Rae J.L. et Shepard A.R. 2000).

II.1.2. Stratégie de l'étude

La séquence génomique du gène *KCNC3* n'était pas connue, la recherche d'homologie sur les bases de données GenBank, par le logiciel BLAST (Altschul et al., 1990), et l'ARNm du gène (Numéro d'accèsion GenBank : AF055989, N M_004977) a révélé que la séquence génomique de ce gène était entièrement contenue dans les clones d'ADN : AC008655 et AC019157. L'alignement comparatif par le logiciel *Cross match* entre l'ARNm et la séquence génomique a permis de délimiter les jonctions intron-exons. Les amorces introniques ont été déterminées à l'aide du programme OSP (Oligo Search Program) (Hillier et Green, 1991). Les 4 exons ont été amplifiés puis étudiés par SSCP et éventuellement séquençage (voir tableau 9 pour les amorces et les conditions de PCR).

Tableau 9 : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification, la SSCP et le séquençage du gène *KCNC3*

Exon	Taille de l'exon en pb	Séquences des amorces	Taille des produits de PCR (pb)	Température d'hybridation (°C)
1	876	1a D : 5'-CAA TCA GTT TGG TTC CTC TCC C-3'	388	67
		1a R : 5'-AGG CTG CTT GCT GTC TAG CG-3'	406	67
		1c D : 5'-CGT GCT CAA CTA CTA CCG CA-3'	584	62
2	1108	2a D : 5'-GCA CTG GAA GGG TCT TCT GC-3'	265	62
		2a R : 5'-ACG TAG GTC AGG AAG GGC TC-3'	284	62
		2b D : 5'-GAG AAC ATC ACC AAC GTG GAG-3'	269	60
		2b R : 5'-CGG GTC AGC TTG AAG ATG CG-3'	296	60
		2c D : 5'-CAA CAT CAT CGA CTG TGT GG-3'	280	68
		2c R : 5'-GCT CAG CGT AGT AAA TCA TGG-3'	385	64
		2d D : 5'-AGT TCC TGC TGC TCA TCA TC-3'		
		2d R : 5'-GTA CAT GCC AAA GTT GTT GAC-3'		
3	192	3 D : 5'-GTG TTC ACC GCA CCT CAC TC-3'	285	62
		3 R : 5'-AGG GTG CCA GGG GAT CAG TAG-3'		
4	125	4 D : 5'-ATT CCC CCC AAC TCT CTG GC-3'	226	62
		4 R : 5'-GGG TTA GTC AGG CAG GAG TG-3'		

II.1.3. Résultats

Une délétion à l'état hétérozygote de 9 bases dans l'exon 2 de la séquence codante (c.1754-1762delCCCACCCGC) a été observée chez un patient de la famille libanaise L1 (figure 25A et 25B pour le gel SSCP et séquençage), entraînant la perte des 3 acides aminés proline-histidine-proline au niveau de la protéine (p.P585-P587del) sans changement du cadre de lecture. L'analyse des parents a montré que le patient a hérité de la délétion du côté paternel (non atteint) et non pas du côté maternel (atteint), et cette même délétion n'a pas été retrouvée chez les autres malades de la famille. Cette délétion à l'état hétérozygote n'est donc pas responsable du bloc de conduction cardiaque, ni d'une autre atteinte, en particulier, oculaire puisque le malade a été examiné chez un ophtalmologue et que son examen était normal. Cette délétion qui ne change pas le cadre de lecture de la protéine ne joue

peut être pas un rôle important dans le fonctionnement de la protéine à l'état hétérozygote, mais on ne peut pas exclure qu'à l'état homozygote (2 mutations dans ce gène) il n'y ait pas d'anomalie.

Aucune autre variation de séquence n'a été trouvée, excluant ce gène comme gène responsable de troubles de conduction dans nos familles. En plus ce gène est exclu chez les familles sud-africaines en raison des recombinaisons au niveau du marqueur D19S866 (Bardien-Kruger S et al., 2002). La première partie de l'exon 1 n'a pas été amplifiée à cause d'une richesse de cette séquence en GC.

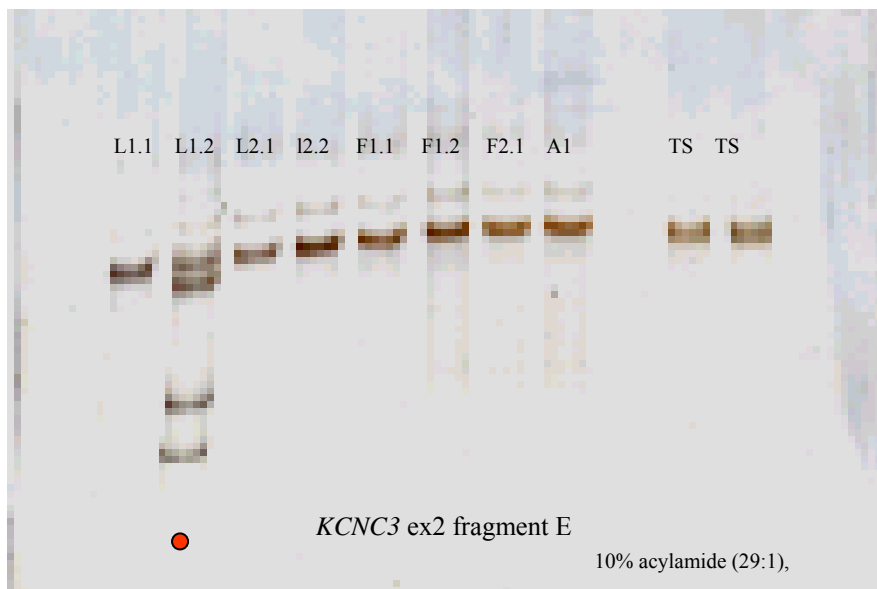


Figure 25A : Gel SSCP de l'exon 2, fragment E du gène *KCNC3*, L1.1 et L1.2 sont des patients de la famille libanaise L1, L2.1 et L2.2 sont des patients de la famille libanaise L2, F1.1 et F1.2 sont des patients de la famille française F1, F2 est un patient de la famille française F2, A1 est un patient de la famille allemande, TS est un témoin sain. On observe un profil de migration différent chez le patient L1.2.

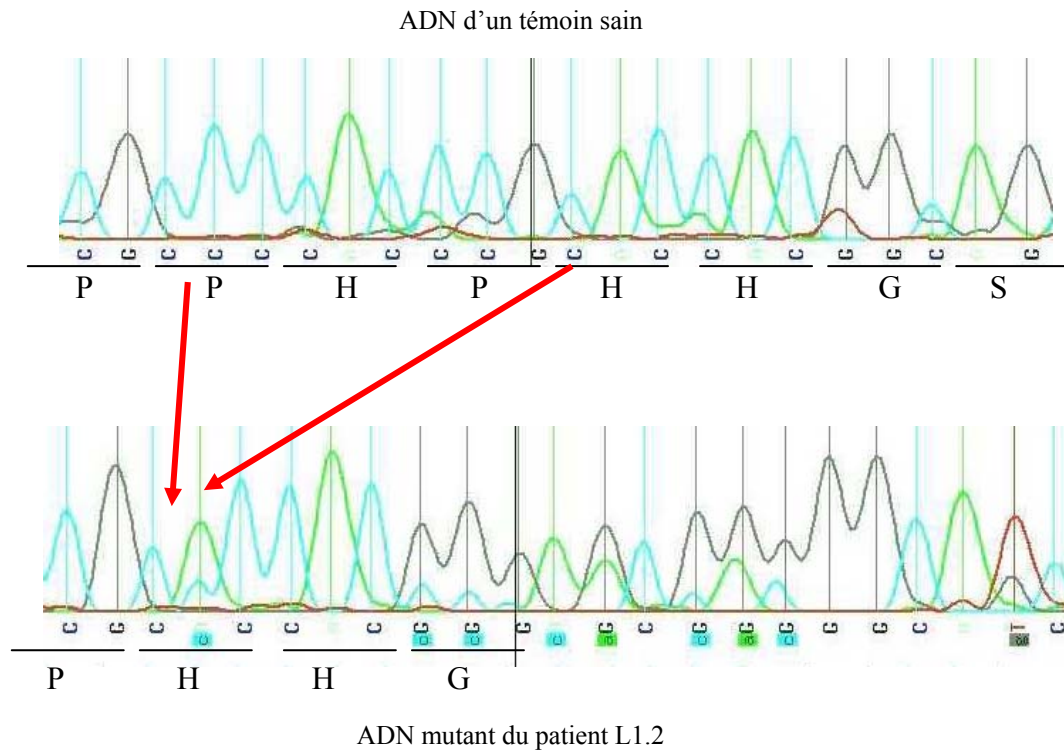


Figure 25B : Séquence de l'exon 2 du gène *KCNC3* chez un témoin sain, et chez le patient L1.2 de la famille libanaise L1, montrant la délétion de 9 bases en position c. 1754. Cette délétion entraîne la perte de 3 acides aminés proline-histidine-proline.

II.2. Etude du gène *CD37*

II.2.1. Choix du gène

CD37* ou *Cluster of differentiation 37 : Il est localisé au niveau du marqueur D19S604, c'est un antigène de surface de la superfamille de tétraspanine. Cette protéine de surface joue un rôle important dans la transduction du signal, les interactions cellulaires, l'activation et le développement cellulaire, d'où le choix de ce gène (Virtaneva KI et al., 1993).

C'est un gène formé de 8 exons codant une protéine de 281 acides aminés, à 4 passages transmembranaires ; les parties N et C terminales sont dans le cytoplasme. Il est exprimé à la surface des lymphocytes B et rarement chez les lymphocytes T.

II.2.2. Stratégie de l'étude

Les amorces introniques ont été désignées à l'aide du programme OSP (Oligo Search Program) (Hillier et Green, 1991), par alignement entre la séquence génomique (Numéro d'accèsion GenBank : AC008687) et la séquence de l'ARNm du gène (Numéro d'accèsion GenBank : NM_001774). Les 8 exons ont été étudiés par SSCP et éventuellement par séquençage (tableau 10).

Tableau 10 : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification, la SSCP et le séquençage des 8 exons du gène CD37

Exon	Taille de l'exon en pb	Séquences des amorces	Taille des produits de PCR (pb)	Température d'hybridation (°C)
1	69	D : 5'-CCC CTG GAA CTT CCT CTT TTG-3' R : 5'-GAA GAT GAG GGC TGG GTT AG-3'	281	63
2	73	D : 5'-CCG CTA ACC CAG CCC TCA TC-3' R : 5'-GGA GAC CCC AGG AAG TTG CTT G-3'	198	65
3	125	D : 5'-CTA GGT GGG AAA TGG GGC TG-3' R : 5'-TGA GGG TGG GGA TAG GAG TG-3'	246	63
4	75	D : 5'-CTC CTA TCC CCA CCC TCA AAA ATG-3' R : 5'-CAC TCC CTT CCC TCT CCT CC-3'	212	64
5	105	D : 5'-CTG GCA CAG CCT GAG AGG GG-3' R : 5'-GGA GTC TCC TCC AAG CAC AGG G-3'	242	64
6	237	6a D : 5'-CTT GTC CCC TGA TCC CCA AC-3' 6a R : 5'-GTG TCC AAG CCT GCT GAG CTG-3'	239	58
		6b D : 5'-CCA GCT CAG CAG GCT TGG AC-3' 6b R : 5'-CTA CTC ACT GAC AGC CCT CCC-3'	163	62
7	84	D : 5'-GGG CTT GAG AGT CCC AGA AAG-3' R : 5'-TTC CCA GGC AAC CGA AGG ACG-3'	223	58
8	78	D : 5'-GTC TCG CCA GCA CCC CTT CG-3' R : 5'-GGC AGC AGG GAA GTG CCC AG-3'	192	62

II.2.3. Résultats

L'étude des régions codantes de ce gène n'a pas permis d'identifier des mutations, mais plusieurs polymorphismes ont été trouvés à l'état hétérozygote chez les différentes familles comme une

transition C>T à la position 108 de la séquence codante d'ADNc (c.108C>T) sans changement de l'acide aminé Isoleucine (p. I36I), et une transition G>A à la position 165 de la séquence codante (c.165G>A) sans changement de l'acide aminé Glutamine (p. Q55Q). Ces polymorphismes n'étaient pas présents chez tous les individus atteints de chaque famille. De plus, on les a trouvés chez des individus normaux. Ce gène est exclu comme étant responsable de bloc de conduction cardiaque.

II.3. Etude du gène *HRC*

II.3.1. Choix du gène

HRC : *Histidine Rich Calcium Binding protein*. Il est localisé entre les marqueurs polymorphes D19S879 et D19S604. Dans le deuxième intron (intron B) de ce gène existe un marqueur microsatellite (GA)_n qui est polymorphe et situé à environ 2800 nucléotides du codon initiateur (Hofmann et al., 1990), et qui a été testé chez les familles atteintes de trouble de conduction (De Meeus et al., 1995). Ce gène est distribué sur une région de 4207 pb, il comporte 6 exons de 2100 pb en total, dont l'exon 1 est le plus grand (1831 pb). Il est très riche en GC (%) ce qui rend le choix des amorces et l'amplification par PCR difficiles. Il code une protéine de 699 acides aminés (Hofmann et al., 1990). La protéine HRC a été décrite pour la première fois chez le lapin par Hofmann et al., en 1989. C'est une protéine du réticulum sarcoplasmique de 165 kDa, qui contient :

- des motifs hautement répétés codés par l'exon 1 (de l'acide aminé 106 à 364). Ils sont de type : BBBABABABA chez l'homme et AAAAAAAAAABBBB chez le lapin. Ces deux types sont riches en histidine, acide glutamique, et acide aspartique.

Le type A présente les séquences consensus :

homme : H R H R/Q G H E - E D D E D D/E D D X X X X X X X X V S T E Y G - H Q A

lapin : H R H R G H R E E E D E D D D E - - - - - G D S T E S D R H Q A

X = acide aspartique ou acide glutamique

Le type B présente les séquences consensus :

homme : H R H Q X H G - X X X E E D E D V S X E H H H H X P S

lapin : H R H Q G H G K E G E E / A E G X S X E D E H H H H V P X

X = aa quelconque

- 13 résidus répétés d'acide glutamique à la position 721 de la protéine chez le lapin.
- 12 résidus consécutifs d'acide glutamique de l'acide aminé 193 à 204 chez l'homme.
- 16 résidus consécutifs d'acide aspartique de l'acide aminé 246 à 261 chez l'homme.
- 14 résidus cystéine en COOH-terminal (codés par l'exon 2 à 6), ayant comme modèle Cys-X-X-Cys. C'est une région très conservée, pouvant suggérer un domaine de ligation avec des métaux lourds, ou des ions métalliques tels que le Zn^{++} (Picello et al, 1992) (Figure 5 et Annexe 2) (Hofmann et al, 1989 et 1990).

L'alignement des protéines entre l'homme, la souris et le lapin a permis de mettre en évidence les domaines conservés. Grâce à celui-ci, on observe que très peu régions sont conservées à part la région N et C- terminale, et la région qui comprend les répétitions de cystéine.

La protéine HRC est abondante dans les tissus musculaires striés cardiaques et squelettiques, ainsi que dans les fibres musculaires lisses de la paroi des artérioles (Pathak et al, 1992). La fonction de cette protéine dans le réticulum sarcoplasmique (RS) est encore peu connue. La protéine jouerait un rôle dans le couplage excitation/contraction en régulant la libération et la capture du calcium intracellulaire par le réticulum endoplasmique (Hofmann et al, 1990). La libération du calcium stocké déclencherait la contraction du muscle et la capture du Ca^{2+} autoriserait le relâchement du muscle (Pathak et al, 1992).

Chez le lapin, la région des motifs répétées de l'acide aminé 199 à 357 de la protéine HRC interagirait avec la triadine. Cette association serait stabilisée par le calcium (Sacchetto et al, 2001). La triadine s'associe avec la calséquestrine, le récepteur à la ryanodine et aux jonctions membranaires, formant un

complexe quaternaire stable présent à la surface de la membrane du réticulum sarcoplasmique. La calséquestrine possède une haute capacité à lier le calcium aux protéines, elle participe aussi à la contraction des muscles en régulant le calcium libéré par le récepteur à la ryanodine. En fait, la calséquestrine amène le calcium aux canaux calciques (récepteurs à la ryanodine). Une quantité importante de calcium est stockée à la surface du RS, les ions Ca^{2+} sont rapidement libérés à travers le récepteur à la ryanodine durant la contraction des cellules musculaires. HRC (autre protéine liant le calcium, interagissant avec la triadine) pourrait, donc être un composant additionnel du complexe quaternaire (triadine, calséquestrine, récepteur à la ryanodine, protéine de jonction). HRC pourrait donc jouer un rôle similaire à la calséquestrine c'est-à-dire un rôle régulateur ou/et un rôle de stockage du calcium (Lee HG et al., 2000)

Les motifs répétés de trinuécléotides (GAG) n et (GAT) n codant respectivement des répétitions d'acide glutamique et d'acide aspartique (Hofmann et al, 1990) présents dans l'exon 1 pourraient voir leur nombre varier (expansion anormale) chez les patients atteints des troubles de conduction. Aucune expansion n'a été retrouvée (De Meeus et al., 1995). Des expansions de trinuécléotides sont impliquées dans plusieurs maladies neuromusculaires dégénératives. Donc, si ce gène est en cause dans le dysfonctionnement du système de conduction cardiaque ce n'est pas par ce mécanisme.

II.3.2. Stratégie de l'étude

L'alignement de séquence a été fait entre la séquence de l'ARNm (Numéro d'accèsion GenBank : NM_002152) et la séquence d'ADN génomique (Numéro d'accèsion GenBank : AC008891). Plusieurs paires d'amorces introniques et exoniques chevauchantes ont été sélectionnées, afin d'amplifier la séquence codante du gène HRC.. L'exon 1, qui couvre environ 2 kb, a été étudié en 6 fragments de PCR chevauchants. La présence de séquences répétées dans l'exon 1 nous a obligé à avoir un fragment de PCR de taille d' environ 1 kb, et l'étude de ce fragment a été faite après digestion

enzymatique, puis d'un clonage dans un vecteur PBlueScript K2+ et suivie de séquençage (tableau 11 : les amorces et les conditions de PCR).

Tableau 11 : Séquences des amorces et les températures d'hybridation utilisées pour l'amplification, la SSCP et le séquençage des 6 exons du gène HRC

Exon	Taille de l'exon (pb)	Séquence des amorces	Taille des produits de PCR	Température d'hybridation en °C
Exon 1P1	1831	R : 5'-TGT GGA GGT GGT GGC GAA GCT-CTG3' D : 5'-CCC CAA AGG GAC AAA GAC CCC AAC-3'	265	66
Exon 1P2		R : 5'-ACC TGA GAC ACC CTC ATC TCC GAC-3' D : 5'-GGG GAT GGG CTA GGC TTC AGA AAC-3'	267	66
Exon 1P3		R : 5'-CAG AGA CCT CCT CAT CTT CTT CCC-3' D : 5'-GGA GCC ACC CAG ACC GTG AAA AG-3'	1047	66
Exon 1P4		R : 5'-GGG GGG TGA TGG CTC ATC TCT TTG-3' D : 5'-GAG GAG ATC ACA GTC CAG TTC GGC-3'	257	66
Exon 1P5		R : 5'-GCC CCA ACC TCA GCC CTC TCT TC-3' D : 5'-CCC AGC CAC AGG CAA AGC CAC-3'	365	65
Exon 1P6		R : 5'-TGC GGG GAC AGG AGG GCA-3' D : 5'-GGA GGA TGA GGA GGA AGG TCA TGG-3'	349	67
Exon 2	71	R : 5'-CCC ACA GCA CCA CCC CAG G-3' D : 5'-CAG CGA GGA GGA AAG CGG TGA G-3'	251	62
Exon 3	69	R : 5'-ATC AGG GGT AAG GGG TTG GGT CAG-3' D : 5'-GGG AAG CGT CCA GGG TGC AG-3'	272	62
Exon 4	55	R : 5'-CCT CTT AGC CCC GCC CCA C-3' D : 5'-CCC ATC CTA ACT CCG CCC CC-3'	228	66
Exon 5	37	R : 5'-AGC TCG TGG AAA GGG GTT GGA AGG-3'	399	66
Exon 6	37	D : 5'-CTC GCA CGC TAT ACT GAG TGG CTG-3'		

II.3.3. Résultats

Nous avons identifié trois polymorphismes. Une transition G>A (c.128 G>A) de la séquence codante, changeant la Sérine en Asparagine (p.S43N). Ce changement de base a été trouvé à l'état hétérozygote et homozygote chez les sujets atteints au sein d'une même famille, ce qui amène à le considérer comme un polymorphisme, les patients de la même famille doivent avoir la même mutation à l'état hétérozygote. De plus, cette Sérine n'est pas conservée avec l'évolution et elle est remplacée par une Asparagine chez le lapin et le rat. Un polymorphisme A>G (c.105A>G) ne changeant pas l'acide aminé Leucine (p. L35L), et une transition C>T (c.57C>T) qui ne change pas l'acide aminé Sérine (p. S19S).

Ces deux polymorphismes ont été également trouvés à l'état homozygote et hétérozygote au sein de la même famille chez les sujets atteints.

II.4. Etude du gène *UI-70K*

II.4.1. Choix du gène

UI-70K : *Small Nuclear Ribonucleoprotein*, localisé entre les deux marqueurs D19S596 et D19S879. Ce gène joue un rôle important dans l'épissage des précurseurs des ARN messagers en ARN messagers matures dans les épisomes. C'est un gène de 44 kb, constitué de 11 exons, très riche en GC, codant une protéine de 52 kDa. Il existe plusieurs isoformes qui sont les produits d'épissages alternatifs : c'est une protéine liant l'ARN, et qui possède un domaine RNP (*RiboNucleoProtein*). Ce dernier constitue le site de liaison avec U1ARNsn, et est codé par 4 exons (5, 6, 7 et 9). La partie la plus conservée (séquence consensus RNP) se trouve dans l'exon 7, alors que l'exon 11, qui constitue la moitié de l'ARNm *UI-70K*, et qui est très riche en GC, contient un domaine arg-asp/arg-ser dans la partie C-terminale dont la fonction reste inconnue. L'organisation générale de *UI-70K* est conservée chez l'homme, la souris et le xénope (Spritz R.A. et al, 1990).

L'exon 1 (311 pb) de ce gène n'est pas codant (partie 5' non traduite), tandis que l'exon 2 (157 pb), contient le codon d'initiation de la traduction.

Les patients atteints de lupus érythémateux disséminé ont des anticorps anti-U1 RNP, et les femmes atteintes de cette pathologie mettent au monde des nouveau-nés atteints de bloc de conduction auriculo-ventriculaire : ceci pourrait être lié au passage dans le sang fœtal d'anticorps maternels qui détruisent les voies de conduction du fœtus ; on parle de bloc de conduction congénital.

II.4.2. Stratégie de l'étude

Les amorces introniques et exoniques chevauchantes ont été déterminées à l'aide du programme OSP, afin d'amplifier les 11 exons du gène U1-70K (Spritz R.A. et al, 1990). Les séquences de référence suivantes ont été utilisées (Numéro d'accèsion GenBank) : M57928, M57929, M57930, M57932, M57934, M57935, M57937, M57939. La richesse de ce gène en GC rend le choix des amorces et la PCR très difficile. L'exon 11 qui couvre environ 1 kb a été étudié en 5 fragments de PCR chevauchants. Le produit d'amplification de la partie 11c a été digéré avec l'enzyme *HaeII*, et le produit d'amplification des exons 3 et 4 a été digéré avec *MboI*, afin de pouvoir les tester en SSCP en réduisant leur taille (tableau 12 : les amorces et les conditions de PCR).

Tableau 12 : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification, la SSCP et le séquençage des 11 exons du gène U1-70K

Exon	Taille de l'exon en pb	Séquences des amorces	Tailles des produits de PCR en pb	Température d'hybridation en °C
2	157	D : 5'-TGC AGA CCC GAT CTA ACC-3' R : 5'-GAC TCG CAA ATC CAA CCC -3'	269	62
3	63	D : 5'- TAT TTT TGT AGG GGG TGG -3' R : 5'- AAA ACA GTG CTT GTG AAG TG-3'	502	54
4	55	D : 5'- TAT TTT TGT AGG GGG TGG -3' R : 5'- AAA ACA GTG CTT GTG AAG TG-3'	502	54
5	65	D : 5'- GTT TTC TTC TTG CCT CTG-3' R : 5'- TAG CCT ATT TGA CCT TTG TG-3'	231	57
6	63	D : 5'-CTG GGT CTG GCA CAA AGG TC-3' R : 5'- TCT CCC TCC CTC TCA GGA TAC-3'	240	61
7	82	D : 5'-CTG GTG TGC AGG CTG TTG TGG G-3' R : 5'- AAT GTC AGG TGT GGC AGG GTG GGG-3'	264	69
8	72	D : 5'- CCC CTA CAG TTC CAA AGC CCC C -3' R : 5'- CTC GCT GCT CCT GAG CTG CC-3'	279	69
9	102	D : 5'-TGT GCG TGA TGA TGG GAC -3' R : 5'- CAG AGA AGG GAG AAC AAG G-3'	269	61
10	88	D : 5'- GAT GAA CTG CAC GGG GGG AC-3' R : 5'- AGA CCT GTG TGG CTG GGC TC-3'	300	69
11a	817	D : 5'- GGG GCT GAT GTG AAC ATC CG-3' R : 5'- TTC TCG CTC CTT GTC TCG CTC C -3'	235	61
11b		D : 5'- CCC TCC CCG CTT CCG CAC AG-3' R : 5'- TCC GCC ATG TCG CCA CCG CC-3'	281	69
11c		D : 5'- GGA GCG GAG CAA GGA CAA GGA C-3' R : 5'- TTG CCC AGA CCC TCC AGC CC-3'	390	69
11d		D : 5'- GGA TCG TGA CCG TGA CCG TG-3' R : 5'- GTT GGG GGA GGG GAT GAC AG-3'	285	61a 63
11e		D : 5'- ATG GGT ATT TGA TGG AGG -3' R : 5'- CTA TCA AGT CAG GAA CAA C-3'	259	58

II.4.3. Résultats

Aucune mutation n'a été trouvée, un polymorphisme a été mis en évidence. Il s'agit d'une transversion à l'état homozygote dans l'intron 6 (IVS6+72A>C).

II.5. Etude du gène la *NT-4* ou la Neurotrophine 4 ou 5

II.5.1. Choix du gène

Ce gène est localisé avec son pseudogène au niveau du marqueur D19S879. Il existe deux nomenclatures pour ce gène selon les équipes qui l'ont cloné, NT-4 (Nancy et al., 1992), NT-5 et son pseudogène NT-6 (α , β , γ) (Berkemeier L.R. et al., 1992). C'est un gène qui est composé d'un seul exon, de 632 pb, codant une protéine de 14 kDa. Il appartient à la famille des neurotrophines, incluant le NGF (*Nerf Growth Factor*), le *BDNF* (*Brain derived growth factor*) et NT-3, agissant sur des récepteurs de type Tyrosine Kinase. La neurotrophine est responsable de la survie et la différenciation des neurones, et est exprimée dans les cellules neuronales du cerveau, mais aussi dans le cœur, d'où son choix, les tissus de conduction ayant des caractéristiques neuronales musculaires squelettiques (Gourdie et al., 1995).

II.5.2. Stratégie de l'étude

Les amorces introniques et exoniques chevauchantes (tableau 13) ont été choisies après alignement de l'ARNm de ce gène (Numéro d'accèsion GenBank : NM_006179) et la séquence génomique (Numéro d'accèsion GenBank : AC008687), grâce au logiciel OSP. Ce gène a été étudié par SSCP et éventuellement séquençage.

Tableau 13 : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification, la SSCP et le séquençage du gène

NT-4

Exon ou Fragment	Taille de l'exon en pb	Séquences des amorces	Tailles des produits de PCR en pb	Température d'hybridation en °C
NTa	632	D :5'- GGT TCC CAA CTT TCC CCA C-3' R :5'- AGC CTC CAG CAG GAA GAG CAG-3'	277	65
NTb		D :5'-TCC CAA CCC CCA CCC TCA AC-3' R :5'- TCG CCC AAC ACC TCC ACC TC-3'	300	65
NTc		D :5'- AGC GAA ACT GCA CCA GCG AG-3' R :5'- CGG TCA ATG CCC GCA CAT AG-3'	298	65
NTd		D :5'- CAA GGC TGA TAA CGC TGA GG-3' R :5'- TGA GTT CCC AAA CTG GGG TC-3'	299	61

II.5.3. Résultats

Aucune modification de séquence n'a été trouvée : ce gène est donc exclu dans nos familles.

II.6. Etude du gène BAX

II.6.1. Choix du gène

BAX : *Bcl2 Associated X Protein*, est localisé entre les marqueurs GYS1 et D19S879. Il intervient, de façon contraire à Bcl2, dans la régulation de l'apoptose : la protéine Bax a un effet pro-apoptique, induit par déprivation de cytokine dépendante de l'IL-3, contrairement à Bcl2, qui inhibe le processus de mort cellulaire. Le gène contient 6 exons : les exons 3, 4 et 5 codent pour des domaines BH (Bcl2 homology) et l'exon 6 code pour le domaine C-terminal d'ancrage dans la membrane. Ce gène est l'objet des plusieurs épissages alternatifs permettant ainsi la production de plusieurs isoformes (α , β , δ , γ , ϵ et ω). l'intron 5 de ce gène, possède plusieurs sites d'épissages, et selon le site d'épissage dans l'intron 5, on trouve trois isoformes (l'isoforme BAX β contient 630 pb de l'intron 5, BAX ϵ contient 97 pb, et BAX ω contient 49 pb de l'intron 5). Cette protéine est exprimée dans des nombreux tissus, dont le cœur. Toutes les isoformes de la protéine Bax peuvent former des hétérodimères avec Bcl2 ou des homodimères grâce aux domaines BH (Oltvai Z.N. et al., 1993, Zha H. et al., 1996). La formation

de l'un ou de l'autre de ces dimères module le destin de la cellule (Zhou M. et al., 1998) par le choix ou non de l'activation de la voie conduisant à la mort cellulaire (l'homodimère Bax-Bax aboutit à la mort cellulaire). Ce gène a été choisi, en supposant qu'une ou des mutations dans ce gène, à certains stades du développement, pouvaient favoriser la formation des homodimères (BAX-BAX) et aboutissant à la mort des cellules du système de conduction cardiaque.

II.6.2. Stratégie de l'étude

Plusieurs paires d'amorces introniques ont été sélectionnées afin d'amplifier la séquence codante du gène Bax (exon 1 à exon 6) et l'intron 5. L'alignement de séquence a été faite entre la séquence de l'ARNm (Numéro d'accèsion GenBank : AF305550) et la séquence d'ADN génomique (Numéro d'accèsion GenBank : AC008749). Les PCR et la SSCP ont été optimisées. L'exon 1 et l'intron 5 ont une taille supérieure à 300 pb, pour cela une digestion enzymatique, permettant de générer deux fragments inférieure 300pb, a été réalisée préalablement à la SSCP. L'exon 1 a été digéré avec *Sma* I, et l'intron 5 avec *Mbo*II (tableau 14).

Tableau 14 : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification, la SSCP et le séquençage des 6 exons du gène Bax

Fragment	Taille de l'exon ou intron	Séquence des amorces	Tailles des produits de PCR en pb	Température d'hybridation en °C
Exon 1	34	D : 5'-ATCGGG AGA TGC TCA TTG GAC-3' R : 5'- GGG ATC AGA GAG CCA GGA AC -3'	428	64
Exon 2	54	D :5'-CCG TGA GTC TCC ACA GTC TCC-3' R : 5'- CAT TCG CCC TGC TCG CAT CC-3'	245	58
Exon 3	150	D :5'- GGC ACA GAT TTG AGG AGT GAC-3' R : 5'- CTT AGG GGA GGA GGA GAA TG-3'	300	58
Exon 4	135	D : 5'- ATC TTT AGT GTG CGG TGG ATG-3' R : 5'- GTT GAT ACC ACG ATC CCC AG-3'	296	62
Exon 5	105	D :5'- GGG GAG GCA AAG AAT TGA CAA AGG-3' R : 5'- TGG GGG TGA GGA GGC TTG AG-3'	229	62
Intron 5	459	D : 5'- GCA GTG GGG ACA AGG TTC AG-3' R : 5'- TGA GCA ATT CCA GAG GCA GTG GAG-3'	459	65
Exon 6	126	D : 5'- ATG CCC GTT CAT CTC AGT CC-3' R : 5'-ACC CCT CCC AGA AAA ATG CC-3'	299	64

II.6.3. Résultats

Au total, 2152 pb ont été testées, et aucune mutation n'a été mise en évidence. Sauf un polymorphisme. Il s'agit d'une transition A>G à l'état homozygote à la position +446 de l'intron 3 (IVS3+446A>G), qui a été retrouvé chez les deux familles libanaises L1 et L2. Ce gène est exclu puisqu'on ne cherche pas une mutation homozygote.

II.7. Etude du gène *NUCB1*

II.7.1. Choix du gène

***NUCB1* : Nucleobinding 1** : Il est localisé au niveau du marqueur polymorphe GYS1. Il est reparti sur 32 kb, et comprend 13 exons dont 12 sont codants. L'ADNc comporte 1386 pb et code une protéine de 462 acides aminés (Miura et al., 1996). Ce gène est exprimé dans de nombreux organes : le cœur, le cerveau, les poumons, le foie, le placenta, les muscles squelettiques, etc...., et il est fortement exprimé dans le coeur (Bortoluzzi S. et al., 2000). Il est également fortement exprimé durant la vie fœtale, d'où la suspicion d'un rôle probable lors du développement pouvait être à l'origine de troubles de conduction cardiaque.

La présence d'une région promotrice sans boîte TATA laisse penser que le gène *NUCB1* peut avoir un rôle de gène domestique à expression ubiquitaire. Jusqu'à présent le rôle exact de ce gène est inconnu dans la cellule. Ce gène possède une homologie de séquence avec le gène *NEFA*, dont le rôle n'a pas été clairement identifié (Barkinol-Watanabe et al., 1994, Otte et al., 1999).

La protéine comporte 4 types de motifs fonctionnels :

- un peptide signal jouant un rôle dans la sécrétion de la protéine.
- une région riche en acides aminés basiques, qui est un motif de site de liaison à l'ADN.

- Deux motifs EF (*EF hand*), qui sont des motifs fixant le calcium.
- Un motif de type fermeture éclair de leucine (*leucine Zipper*), qui est un motif de dimérisation (Miura et al.,1992/94).

II.7.2. Stratégie de l'étude

Les amorces introniques ont été choisies après alignement de l'ARNm de ce gène (Numéro d'accèsion GenBank : NM_006184) et la séquence génomique (Numéro d'accèsion GenBank : AC026803). La recherche de mutation a été réalisée par PCR, SSCP et éventuellement séquençage (tableau 15).

Tableau 15 : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification, la SSCP et le séquençage des 12 exons du gène *NUCB1*

Exon	Taille de l'exon en pb	Séquences des amorces	Tailles des produits de PCR en pb	Température d'hybridation en °C
1	29			
2	146	2D 5' AGG CTT GGG ACA GAC ATT ATG 3' 2R 5' TGC AGG AGC TGT AGT ACC AC 3'	253	54°
3	108	3D 5' GTA AAA ACT GAG TCC CTT GTC AGC 3' 3R 5' AGT CCT CCC CTG AAC TCT GC 3'	290	54°
4	133	4D 5' AGA GAA GAC AGA GAG CAG GC 3' 4R 5' TAG CAC ACA ACC ACC TGG AG 3'	271	62
5	104	5D 5' CAA GAT GGG GGT TCT GAA AG 3' 5R 5' AGA GAA CAC CAG CAG GAA TG 3'	272	56
6	186	6D 5' ATT GGG GGG TGG GCA GAG GG 3' 6R 5' TGG ATG TGG TAG GGA GTG GAT GGG 3'	280	68
7	91	7D 5' GTT TGT TGG ATG AGG GTA AAG 3' 7R 5' TAG CAT TCA GGT CCT AGA AG 3'	250	54
8	59	8D 5' CCC ACA TCA GCC CAA AAT TTC TTC 3' 8R 5' CCA GGG GGA TTT AAG GGG AC 3'	233	52
9	93	9D 5' TGG GAG TTG AAG TTG TCG GG 3' 9R 5' AGA TAA GGG TGA GTG ACA GAG 3'	228	56
10	93	10D 5' GTG ATG AAG AAT GTG AGG TGG 3' 10R 5' CAG AGA GAA AGA GAA GGG GC 3'	270	60
11	171	11D 5' CCC ATT GGC ACA ACC CTC TC 3' 11R 5' CCT TCC CAG CTT CTG GAC AC 3'	336	60
12	106	12D 5' GGC TGC TGT GAA GTC TCC GTT TGG 3' 12R 5' CCT CCT CCC TGG ACT AGG GC 3'	227	52
13	108	13D 5' ATG TCC TGT GCC ACC ATT CC 3' 13R 5' CTG ACT GTG CCA CTT CAT CC 3'	220	60

II.7.3. Résultats

Aucune mutation n'a été trouvée dans les différentes familles. Seuls des polymorphismes ont été mis en évidence. Une transversion C>G à la position 253 de la séquence codante dans l'exon 4 (c.253C>G), changeant l'acide aminé Leucine en Valine à la position 85 de la séquence protéique (p.L85V) a été retrouvée à l'état homozygote et hétérozygote. Cinquante deux chromosomes normaux ont été testés, et ce même polymorphisme est présent chez des individus sains. Un autre polymorphisme dans l'intron 6 en position (IVS6+3G>A) à l'état homozygote ou hétérozygote a été retrouvé chez des membres des différentes familles. Ce gène est donc exclu.

II.8. Etude du gène *KCNJ14* ou Kir 2.4

II.8.1. Choix du gène

KCNJ14 ou **Kir2.4** *Inwardly Rectifying Potassium Channel*: ce gène est localisé entre les deux marqueurs D19S606 et D19S596. Il code un canal potassique de forte rectification entrant, c'est-à-dire qu'il conduit préférentiellement le potassium vers l'intérieur de la cellule pour des potentiels de membrane hyperpolarisants, et conduisent peu de potassium vers l'extérieur de la cellule même pour des potentiels très positifs. Il est formé de l'assemblage de 4 sous-unités α et chaque sous-unité α est formée de deux segments transmembranaires. Ce gène joue plusieurs rôles dans la cellule, comme l'homéostasie de K^+ , le maintien du potentiel de la membrane et le contrôle de l'activité pacemaker du cœur (Töpert C. et al., 2000). Ce gène est formé de deux grands exons (1308 nucléotides) séparés par un intron de 1742 pb, codant une protéine de 436 acides aminés. L'exon 1 qui code 238 a.a., cette partie du canal contient les deux segments transmembranaires M1 et M2 et la région formant le pore H5. La partie cytosolique C-terminale est codée par l'exon 2. Il existe une forte homologie de séquences entre l'homme et la souris, montrant que ce gène est fortement conservé entre les espèces et durant l'évolution.

Des mutations dans le gène *KCNJ12*, codant le canal kir2.1 chez l'homme ont été identifiées chez des sujets atteints du syndrome d'Andersen, associant un syndrome du QT long à une paralysie périodique du muscle squelettique (Nakamura T.Y. et al., 1998, Tristani-Firouzi M. et al., 2001) : d'où le choix de ce gène.

II.8.2. Stratégie de l'étude

Plusieurs paires d'amorces introniques et exoniques chevauchantes ont été créées, afin d'amplifier la séquence codante du gène *KCNJ14*. L'alignement de séquence a été fait entre la séquence de l'ARNm (Numéro d'accèsion GenBank : XM_009109, NM_170720) et la séquence d'ADN génomique (Numéro d'accèsion GenBank : AC073131). L'exon 1 qui couvre environ 700 pb a été étudié en 4 fragments de PCR chevauchants, et l'exon 2 (600 pb) en 3 fragments (tableau 16 : les amorces et les conditions de PCR).

Tableau 16 : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification, la SSCP et le séquençage des 2 exons du gène *KCNJ14*

Exon	Taille de l'exon en pb	Séquences des amorces	Tailles des produits de PCR (pb)	Température d'hybridation (°C)
Exon 1a	713	D : 5'-GTT TCT TGT CCC AGC AGG TTG-3' R : 5'-GTG GTG AAC AGG TCG CTC AG-3'	308	63
Exon 1b		D : 5'-GTG CGT TTC GTA AAC CTG GGT GGC-3' R : 5'-GGC ACT CCT CGG TGA CGC TG-3'	298	63
Exon 1c		D : 5'-CGT CCA TCG GCT ACG GCG TG-3' R : 5'-CAT GAG GCA GAG GCG GTG GTC-3'	211	66
Exon 1d		D : 5'-GTC TTC AGC GAG AAC GCC GTC-3' R : 5'-TTG TAG TCC ACG CCC CCT CC-3'	226	66
Exon 2a	597	D : 5'-ACT TCG TCT CTG CCC GTG TC-3' R : 5'-GCG ACA CTG TGT GGT CAT GG-3'	298	62
Exon 2b		D : 5'-CTT TGA GCT GGT GGT CAT TC-3' R : 5'-CAA AAT GCA GTC AGA GAG CC-3'	279	62
Exon 2c		D : 5'-GCA GAG CAG GCT TCC CAC AG-3' R : 5'-TGC CCC CAT CCC AGG AGA GAG-3'	291	64

II.8.3. Résultats

Une transition c.1292C>T dans la séquence codante, à l'état hétérozygote a été identifiée, changeant une Alanine en Valine à la position 431 a.a. au niveau de la protéine (p.A431V) dans une famille française (figure 26A et 26B). Pour pouvoir confirmer qu'il s'agissait d'une vraie mutation, nous avons testé 210 chromosomes de témoins sains, cette même variation a été retrouvée chez 6 individus sains. Il s'agit donc d'un polymorphisme. Aucune autre mutation n'a été identifiée, ce gène est donc exclu.

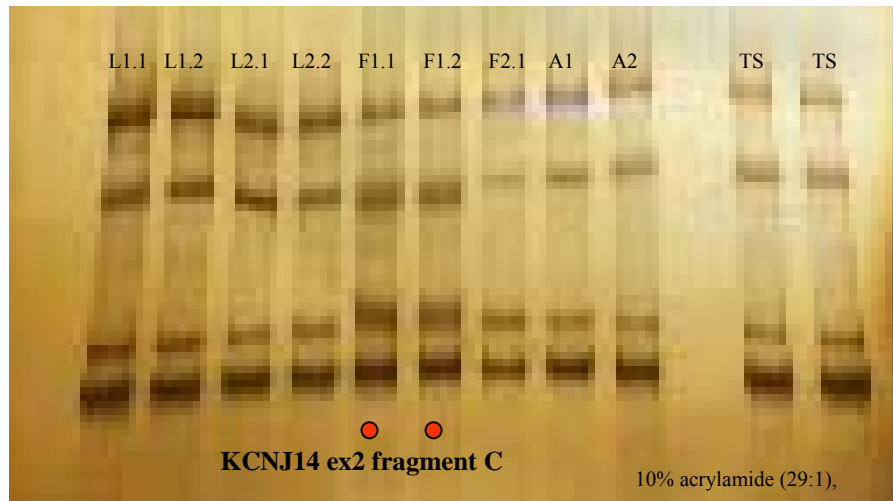


Figure 26A : Gel SSCP de l'exon 2, fragment C du gène *KCNJ14*, L1.1 et L1.2 sont des patients de la famille libanaise L1, L2.1 et L2.2 sont des patients de la famille libanaise L2, F1.1 et F1.2 sont des patients de la famille française F1, F2 est un patient de la famille française F2, A1 et A2 sont des patients de la famille allemande, TS est un témoin sain. On observe un profil de migration différent chez F1.1 et F1.2.

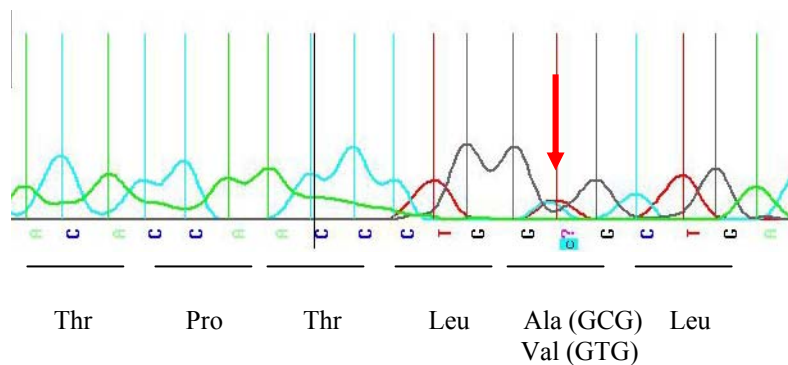


Figure 26B : Séquence de l'exon 2 du gène *KCNJ14* chez un patient de la famille Française F1, montrant une hétérozygotie *c.1292C>T* de la séquence codante, changeant une Alanine en Valine (*p.A431V*) de la protéine.

II.9. Etude du gène *CaBP3/5*

II.9.1. Choix du gène

CaBP 3/5 : pour *Calcium Binding Protein 3 and 5*, les deux gènes sont localisés entre les deux marqueurs D19S606 et D19S596. Ce deux gènes comportent 6 exons dont les 3 premiers se chevauchent sur les brins complémentaires d'ADN dans un sens inverse. La CaBP3 code une protéine de 193 acides aminés et la CaBP5 une protéine de 173 acides aminés. Ce sont des gènes qui possèdent 4 motifs E-F liant le calcium dont 2 motifs (EF3 et EF4) sont fonctionnels pour CaBP3 et trois motifs (EF1, EF3 et EF4) sont fonctionnels pour CaBP5. Deux tiers de l'ADNc de CaBP3 ont 99.5% d'homologie avec la terminaison 3' de l'ADNc du gène CaBP5. Du côté 5', la séquence de CaBP3 est complémentaire et inverse du gène CaBP5, il y a donc un chevauchement de ces deux gènes (3 premiers exons) (figure 27). CaBP3 a un exon supplémentaire de 10 bases nommé 3b. Les jonctions intron/exon du gène CaBP5 sont gt-ag, et la résultante du chevauchement partiel de ces deux gènes est que les jonctions intron/exon de CaBP3 sont ct-ac. Ils appartiennent à la famille de CaBPs qui présentent de fortes homologies entre eux (96 %) et avec la calmoduline CaM (60%). Ces gènes sont

exprimés dans de nombreux tissus notamment la rétine (Haeseleer F. et al., 2000). Ils jouent un rôle important dans la transduction du signal et l'activation cellulaire. D'où le choix de ce gène.

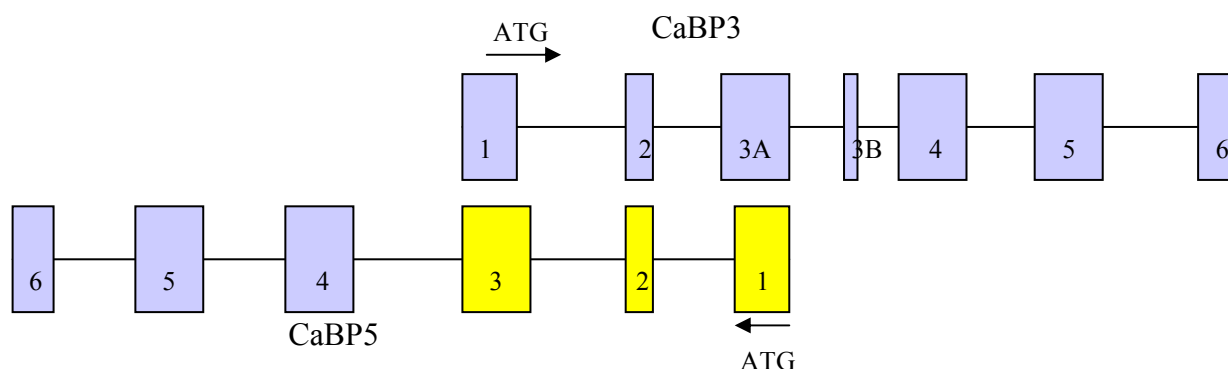


Figure 27 : Schéma de deux gènes *CaBP3* et *CaBP5*.

II.9.2. Stratégie de l'étude

Les amorces introniques ont été créées après l'alignement entre la séquence génomique (Numéro d'accèsion GenBank : AC010330) et les séquences de l'ARNm des deux gènes (Numéro d'accèsion GenBank : *CaBP3* :NM_016367, *CaBP5* : NM_019855). Les exons ont été étudiés par SSCP et éventuellement séquençage (tableau 17 : Les amorces et les conditions de PCR).

Tableau 17 : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification, la SSCP et le séquençage des exons du gène *CaBP3* et *CaBP5*

Exon	Taille de l'exon en pb	Séquences des amorces	Tailles des produits de PCR (pb)	Température d'hybridation (°C)
<i>CaBP3</i> Exon 1	14	D : 5'-TCC TTA CAA GAG ATG AAC CC-3' R : 5'-ATA GCT TCA AGA GAT GCC AC-3'	133	67
<i>CaBP5</i> Exon 1	62	D : 5'-CTG GAG AAG ATA AGG AGG CTG-3' R : 5'-TTC TTT GTC CCA CAC CCC TG-3'	222	65
Exon 2	30	D : 5'-GGA GAG AGA GAA TGG AAA GAG-3' R : 5'-TTG AGT GGG AAG AGA GAG GG-3'	281	58
<i>CaBP3</i> Exon 3	237	D : 5'-CCT TCT TTG TCC CAC ACC CC-3' R : 5'-TGC ATT TCC CCA CCC ATA TCA TTC-3'	384	65
<i>CaBP5</i> Exon 3	143	D : 5'-TGC CAC TCT TCC CCA CTG AC-3' R : 5'-CTC TTA ACC TCT ACA TCC TTC CC-3'	282	62
Exon 4	109	D : 5'-ACT CGA AGC ACA AAG GA GG-3' R : 5'-CAT GGC ATT GGC TAA TTA CAG G-3'	262	60
Exon 5	147	D : 5'-CTA TCA TCA TTG TCA TTG CTG G-3' R : 5'-TGA CAG TGA GTT GGA AGT GG-3'	265	58
Exon 6	25	D : 5'-AAT AAT GTT GGG GGC TTT TGC-3' R : 5'-GCT TTT GGG CTT TGG TTC TC-3'	164	60

II.9.3. Résultats

Nous avons trouvé dans la famille libanaise L1 deux transversions à l'état hétérozygote G>A (Figure 28A et 28B)(c. 338G>A et c.332G>A de la séquence codante du gène CaBP3 et CaBP5 respectivement) dans l'exon 4, changeant ainsi l'Arginine en Glutamine (p.R130Q du CaBP3 et p.R111Q du CaBP5), dans un domaine conservé et l'Arginine à cette position est conservée à travers l'évolution. Deux cents chromosomes des témoins sains ont été testés par SSCP, et cette variation faux-sens a été retrouvée dans 1% de la population. Ce résultat a été confirmé par digestion enzymatique avec *AciI*, et par séquençage, il s'agit donc probablement d'un polymorphisme. De plus, cette variation de séquence a permis de mieux délimiter l'intervalle de la mutation du côté centromérique puisqu'un des malades a une recombinaison centromérique par rapport à D19S596, et n'est pas porteur de ce variant. Ce gène est donc exclu.

Par ailleurs, plusieurs autres polymorphismes ont été trouvés dans différents exons et chez les différentes familles : une transition à l'état hétérozygote (c.437T>C, c.338T>C de la séquence codante CaBP3 et CaBP5 respectivement) changeant la Valine en Alanine (p.V146A du gène CaBP3 et V128A du gène CaBP5), une transition à l'état hétérozygote C>T (c.277C>T) de la séquence codante de l'exon 3 du gène CaBP3 sans changement de l'acide aminé Leucine (p.L93L), une transversion à l'état hétérozygote (c. 177G>T) de la séquence codante de l'exon 3 du gène CaBP5 sans changement de l'acide aminé Thréonine (p.T59T), une hétérozygotie T>C à la position IVS2+77T>C.

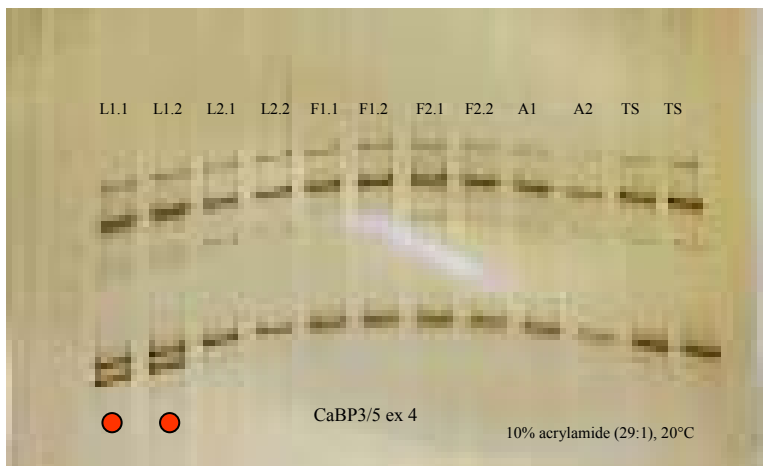


Figure 28A : Gel SSCP de l'exon 4, du gène CaBP3/5, L1.1 et L1.2 sont des patients de la famille libanaise L1, L2.1 et L2.2 sont des patients de la famille libanaise L2, F1.1 et F1.2 sont des patients de la famille française F1, F.1 et F2.2 sont des patients de la famille française F2, A1 et A2 sont des patients de la famille allemande, TS est un témoin sain. On observe un profil de migration différent chez L1.1 et L1.2.

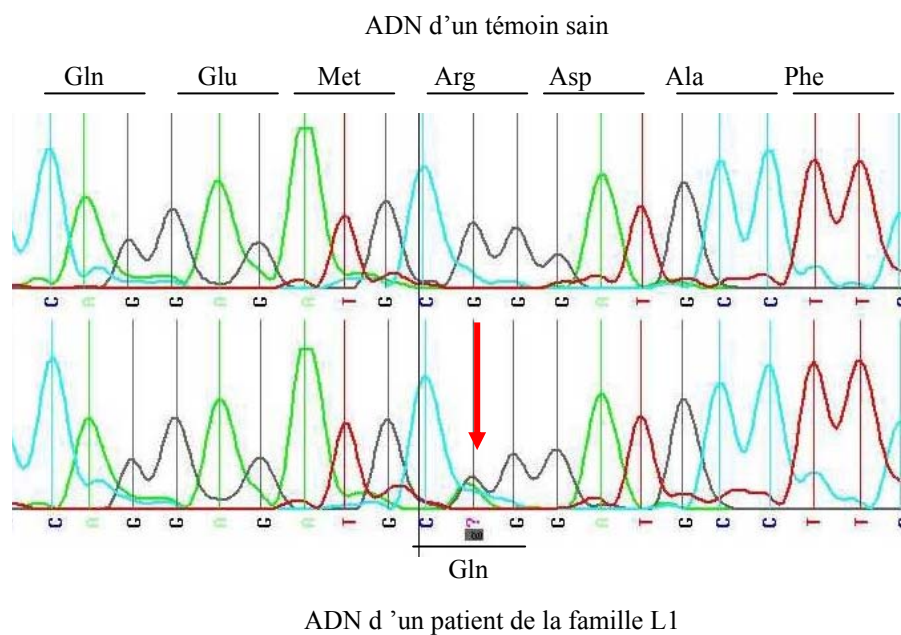


Figure 28B : Séquence de l'exon 4 du gène CaBP3/CaBP5 chez un patient de la famille libanaise L1, montrant une hétérozygotie G>A, changeant ainsi l'Arginine en Glutamine.

II.10. Discussion

Jusqu'à présent, la recherche des mutations par SSCP et séquençage nous a permis d'éliminer les parties codantes de 9 gènes, sans exclure les séquences régulatrices, promotrices et introniques, dans nos familles avec bloc de conduction cardiaque familiale isolé lié au chromosome 19q13.3. Seuls des polymorphismes ont été identifiés dans les différents gènes.

Au début de l'étude, dans cet intervalle relativement grand, il semblait n'y avoir que peu de gènes et nous avons commencé à tester ces gènes candidats par la recherche de mutations par SSCP. Avec le progrès du séquençage du génome humain, l'intervalle dans lequel se trouve la mutation s'avère maintenant être très riche en gènes (plus de 100). La recherche des mutations par SSCP ne semble pas suffisamment adaptée à cette étude. Cette technique est longue et nécessite la mise au point des conditions de migration pour chaque fragment de PCR. Elle n'est pas sensible à 100% pour la détection de mutation, elle détecte les petites délétions ou insertions mais présentent une sensibilité bien plus faible pour les substitutions nucléotidiques (mutations non-sens et faux-sens) (Grompe, 1993). En plus, cette technique qui est basée sur l'amplification de petits fragments par PCR ne permet pas l'identification des réarrangement génomiques, comme les délétions, insertions ou duplications de grande taille.

La séquence génomique de cette région n'est pas tout à fait complète, il reste encore des zones mal ordonnées, et mal orientées. Par exemple, au moment où les gènes CaBP3et5 étaient testés, ces deux gènes étaient présents dans l'intervalle de la mutation, mais quelques mois plus tard, ils étaient exclus de cet intervalle, montrant la rapidité et la progression de séquençage du génome humain. Cependant, une transversion G>A (c. 338G>A et c.332G>A de la séquence codante du gène CaBP3 et CaBP5 respectivement) nous a permis de délimiter l'intervalle de la mutation du côté centromérique.

La recherche des mutations n'est pas suffisante pour identifier le gène responsable de cette maladie, surtout pour un chromosome très riche en gènes comme le chromosome 19 (plus de 100 gènes dans

l'intervalle concerné, voir page suivante) il faut donc utiliser une approche complémentaire pour identifier des gènes candidats comme par exemple des gènes qui sont spécifiquement exprimés dans le tissu de conduction cardiaque.

II.11. Gènes sur 19q13.3 entre D19S606 et D19S601

- 1 Les gènes ou les EST en gras sont exprimés dans les tissus cardiaques, dans l'intervalle entre D19S606 et D19S601 (Bortoluzzi S. et al., 2000, Hwang D.M., et al., 1997),
- 1 Les gènes en italique sont les gènes qui ont été étudiés pour la mutation,
- 1 *: bornes de la mutation, exclues,
- 1 Les gènes qui sont hypothétiques ne sont pas mentionnés.

▪ SLC8A2		
▪ KPTN	Actin associated protein 2E4/Kaptin	
▪ EST RH1331		
▪ GLTSCR2		
▪ EHD2		
▪ SEPW1		
▪ CRX		
▪ SULT2A1		
▪ ELSPBP1		
▪ <i>CABP5*</i>		
▪ PLA2G4C	Phospholipase A2 groupe IVC (cytosolic)	
▪ LIG1	Ligase I, DNA ATP-dependent	
▪ KDELR1	KDEL (Lys-Asp-Glut-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 1	
▪ TUCAN	Tumor up-regulated card-containing antagonist caspase nine	
▪ SYNGR4		
▪ GRIN2D	Glutamate receptor ionotropic, N-methyl D-aspartate 2D	
▪ GRWD	Glutamate rich WD repeat protein	
▪ <i>KCNJ14</i>	<i>Inward rectifying potassium channel</i>	
▪ PSCD2	Slekstrin homology	
▪ SULT2B1	Sulfotransferase family, cytosolic 2B member 1	
▪ RPL18	Ribosomal protein 18	
▪ SPHK2	Sphingosine Kinase 2	
▪ DBP D	Site albumin promoter (albumin D-box) binding protein	
▪ EST	Expressed sequence tass	
▪ CA11	Carbonic Anhydrase	
▪ EMP3	Epithelial membrane protein 3	
▪ FUT2	Fucosyltransferase 2	
▪ FUT1	Fucosyltransferase 1	D19S596
▪ FGF21	Fibroblast Growth Factor 21	
▪ BCAT2	Branched Chain Aminotransferase 2 , mitochondrial	
▪ HUM2DD	Dimeric dihydriol dehydrogenase	
▪ PLEKH4	Pleckstrin homology domain containing family A (phosphoinositide binding specific) member 4 (PLEKHA4)	
▪ PPP1R15A	Protein phosphatase 1, regulatory inhibitor subunit 15A	
▪ GADD34	Growth Arrest and DNA damage inducible 34	
▪ TULP2	Tubby Like Protein 2	
▪ EST	Expressed Sequenced Tag	
▪ GYS1	Glycogen Synthetase	GYS1
▪ <i>NUCB1</i>	<i>Nucleobindin 1</i>	
▪ DHDH	Dihydrodiol dehydrogenase	
▪ <i>BAX</i>	<i>Bcl2 associated X protein</i>	
▪ FTL	Ferritin light Chain	
▪ RUVBL2	RUVB (E-Coli homology like 2)	D19S879 D19S1194
▪ CGB	Chorionic Gonadotropin beta polypeptide	

▪ NTF6A	Neurotrophin 6A	
▪ NTF6G	Neurotrophin 6G	
▪ CGB2	Chorionic Gonadotropin beta polypeptide 2	
▪ CGB1	Chorionic Gonadotropin beta polypeptide 1	
▪ NTF6B	Neurotrophin 6B	
▪ CGB5	Chorionic Gonadotropin beta polypeptide 5	
▪ CGB8	Chorionic Gonadotropin beta polypeptide 8	
▪ CGB7	Chorionic Gonadotropin beta polypeptide 7	
▪ <i>NTF5</i>	<i>Neurotrophin-4 /5</i>	
▪ <i>KCNA7</i>	<i>Potassium channel de type Shal</i>	
▪ <i>U1-70K</i>	<i>U1 small nuclear ribonucleoprotein de 70KDa</i>	
▪ LIN-7B	LIN-7B protein likely ortholog to mouse lin-7B integrin chain	
▪ PPFIA3	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF) interacting protein (liprin), alpha3	
▪ <i>HRC</i>	<i>Histidine rich calcium binding protein</i>	<i>HRC intB D19S1193</i>
▪ TRPM4	Transient receptor potentiel cation channel subfamily M, member 4	
▪ HFHD	Human 10-formyltetra hydrofolate dshydrogenase	
▪ NTT5	Na ⁺ /Cl ⁻ dependent neurotransmitter transporter	
▪ <i>CD37</i>	Cluster of differentiation 37	D19S604
▪ TEAD	Domain similar to TEA family member 2	
▪ SGY1	Soggy gene	
▪ NOSIP	eNOS interacting protein	
▪ RPS11	Ribosomal Protein S11	
▪ RPL13A	Ribosomal Protein S13a	
▪ FLT3LG	Fms related tyrosine kinase 3 ligand	
▪ EST N86166	Highly basic protein mRNA	
▪ EST WI-9028		
▪ FCGRT	Fc fragment of Igg, receptor, transporter α	
▪ SLC17A7	Solute carrier family 17(Na-dependent inorganic phosphate) member 7	
▪ PRRG2	Proline rich glutamate (G-carboxyglutamic acid)	
▪ RRAS	Related Ras viral (r-ras) oncogene homologue	
▪ SR-A1	Serine-Arginine-rich-premRNA splicing factor SR-A1	
▪ IRF3	Interferon regulatory factor 3 (marqueurs polymorphe)	
▪ RPS9	Ribosomal protein 9	
▪ BCL2L12	Bcl2 like proline-rich protein 12	
▪ HRM1TL2	Methyltransferase S.Cerevisae-like 2	
▪ TSKS	Testis specific kinase substrate	
▪ PTOV1	Prostate tumor overexpressed gene 1	
▪ PNKP	Polynucleotide Kinase 3'-phosphatas	
▪ NUP62	Nucleoporin 62 Kp	
▪ ATF5	Activating transcription factor 5	
▪ VRK3	Vaccina related kinase 3	
▪ ZNF	Zinc finger protein	
▪ EST	Weakly similar to PSF-Human PTB-associated splicing factor	
▪ SIGLEC11	Sialic acid binding Ig like lectin 11	D19S867 D19S904 D19S866
▪ <i>KCNC3</i>	<i>Potassium channel type Shaw</i>	
▪ NAP1	Pronapsin A	
▪ NR1H2	Nuclear receptor subfamily, group H member 2	
▪ POLD1	Polymerase (DNA directed) delta 1, catalytic subunit (125KD)	
▪ SPIB	Spi-B transcription factor (Spi-1/Pu-1) related	D19S246
▪ MYBPC2	Myosin binding protein C fast type	
▪ SSTRIP	Somatostatin receptor-interacting protein	
▪ KLK7	Kallikrein 7	
▪ SCGF	Stem cel growth factor, lymphocyte secreted c-type lectin	
▪ GPR32	G protein coupled receptor 32	
▪ ACPT	Acid phosphatase, testicular	
▪ KLK1	Kallikrein 1	KLK1
▪ HSRNASPH	ACO for serine protease homologue	

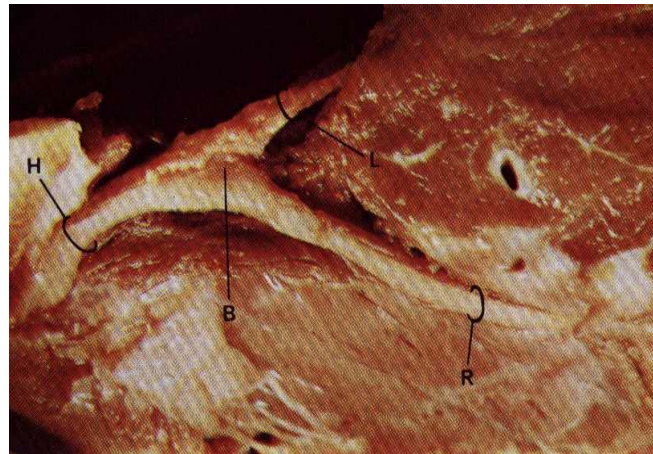
▪	KLK15	Kallikrein 15
▪	KLK14	Kallikrein 14
▪	KLK5	Kallikrein 5
▪	KLK6	Kallikrein 6
▪	KLK7	Kallikrein 7
▪	KLK8	Kallikrein 8
▪	KLK10	Kallikrein 10
▪	KLK11	Kallikrein 11
▪	KLK12	Kallikrein 12
▪	KLK4	Kallikrein 4
▪	KLK13	Kallikrein 13
▪	KLK14	Kallikrein 14
▪	SIGLE C9	Sialic acid binding Ig like lectin 9
▪	KLK3	Kallikrein 3
▪	KLK2	Kallikrein 2
▪	CD33 gp 67	CD 33 glycoprotein 67
▪	SIGLE C8	Sialic acid binding Ig like lectin 8
▪	NKG7	Natural killer cell group 7 sequence
▪	ETFB	Electron transfer flavoprotein beta polypeptide
▪	LIM2	Lens intrinsic membrane protein 2 (19KD)
▪	ZNF	Zinc finger protein
▪	NOPP 34	Nucleolar phosphoprotein
▪	SIGLE C7	Sialic acid binding Ig like lectin 7
▪	EST	
▪	ZNF 175	Zinc finger protein 175
▪	HAS1	Hyaluronan Synthase 1
▪	FPR1	Formyl peptide receptor
▪	FPRL1	Formyl peptide receptor like 1
▪	ZBRK1	Zinc Finger Protein ZBRK1
▪	FPRL2	Formyl peptide receptor like 2
▪	SIGLE C5	Sialic acid binding Ig like lectin 5
▪	SIGLE C6	Sialic acid binding Ig like lectin 6

D19S601*

III. RDA : *Representational Difference Analysis*

III.1. Tissus prélevés

Les tissus de conduction prélevés étaient initialement de branche droite, gauche et du faisceau de His, plus faciles à localiser, tandis que les nœuds sinusal et auriculoventriculaire étaient indétectables. Le myocarde a été prélevé à partir du ventricule gauche et des oreillettes (figure 29).



A



B

Figure 29 : Les tissus de conduction et le myocarde du cœur de bovin adulte. **A** : H : le faisceau de His, B : point de la bifurcation, R : Branche droite, L : Branche gauche. **B** : R : Branche droite.

III.2. Coupes histologiques

Les coupes histologiques réalisées à l'hôpital Cardiologique de Lyon ont montré que la majorité des tissus prélevés contenaient des cellules de conduction. Dans toutes les coupes, on trouve des cellules de conduction caractérisées par leur taille qui est beaucoup plus grande que celle des cellules du myocarde (caractéristique très remarquable chez les Ongulés). Les cellules de conduction sont fusiformes entourées par des cellules nerveuses, du tissu conjonctif, des cellules myocardique et de la fibrose (figure 30). Ceci rend impossible l'obtention des cellules de conduction pures.

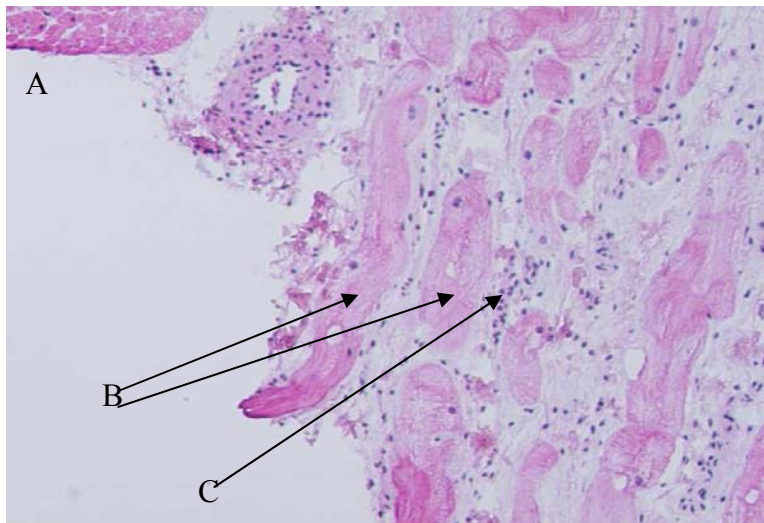


Figure 30 : Coupe histologique du tissu de conduction prélevé au niveau du faisceau de His. A : cellules du myocarde, B : cellules de conduction entourées par (C) : cellules nerveuses. 1 cm est équivalent à 20 μm .

III.3. Obtention des ARN totaux de tissu de conduction et du myocarde

Au total 36 cœurs ont été prélevés et l'extraction des ARN totaux (ARNt) a permis d'obtenir des ARNt de qualité moyenne due à une dégradation partielle de l'ARNt, avec un rendement moyen de 300 ng/mg de tissu. Le dosage des ARN a été réalisé par spectrophotométrie (et ces valeurs n'ont de sens que si la qualité des ARN est vérifiée).

La pureté est mesurée par le rapport DO260/DO280. Les rapports mesurés pour les tissus de conduction et l'endocarde sont compris entre 1,6 à 1,8, ce qui signifie qu'il n'y a pas de contamination par les protéines.

La qualité des ARN extraits est toujours vérifiée par leur migration sur gel dénaturant formaldéhyde (figure 31).

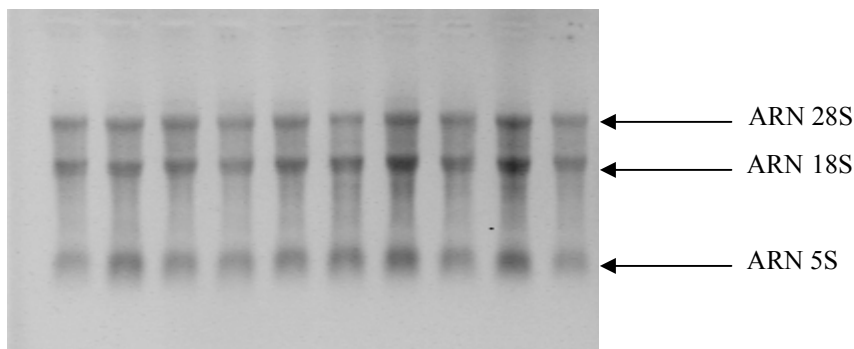


Figure 31 : Gel formaldéhyde des ARN. On observe les ARN de différentes tailles, et la dégradation partielle des ARN

Le gel formaldéhyde permet de bien visualiser l'état de nos ARNt totaux. Les ARNt présentent une dégradation partielle due au temps écoulé entre la mort de l'animal et l'obtention du cœur. Pour cela, plusieurs prélèvements ont été effectués, permettant ainsi de choisir les meilleurs ARNt.

III.4. Purification des ARNm

Après digestion à la Dnase qui permet d'éliminer l'ADN contaminant, la qualité des ARNt est vérifiée sur gel : aucune dégradation n'a eu lieu pendant cette étape. L'efficacité de la digestion est vérifiée par PCR avec des amorces GAPDH humaines ou bovines (tableau 18). Pour certains échantillons, deux digestions ont été effectuées. Les ARNt de deux tissus (500 à 600 µg chacun) ont été purifiés sur colonne poly-dT pour extraire l'ARNm.

Les ARNm (environ 4 µg) sont alors purifiés sur les colonnes poly-dT, précipités, et rétro-transcrits.

III.5. Transcription inverse des ARNm

Après la synthèse du premier brin, une PCR GAPDH humaine (hGAPDH) est réalisée en parallèle sur les échantillons + RT (avec transcriptase inverse) et les témoins négatifs -RT (sans transcriptase inverse). L'ADN génomique bovin sert comme un contrôle positif et l'eau comme un contrôle négatif. La migration des produits de PCR montre que la RT a bien synthétisé un ADNc. Un contrôle supplémentaire sur des échantillons est réalisé grâce à une PCR sur l' α 3-tubuline (figure 32). On n'observe aucune amplification pour les échantillons -RT, indiquant l'absence d'ADN génomique.

Tableau 18 : Amorces utilisées pour les différents gènes de ménage et les température d'hybridation.

Gène	Amorces	Taille (pb)	T en °C
GAPDH Humain (hGAPDH)	D 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3' R 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTGTA-3'	452	50
GAPDH Bovin (bGAPDH)	D 5' -CAA GTG GGG TGA TGC TGG TGC TGAG 3' R 5'- GCC ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTG 3'	441	67
α 3-Tubuline humain	D 5'-GCG TGA GTG CAT CTC CAT CC-3' R 5'-CCC TCG GGC ATA GTT ATT GGC AG -3'	génomique 468 ADNc 320	63

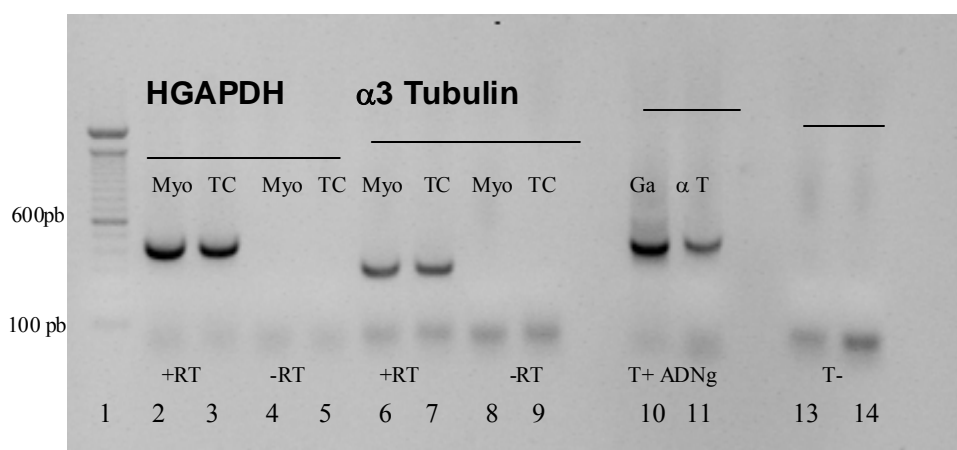


Figure 32: RT PCR sur les ADNc du myocarde et du tissu de conduction avec les amorces GAPDH humain et $\alpha 3$ -Tubulin humaine : + RT = avec transcriptase inverse, - RT = sans transcriptase inverse), ADNg = ADN génomique bovin sert comme témoin positif pour GAPDH (ADNc et ADNg = 452 pb) et $\alpha 3$ -Tubulin (ADNC = 320 pb, ADNg = 468 pb), et T- = témoin négatif de l'eau stérile pour vérifier qu'il n'y a pas de contamination. Myo : myocarde ; TC : Tissu de conduction. 1 est un marqueur de taille, 2 à 5 sont les échantillons +RT et -RT pour GAPDH, 6 à 9 sont les échantillons +RT et -RT pour $\alpha 3$ -Tubulin, 10 est le témoin positif pour GAPDH, 11 est le témoin positif pour $\alpha 3$ -Tubulin, 13 est le est le témoin négatif pour GAPDH, 14 est le témoin négatif pour $\alpha 3$ -Tubulin.

III.6. Digestion des ADNc par DpnII

L'efficacité de la digestion a été testée en amplifiant les produits de digestion avec soit des amorces « flanquantes » d'un site DpnII, soit des amorces du gène GAPDH humain. Celles-ci sont utilisées car elles amplifient une séquence d'ADN bovine portant un site DpnII, ce même site n'existant pas sur la séquence génomique humaine (figure 33). Après digestion, il n'y avait pas d'amplification.

III.7. Efficacité de la ligation avec les adaptateurs

Après la ligation, un contrôle (pour vérifier l'efficacité de la ligation) est indispensable en tenant compte de la présence d'un site *DpnII* dans le gène GAPDH bovin. La PCR est réalisée en utilisant les amorces R-24, J-24 et N-24 comme sens et bGAPDH-R comme antisens (figure 33). Les PCR, effectuées après chaque ligation, ont montré que la ligation était efficace puisque la taille attendue est d'environ 450 pb (figure 34).

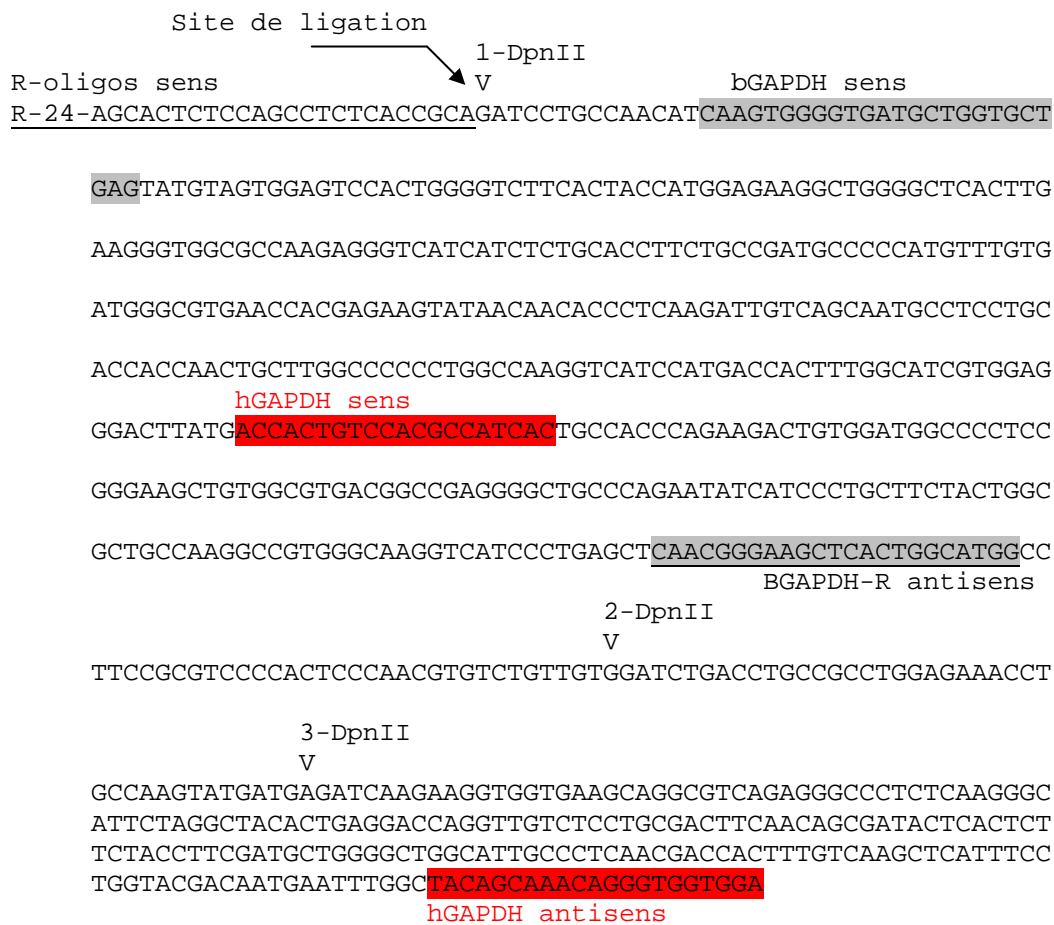


Figure 33 : Séquence de l'ADNc du gène GAPDH bovin, avec les séquences de différentes amorces sens et anti-sens. Les séquences soulignées sont celles qui sont utilisées pour vérifier l'efficacité de la ligation, les séquences en gris sont les amorces GAPDH bovines, les séquences rouges sont les amorces GAPDH humaines. Les sites *DpnII* et le site de ligation sont indiqués.

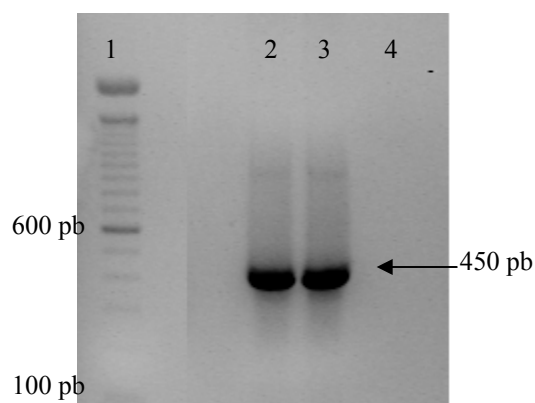


Figure 34 : PCR avec les amorces J-24 comme sens et bGAPDH-R comme anti-sens pour vérifier l'efficacité de la ligation. 1 est un marqueur de taille, 2 et 3 sont le produit de PCR avec les amorces J-24 comme sens et bGAPDH-R comme anti-sens, 4 est un témoin négatif.

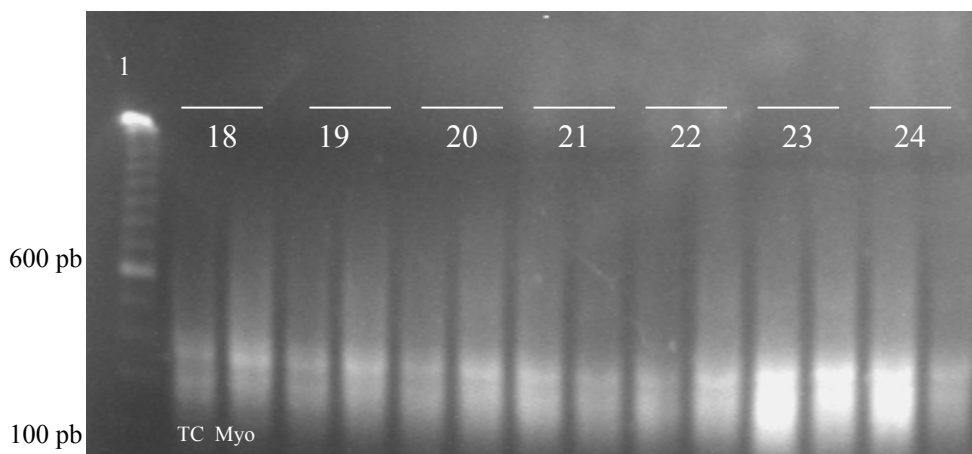
La figure montre que la réaction de ligation a eu lieu, et que l'hybridation entre les amorces 12-mer et 24-mer et l'ADNc a eu lieu efficacement : on observe une bande intense d'environ 450 pb obtenue après amplification par PCR entre les amorces J-24 (sens) et bGAPDH-R (anti-sens).

III.8. Optimisation des conditions (nombre de cycle, concentration d'ADNc) pour générer les deux représentations (tissu de conduction et myocarde)

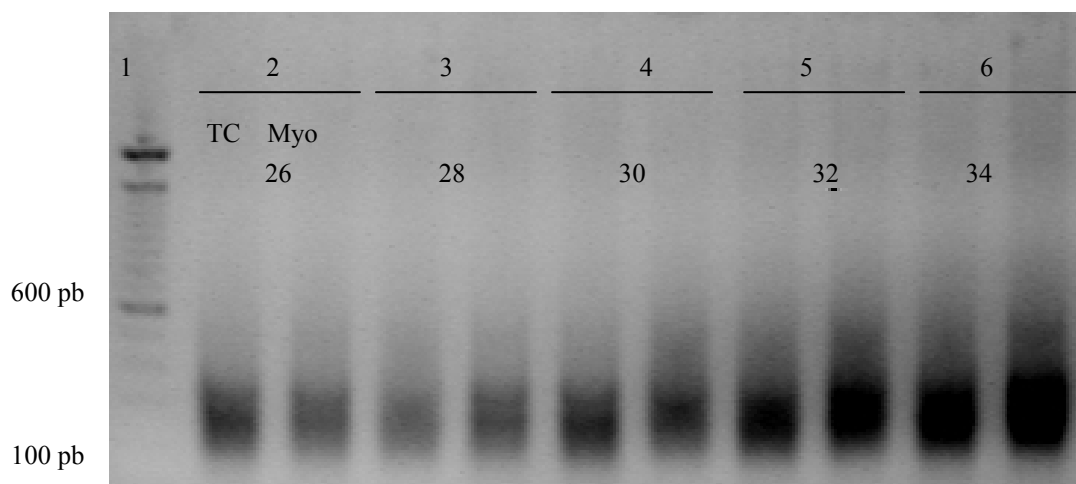
C'est une étape très importante pour générer les deux représentations (*tester* : tissu de conduction ; *driver* : myocarde) (voir matériel et méthodes). Les produits de PCR sont déposés pour chaque cycle et pour chaque concentration de deux représentations l'un à côté de l'autre (afin d'éviter le biais d'amplification des deux représentation). Le but rechercher dans cette optimisation des représentations est l'obtention d'une traînée (smear) sur le gel d'agarose allant de 200 pb à environ 1 kb (figure 35).

Dans notre étude, les meilleures conditions pour générer les deux représentations sont les suivantes :

- *Le tester* ou le tissu de conduction : 1 μ l de produit de ligation dilué*/ 21 cycles,
- *Le driver* ou le myocarde : 1 μ l de produit de ligation dilué*/ 20 cycles.



A



B

Figure 35 : Détermination de la concentration et du nombre de cycles pour générer les représentations. TC : tissu de conduction ; Myo : myocarde, A : entre 18 et 24 cycles, B : entre 26 et 34 cycles, pour 1 μ l de produit de ligation dilué* (obtenu à partir de l'étape II.5.5. du matériel et méthodes après la ligation avec les amorces R-24, voir matériel et méthodes). Le meilleur nombre de cycles pour le tissu de conduction est 21, et pour le myocarde est 20 cycles car on observe une traînée allant de 200 à 1000 pb. Les cycles des autres concentrations ne sont pas présentés. 1 est un marqueur de taille.

III.9. Analyse de l'efficacité de soustraction

Cette analyse peut être réalisée soit par PCR soit par hybridation (*dot ou Southern blot*) pour estimer l'efficacité de la soustraction. Dans les deux cas, cela se fait par une comparaison de l'abondance des ADNcs connus avant et après soustraction. Idéalement cela est fait soit avec un gène exprimé non différenciellement comme le gène de ménage GAPDH, soit avec un gène dont nous savons qu'il s'exprime différenciellement entre les deux populations d'ARNm à comparer. Dans le premier cas le signal d'un gène de ménage devrait diminuer après la soustraction, tandis que dans le deuxième cas le signal d'un gène qui est exprimé différenciellement devrait augmenter après soustraction.

L'analyse d'hybridation se fait par *dot ou Southern blot* en utilisant différents gènes comme sonde, pour une hybridation avec le produit de soustraction (après migration sur gel d'agarose, et transfert sur une membrane de Nylon). Cette technique est très sensible, mais il y aura parfois des bruits de fond ou des bandes non spécifiques.

Dans notre protocole une étude de la cinétique d'amplification PCR du gène de ménage GAPDH a été effectuée, puisque la PCR est une technique beaucoup plus rapide que l'analyse par hybridation (voir matériel et méthodes). L'analyse du gel d'agarose pour comparer le profil d'amplification du gène GAPDH bovin avant et après soustraction a révélé que ce gène a été amplifié avant et après soustraction à partir de 18 cycles pour DP1 (Produit Différent 1). Pour DP2 et DP3, une amplification apparaît à partir du 23ème cycle. Ces résultats montrent que la première soustraction n'était pas suffisante et que les soustractions qui suivent étaient efficaces (figure 36 A et B). Une amplification apparaît même après la 3^{ème} soustraction, puisque le gène GAPDH est un gène qui est fortement exprimé dans le muscle cardiaque. Par conséquent il faut plusieurs soustractions afin qu'il soit soustrait également dans les deux populations à comparer. De plus, si ce gène est exprimé deux fois plus dans le *tester* que dans le *driver*, la soustraction ne sera pas efficace (Clontech subtraction kit). Concernant DP4, cette analyse n'a pas été effectuée.

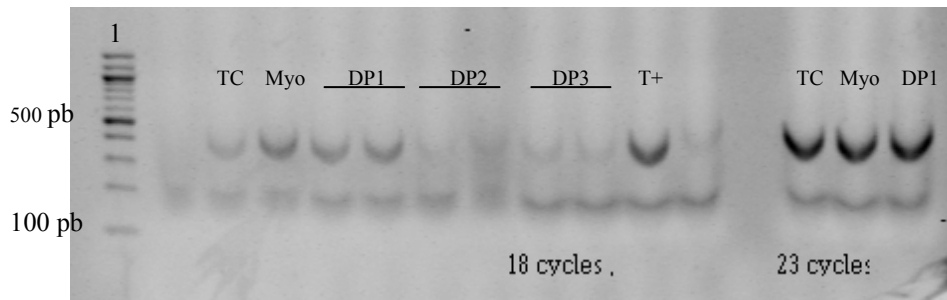


Figure 36A : Analyse de la cinétique d'amplification du gène *bGAPDH* à 18 et 23 cycles, avant soustraction (TC = tissu de conduction, Myo = myocarde) et après soustraction (DP1, DP2 et DP3). On observe une bande à 441 pb pour TC, Myo et DP1 à 18 cycles, mais pas d'amplification pour DP2 et DP3 à 18 cycles. 1 est un marqueur de taille.

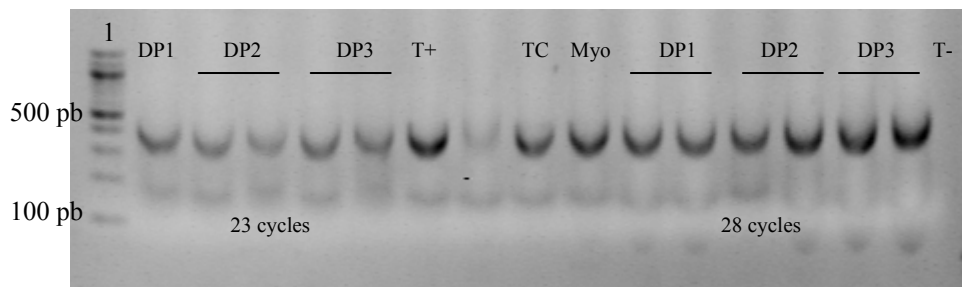


Figure 36B : Analyse de la cinétique d'amplification du gène *bGAPDH* à 23 et 28 cycles, avant soustraction (TC = tissu de la conduction, Myo = myocarde) et après soustraction (DP1, DP2 et DP3). On observe une amplification pour DP2 et DP3 à partir de 23 cycles. 1 est un marqueur de taille.

Pour confirmer l'efficacité de la soustraction il serait intéressant de tester la cinétique d'amplification d'un gène moins exprimé dans le cœur comme l' α 3-Tubuline, ainsi que de faire la soustraction dans les deux sens et de comparer le profil d'amplification.

III.10. Hybridation soustractive et Obtention de DP's (*different products* : produits différents)

Au total 4 soustractions ont été réalisées. Dans la réaction d'hybridation un excès de l'ADNc du *driver* est mélangé avec les ADNc du *tester*. Le mélange est dénaturé puis hybridé de nouveau. Durant l'hybridation trois types des molécules se forment -1) le driver avec le driver, qui lors d'une PCR avec les amores J-24 ou N-24 ne s'amplifie pas puisqu'il ne possède pas les amorces ou les adaptateurs -2) le *tester* avec le *driver*, qui s'amplifie linéairement, -3) le *tester* avec le *tester*, qui s'amplifie exponentiellement parce qu'il possède les adaptateurs sur les deux brins et donne donc les DP's (figure 37). Les DP's qui ont été obtenus sont : DP1, DP2, DP3 et DP4. On observe des différences de profils entre les DP's. DP1 a l'aspect d'une traînée. Des bandes faibles avec une traînée sont présentes au niveau de DP2. Des bandes distinctes commencent à apparaître à partir de DP3. Cependant ce profil de bandes n'est pas stable car DP4 montrent de nouvelles bandes alors que d'autres ont disparu. Ceci signifie que la répétition d'étapes de soustraction et d'enrichissement cinétique couplées aux PCR permettent d'enrichir, de purifier et de visualiser sur gel d'agarose des fragments présents spécifiquement dans une des deux populations (Hubank et al., 1994).

Les bandes observées ont des tailles allant de 200 à plus de 500 pb. L'observation de bandes à partir de DP3 est cohérente avec la littérature. Les différentes équipes qui ont utilisées la RDA pour obtenir des gènes spécifiques entre deux tissus ou deux phénotypes différents (Lisitsyn et al., 1993, Hubank et al., 1994, O'Neill et al., 1997, Pastorian et al., 2000, Eriksson et al., 1999 et 2001, Geng et al., 1998, Oderberg et al., 2000), quelque soit l'organisme vivant, ont obtenus des bandes à partir de DP3, dont les produits étaient clonés et séquencés directement ou cette étape était après l'obtention de DP4 ou DP5.

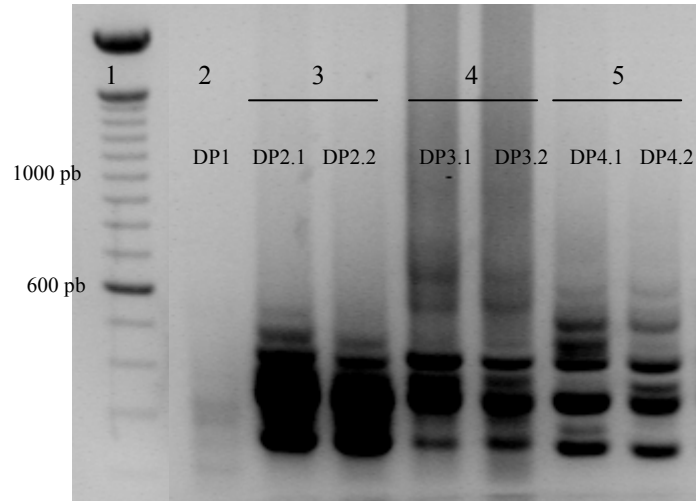


Figure 37 : Profil de produits différents DPs, 2 : DP1, 3 : DP2, 4 : DP3 et 5 : DP4. Les rapports de l'hybridation soustractive tester/driver sont : (DP1 ; 1/50), (DP2.1 et DP2.2 ; 1/100), (DP3.1 et DP3.2 ; 1/800), (DP4.1 ; 1/125000, DP4.2 ; 1/250000). On observe bien qu'à partir de DP3, on commence à voir des bandes. DP4.1 : on observe des bandes distinctes, on observe également des différences de profils entre DP4.1 et DP4.2 en raison des différences des rapports de soustraction. 1 est un marqueur de taille.

III.11. Séquençage et recherche *In Silico*

Au total, 240 inserts ont été séquençés, à partir de DP4.1, à raison de 60 plasmides par taille de fragment. Chaque fragment (200, 300, 400 et 500 et plus pb) correspond à des transcrits de plusieurs gènes. 195 inserts étaient analysables, pour les inserts restants, le séquençage n'a pas réussi.

L'analyse par BLAST nous a permis de classer les différents clones, avec une redondance importante pour certains clones. Certains clones, présentaient une homologie forte avec des séquences de gènes connus sur les bases de données, d'autres présentaient une homologie forte avec des séquences des EST bovins ou humains dont le gène ou la fonction de la protéine est hypothétique (nous ne connaissons pas ni la structure du gène ni la fonction de la protéine), tandis que pour la plupart des clones, nous avons trouvé une homologie très faible et ils ont été classés comme des EST inconnus.

La list des clones ou des gènes est présentée dans le tableau 19 et 20.

Tableau 19 : Les transcrits obtenus par la RDA codés par des gènes connus ou hypothétiques, leur numéro d'accèsion dans les bases de données selon les EST bovin, leur localisation sur le génome humain, leur pourcentage de redondance présenté dans le sens décroissant, le score obtenu par BLAST, et le pourcentage d'homologie avec la séquence dans les bases de données.

Nom des gènes ou des EST	Banque de données	Localisation	% de redondance	Score	% d'homologie
Myelin P 0	BF430239 AW485163	1q22	20%	450	95%
Aconitate hydratase (iron responsive element binding protein 1, <i>IRE-1</i>)	AV607068 AV232846	9p22-p13	16.4%	523	98%
Ubiquitously expressed transcript (<i>UXT</i>)	AV588604	Xp11.23-p11.22	13.3%	381	97%
Calcium channel voltage dependent L-type alpha subunit, <i>CACNA1B</i>	BM256856 AV257306	9q34	12.3%	440	98%
Protéine hypothétique DKFZP761F2014	AV604786 AV665396	14q32.2	8.7%	390	97%
Protéine hypothétique (1)	AV889660	?	4.6%	640	96%
Protéine hypothétique (2)	AV257847	?	4.5%	550	97%
Kaptin (actin binding protein) <i>KPTN</i>	BM255688 AW356641	19q13.3	3.05%	630	98%
Human alpha-actinin 1 (alpha-actinin cytoskeletal isoform) <i>ACTN1</i>	BM089096	14q22-24	3.02%	600	98%
Heat shock 70KDa protein 6 (<i>HSP70</i>)	BF042820 BF075845	1q21-q22	2.05%	540	96%
Bovine liver cytochrome C oxidase subunit CIX (VIII) mRNA	AV663155	11q12-q13	1.53%	440	98%
Myosin heavy chain,cardiac muscle, beta, <i>MYH7</i>	AV599277 AV599408	14q12	1.53%	530	98%
42 K membrane glycoprotein human adhesion regulating molecule 1	BM251822 CB166833	?	1.35%	360	97%
Nispnap homolog 1, 4-nitrophenylphosphatase domain 2 non neuronal <i>SNAP25-like 1</i>	BF601334	22q12.2	0.51%	430	97%
Stress associated endoplasmic reticulum P1 ribosome associated	BV730276 BM711667	?	0.51%	300	98%
MHC class I histocompatibility antigen HLA-B73 alpha chain	AV433107	?	0.5%	440	96%
Serine protease inhibitor, K unit z type 2 placental bikunin	BM480367	?	0.51%	530	96%

Tableau 20 : Les transcrits obtenus par la RDA pour lesquels une homologie faible a été obtenue, leur numéro d'accèsion dans les bases de données selon les EST bovin, leur pourcentage de redondance présenté dans le sens décroissant, le score obtenu par BLAST, et le pourcentage d'homologie avec la séquence dans les bases de données

Nom des gènes ou des EST	Banque de donnés	Localisation	% de redondance	Score	% d'homologie
EST inconnu	AW353102	?	4.6%	35	90%
EST inconnu	BG689308	?	4.1%	40	90%
EST inconnu	BI849979	?	3%	32	87%
EST inconnu	BI775203 BM255333	?	3%	55	95%
EST inconnu	BM483688	?	3%	35	96%
EST inconnu	CB172413	?	2%	45	86%
EST inconnu	BI359560	?	2%	40	90%
Protéine hypothétique MGC21688	AL524236	?	1.53%	45	90%
EST inconnu	BE808293	?	1.53%	34	89%
EST inconnu	BM480367	?	1.53%	46	90%
EST inconnu	BF075683	?	1.53%	54	87%
EST inconnu	BE808308	?	1.35%	35	90%
EST inconnu	BI679827	?	1%	32	96%
EST inconnu	BG689308	?	1%	46	90%
EST inconnu	BF075683	?	1%	52	94%
EST inconnu	BF046418	?	1%	44	96%
EST inconnu	BI 336792	?	0,51%	40	90%
EST inconnu	AW669409	?	0.51%	32	85%
EST inconnu	BI849979	?	0.51%	46	86%
EST inconnu	BM849895	?	0.51%	32	86%
EST inconnu	604460	?	0.51%	46	99%
EST inconnu	287491	?	0.51%	44	86%
EST inconnu	237277	?	0.51%	55	90%
EST inconnu,	589279	?	0.51%	46	89%

D'après ces deux tableaux le seul gène qui est localisé en 19q13.3 est le gène *KPTN* qui code une protéine liant l'actine. Malheureusement ce gène est exclu de l'intervalle génétique de la mutation (page 145). Les EST qui sont codés par des gènes hypothétiques, ont une localisation inconnue. Pour les EST où une homologie très faible a été obtenue, ils sont également non localisés.

III.11.1. Fonctions de certains gènes ou transcrits obtenus par la RDA

- *Myeline P0* : C'est la protéine majeure de myéline périphérique (plus que 50% des protéines présentes). MPZ stabilise l'assemblage de myéline. L'expression du gène codant la myéline P0 est restreinte aux cellules de Schwann.

- *Aconitate hydratase* : c'est une protéine cytosolique qui lie l'ARN et qui stabilise les ARNm du récepteur de la ferritine. Il existe une forme soluble qui est cytoplasmique et une forme mitochondriale. Cette protéine joue un rôle majeure dans l'homéostasie du fer dans la cellule et elle possède également une activité aconitase.

- *Ubiquitously expressed transcript (UXT)* : c'est une protéine de 157 a.a. avec 3 sites potentiels de phosphorylation potentielle. Elle est présente dans la totalité des tissus dont le cœur, le cerveau, les poumons, le foie, les muscles squelettiques et la pancréas. La fonction exacte de cette protéine est inconnue. Schroder et al., (1999) ont suggéré que UXT peut être impliquée dans la tumorigenèse.

- *Calcium channel voltage dependent L-type alpha subunit (CACNA1B)*: c'est un canal calcique de type L dépendant du potentiel, qui se trouve à la surface des cellules et qui joue un rôle important dans l'entrée du calcium dans la cellule.

- *Kaptein (actin binding protéin) KPTN* : C'est une protéine liant l'actine. Elle joue un rôle important dans la polymérisation et l'organisation des filaments actine, dans la motilité cellulaire (fibroblastes). Elle est exprimée dans toutes les cellules, dont le stéréocil de l'oreille interne.
- *Heat Shock protein 70 kDa (HSP70)*: protéine chaperone dont le rôle est de protéger la cellule en réponse au stress. Il existe 3 grandes classes de HSP, selon leur poids moléculaire.
- *Bovine liver cytochrome C oxidase subunit CIX* : Elle intervient dans le cycle de respiration.
- *Myosin heavy chain, cardiac muscle, beta (MYH7)* : protéine contractile, elle est exprimée dans les muscles cardiaques et les muscles squelettiques. Des mutations dans ce gène sont responsables de cardiomyopathies hypertrophiques.
- *Alpha-Actinin 1 (ACTN1)* : Elle appartient à la superfamille des Spectrines qui représente un groupe de protéines cytosquelettique, incluant l' α , le β spectrine et la dystrophine. C'est une protéine qui lie l'actine, et possède des multiples rôles dans différents types cellulaires. Dans les cellules non musculaires, la forme cytosquelettique se trouve tout au long de microfilaments et les jonctions adhérentes, où il maintient l'actine à la membrane. Au contraire dans les muscles squelettiques, cardiaques et lisses, les isoformes sont localisées au niveau des disques Z et aident à l'ancrage des filaments d'actine myofibrillaires.

III.12. PCR semi-quantitative

Des PCR ont été réalisées afin de vérifier la présence des clones obtenus par la RDA dans les ADNc de tissu de conduction et/ou du myocarde, avec des amorces choisies (tableau 21). Ensuite, pour pouvoir éliminer les clones ou les transcrits qui sont exprimés dans les deux tissus, puisque la soustraction n'est probablement pas parfaite, et pour sélectionner les clones pour l'hybridation *In Situ*, des PCR semi-quantitatives ont été réalisées, et ceci pendant 24 cycles.

Tableau 21: les différents transcrits obtenus par la RDA (les transcrits les plus importants), et les séquences des amorces utilisées pour amplifier ces différents transcrits pour la PCR semi-quantitative. Les amorces sont dérivés des séquences obtenues dans nos clones.

Gènes	Séquence des amorces	Tailles des produits de PCR en pb	Température d'hybridation En °C
Myein P0	D 5'-GGTATCAAGGTCCCTTTCTTCTC-3' R 5'-CCCCCGTATAGGTGCTTTC-3'	231	57 à60C
Aconitate Hydratase	D 5'-CAAAAGGTACACAAGCAAAAACCTC-3' R 5'-AGGTAAACACAGGTCCGTTC-3'	239	57 C
UXT ubiquitously expressed transcript	D 5'-GATGACGAAAGCCTGTACCC-3' R 5'-CCTAAAGAGAACTCCTGAGTG-3'	147	57 C
Protéine hypothétique DKFZP761F2014	D 5'-GAGTCTAAAGTGTGGGTGTC-3' R 5'-AAAGTATGGAACAGCAGGGG-3'	196	57 C
Protéine hypothétique (1)	D 5'-TGCTACTGGTCCTGTTTCTC-3' R 5'-GACAAAAGGGTTTTCTTTAACTCAC-3'	297	57 C
Protéine hypothétique (2)	D 5'-GTCAGTGTAACAGATGCTGAAG-3' R 5'-AGGACAGAAAGGCACAGAGG-3'	308	57 C
Kaptin (Actin binding protein)	D 5'-GTTTCTCCTGAGTGGGGATG-3' R 5'-CTGAATGATGGTCCACGTCTG-3'	257	60 C
Du côté 3' de l'ARNm Kaptin humain	D 5'-CCCAGGGTGGTGAAGCTGTG-3' R 5'-GCCAATTCTCATCCAGAGTGGAC-3'	124	57 C
Heat Shock protein 70 kDa	D 5'-AGGAGGAGGTGGAGAGGATG-3' R 5'-CTCTTTGTCTGCTAACTGGTTGTG-3'	233	60 C
Glycoprotéine membranaire 42 k	D 5'-GCAGCAACCTAATCCAGGCTC-3' R 5'-CTCGGCATGTTCACTGTGGC-3'	215	60C
MyH7	D 5'-ATCAGCCAGGTTACCTTGTC-3' R 5'-CAGAGACAGAGAAGGAAATAG-3'	173	55C
Du côté 3' de l'ARNm MYH7 Bovin	MYH7D 5'-CCAAGTCCGCAAGGTGCAG-3' MYH7R 5'-TCAGGATGGGGCAGACCAAG-3'	159	58 C
Actinine	D 5'-AGCCATGACTTGGTCTGCTG-3' R 5'-TGGGTCCCGAGAGTTCAAAG-3'	194	57 C
Du côté 3' de l'ARNm actinine Humain	actinin D 5'-TGCCAGGTGCTCTGGACTAC-3' actinin R 5'-ACCGAACCCAGGCAGGAGATG-3'	146	57 C

III.12.1. PCR sur les clones obtenus par la RDA

Pour les PCR à 34 cycles tous les clones ont été amplifiés dans l'ADNc de tissu de conduction et du myocarde, sauf pour le clone de l'aconitate hydratase, qui n'a pas du tout été amplifié, ni dans les deux populations d'ADNc (du tissu de conduction et du myocarde), ni dans l'ADN génomique bovin. Ceci étant probablement due à un problème d'amorces ou à la présence d'un grand intron (pour l'ADN génomique) (figure 38).

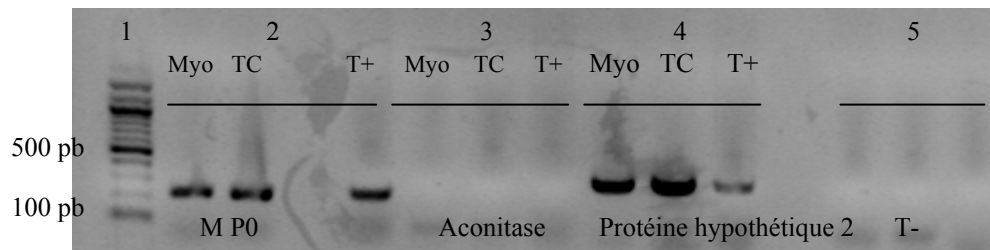


Figure 38 : PCR de l'ADNc du myocarde (Myo), et de tissu de conduction (TC), pour les clones obtenus par la RDA correspondant à Myéline P0, à l'aconitate hydratase et à une protéine hypothétique à 34 cycles. On observe une amplification pour les deux ADNc pour Myéline P0 (2) et pour la protéine hypothétique numéro 2 (4), mais l'absence d'amplification pour l'aconitate hydratase (3). 1 est un marqueur de taille, T+ est un témoin positif qui s'agit de l'ADN génomique bovin, T- est un témoin négatif (5) pour chaque clones.

III.12.2. PCR semi-quantitative sur les clones obtenus par la RDA

Pour la PCR semi-quantitative nous n'avons pas pu avoir un signal d'amplification pour tous les clones. Pour les clones amplifiés, nous présentons ces clones en deux catégories :

III.12.2.1. les clones amplifiés dans l'ADNc de tissu de conduction seulement :

- protéine hypothétique DKFZP761F2014 (figure 39)
- Myelin P0
- Heat shock protein 70 kDa (HSP70) .
- Protéine hypothétique (2)

Pour les autres clones nous avons obtenus une amplification dans l'ADNc de deux tissus, tissu de conduction et du myocarde.

III.12.2.2. les clones amplifiés dans l'ADNc de deux tissus (tissu de conduction et du myocarde) :

- ubiquitously expressed transcript UXT
- 42 k membrane glycoprotein
- Human alpha-actinin 1 (alpha-actinin cytoskeletal isoform, AAC1) (figure 39)
- Myosin heavy chain, beta, MYH7
- Protéine hypothétique (1)

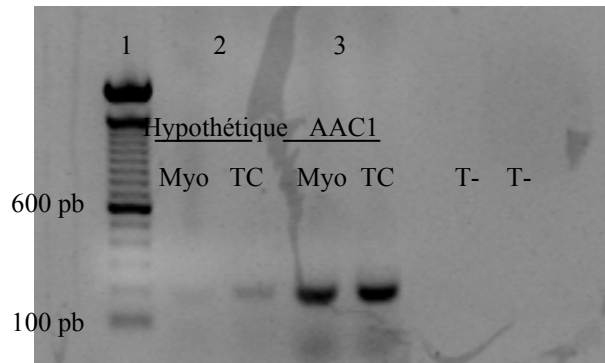


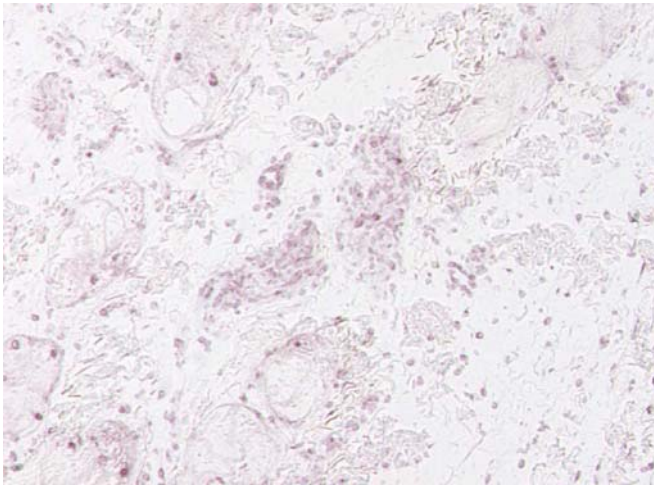
Figure 39 : PCR semi-quantitative de l'ADNc du myocarde (Myo), et de tissu de conduction (TC), pour les clones obtenus par la RDA correspondant à la protéine hypothétique DKFZP761F2014 et au gène Human alpha-actinin 1 (alpha-actinin cytoskeletal isoform, AAC1) à 24 cycles. On observe une amplification à partir des deux ADNc pour AAC1 (2), et une amplification plus importante du transcrit de la protéine hypothétique DKFZP761F2014 au niveau de l'ADNc de tissu de conduction (3). 1 est un marqueur de taille ; T- est un témoin négatif.

III.13. Hybridation *In Situ*

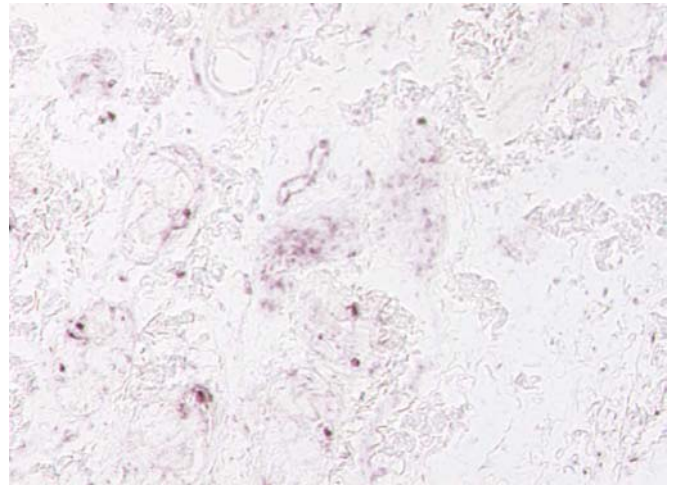
Les hybridations *In Situ* ont été réalisées dans un premier temps avec des ribosondes contre le gène de ménage GAPDH bovin (figure 40) et de la β -actine (humain). Les premiers essais d'hybridation *In Situ* n'ont pas réussi même en changeant plusieurs paramètres concernant le temps d'incubation et de concentration pour la digestion avec la Protéinase K, la concentration de l'anticorps Anti-Dig, la concentration du levamisole (inhibiteur de la phosphatase alcaline endogène), la concentration de ribosonde, la stringence de lavage après l'hybridation, etc.... Le tableau 22 présente la taille de l'insert correspondant aux transcrits utilisés pour la synthèse de ribosonde.

Tableau 22: Les transcrits obtenus par la RDA (sauf la GAPDH) et la taille de l'insert pour la synthèse de ribosondes utilisées pour l'Hybridation *In Situ* afin de vérifier leur spécificité d'expression.

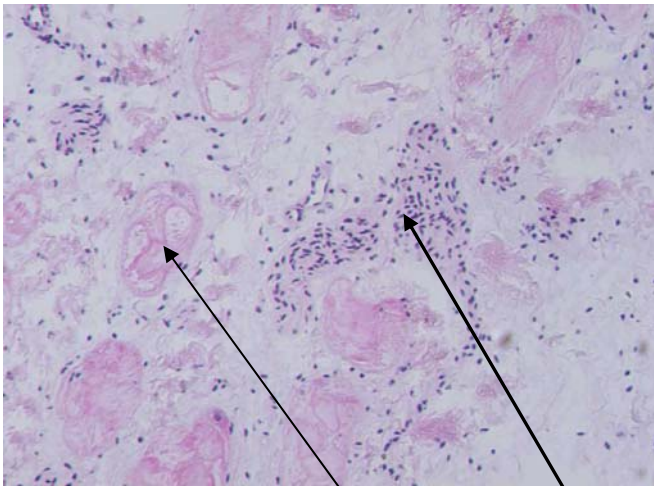
Gènes	Taille de l'insert en pb
GAPDH	441
Myein P0	574
Aconitate Hydratase	594
ubiquitously expressed transcript UXT	465
Calcium channel voltage dependent L-type alpha subunit, CACNA1B	335
Protéine hypothétique DKFZP761F2014	476
Protéine hypothétique (1)	430
Protéine hypothétique (2)	532
Kaptin (Actin binding protein)	617
Heat Shock protein 70 kDa	536



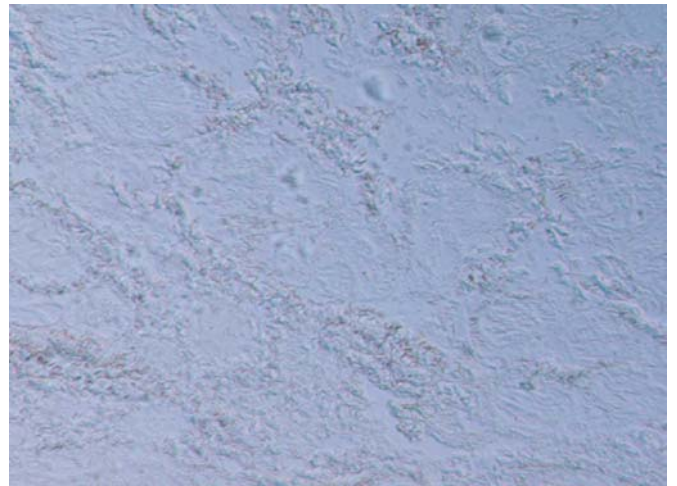
A : GAPDH sens



B : GAPDH antisens



C : Coupe colorée



D : T négatif

Cellule de conduction

Cellules nerveuses

Figure 40 : Les résultats de l'hybridation *In Situ* pour le gène qui code la GAPDH bovin, (A) GAPDH sens signifie que le sens de la ribosome est le même que l'ARNm, et qui sert comme un témoin négatif, alors que (B) GAPDH antisens signifie que le sens de la ribosome est complémentaire à l'ARNm. (C) Coupe colorée avec l'hématoxyline-phloxine-safran, en bleu sont les noyaux, en rose le cytoplasme. (D) T négatif est un contrôl négatif (sans ribosome). Nous observons la présence du signal au niveau de noyau dans les deux coupes GAPDH sens et GAPDH antisens, qui est due probablement à une liaison de la ribosome à l'ADN nucléaire. 1 cm est équivalent à 20 μ m.

III.14. Discussion

Parmi les transcrits obtenus par la *RDA* le pourcentage le plus élevé (ou la redondance la plus importante) était pour le gène codant la Myéline Protéine zéro, qui est normalement très élevée dans les cellules neuronales. La transcription de ce gène dans les tissus de conduction est due sûrement à la présence des cellules nerveuses dans ce tissu, car elles jouent un rôle modulateur de la fréquence cardiaque.

Le gène codant la chaîne lourde de myosine β (exprimé dans les myocytes cardiaques contractiles) est présente parmi les transcrits obtenus par la *RDA*, probablement parce qu'il est très exprimé dans les deux tissus (les tissus de conduction et le myocarde), et il faut plusieurs soustraction pour qu'il soit complètement éliminé. Pour confirmer cette hypothèse il faut réaliser l'hybridation *In Situ* pour avoir une idée de la spécificité de la transcription de ce gène.

Le seul gène qui est localisé sur le chromosome humain 19q13.3 est le gène *KPTN* codant la Kaptin, une protéine liant l'actine. Ce gène est présent dans quasiment toutes les cellules qui ont des caractéristiques contractiles, sa spécificité devrait être confirmée par l'hybridation *In Situ*.

La plupart des transcrits obtenus par la *RDA* sont des protéines hypothétiques dont on ne connaît pas le rôle dans la cellule, ou des transcrits pour lesquels nous n'avons pas trouvé une homologie forte avec des séquences dans les bases de données et qui ont été classés comme EST inconnu, ceci est probablement due au fait qu'il s'agit de séquences bovines, ou bien que ces gènes n'ont pas encore séquencés. Un exemple d'un gène dont la protéine est hypothétique, celui qui était plus exprimé dans le tissu de conduction que dans le myocarde, est la protéine hypothétique DKFZP761F2014. On pourra peut être découvrir des gène intéressants pour le fonctionnement du système de conduction cardiaque.

Les premiers essais de l'hybridation *In Situ* n'ont pas réussi, même en variant différents paramètres. Ceci est probablement dû à une dégradation des ARNm dans les tissus de conduction ou à la taille de la sonde. Cette technique pourra être améliorée en utilisant des sondes oligonucléotidiques.

L'avantage fondamental de la *RDA* est qu'elle élimine en principe les éléments communs et amplifie les fragments spécifiques qui sont directement clonables. Ainsi il n'est pas indispensable d'avoir un *tester* totalement pur (qui est le cas de tissu de conduction). La *RDA* présente une grande sensibilité (détection d'une séquence présente dans 1% des cellules du tester (O'Neill M et al., 1997, Michiels L et al., 1998), ainsi qu'une forte adaptabilité qui est appliquée sur différents modèles d'espèces vivantes (Becker P et al., 2001, Allen NL et al., 2001, Zoldos V et al., 2001, Panaud O et al., 2002). La *RDA* peut être associée aux puces d'ADN (Welford S et al., 1998, schmitz AA et al., 2002, Frohme M et al., 2000).

Cette technique a fait ses preuves puisqu'elle a permis l'identification des nouveaux gènes responsables de certaines maladies génétiques comme la Stéréociline qui est responsable d'une forme de surdité (Verpy I et al., 2001), l'identification du gène de la Dystrophine responsable de la dystrophie de Duchenne et une délétion sur 22q13 responsable de cancer des ovaires (Lin H et al., 2000).

Cependant nous ne pouvons pas échapper à l'hypothèse que le gène muté soit exprimé dans les deux tissus à comparer (tissu de conduction et myocarde), mais une mutation dans ce gène aboutit à une anomalie dans l'un mais pas dans l'autre, ainsi le gène *SCN5A* qui est responsable de la maladie de Lenègre et Lev (nous ne connaissons pas son niveau d'expression dans les deux tissu). Le gène muté peut-être ubiquitaire et exprimé dans tous les tissus comme par exemple le gène lamine A/C qui est responsable de plusieurs maladies génétiques. Des mutations dans ce gène sont responsables à l'état hétérozygote de la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss (qui associe une cardiomyopathie dilatée avec de bloc de conduction), et à l'état homozygote de la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2B1, une lipodystrophie familiale partielle et la maladie de Progeria (Eriksson M et al., 2003).

De plus, la *RDA* ne permet pas de détecter des différences dues à des mutations ponctuelles ou à de petites délétions/insertions, ainsi que les transcrits n'ayant pas le site de restriction choisi *DpnII*.

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

Nous avons cherché à identifier le gène muté responsable de bloc de conduction cardiaque familial isolé ou PFHBI, qui se manifeste par des blocs de branche droit, des hémiblocs de branche gauche, complet ou incomplet et des bloc auriculo-ventriculaires de divers degrés. C'est une maladie qui est autosomique dominante à pénétrance incomplète, plus pénétrante chez les hommes que chez les femmes. L'analyse de liaison a permis de localiser cette maladie en 19q13.3 à 10 cM d'intervalle entre les marqueurs D19S606 et D19S571 (De Meeus A et al., 1995).

Dans notre travail personnel, nous avons fait une analyse de liaison génétique chez quatre familles atteintes de bloc de conduction cardiaque, dans le but de réduire l'intervalle de la mutation. Le génotypage de ces différentes familles a montré que les malades partagent le même haplotype qui est compatible avec la mutation sur 19q13.3, mais l'absence de recombinaison n'a pas permis de réduire cet intervalle. Nous avons identifié deux nouveaux marqueurs polymorphes qui sont disponibles maintenant sur les bases de données (D19S1193 et D19S1194). L'hypothèse d'un effet fondateur a été exclue entre les deux familles libanaises, mais pas entre la famille française et la famille sud-africaine. Il faut tester des nouveaux sujets atteints de la famille sud-africaine afin de déterminer l'allèle lié à la maladie pour D19S1194, et il faut également tester des nouveaux marqueurs dans l'intervalle entre D19S596 et HRC. Un polymorphisme dans les gènes CaBP nous a permis de bien délimiter l'intervalle génétique de la mutation du côté centromérique, et la limite de l'intervalle pour nos familles est de CaBP (exclu) du côté centromérique à D19S601 (exclu) du côté télomérique. Pour les familles sud-africaines, l'intervalle du côté télomérique est D19S866 (exclu). Donc, l'intervalle finale de la mutation est délimité par CaBP (exclu) du côté centromérique et D19S866 (exclu) du côté télomérique soit 4 cM.

L'approche gènes candidats par la recherche de mutation, en utilisant les techniques de SSCP et de séquençage a été abordée durant notre travail. Cette stratégie est basée sur la recherche, dans l'intervalle génétique, de mutation dans des gènes : soit la fonction pourrait être impliquée dans la

genèse de la maladie (canaux ioniques), soit parce qu'ils sont exprimés dans le cœur. Nous n'avons pas pu identifier des mutations dans les parties codantes de 9 gènes testés, et ceci sans exclure les séquences régulatrices, promotrices ni introniques. Cette stratégie peut être très longue et très coûteuse, aggravée par le fait que le chromosome 19 est très riche en gènes (plus de 100 gènes dans l'intervalle concerné). De plus, la technique de la SSCP n'est pas fiable à 100% pour détecter les changements de séquence. Il faudrait utiliser une technique de détection des mutations beaucoup plus rapide et performante comme la DHPLC.

En parallèle, nous avons adopté la stratégie de la RDA, afin de sélectionner les gènes qui sont spécifiquement exprimés dans le tissu de conduction cardiaque, en supposant que le gène responsable de la maladie de bloc de conduction est exprimé spécifiquement dans les cellules conductrices de l'onde de dépolarisation, puisqu'il s'agit d'une atteinte spécifique de ce tissu. Pour réaliser cette étude, nous avons travaillé sur le cœur de bovin puisque le tissu de conduction y est visible à l'œil nu. Nous avons réalisé toutes les étapes de la RDA jusqu'au séquençage des clones. Nous avons obtenu une quinzaine des gènes dont le rôle et la localisation chromosomique sur le génome humain sont connus, mais les autres présentent une homologie faible avec des séquences dans les bases de données.

Nous envisageons de vérifier la spécificité tissulaire des gènes obtenus par la RDA, par hybridation *In Situ* (en utilisant des sondes oligonucléotidiques). Nous identifierons des gènes importants pour le système de conduction, susceptibles d'être mutés dans certaines situations pathologiques, pour lesquels une recherche de mutations sera réalisée dans des familles présentant des blocs de conduction cardiaque.

Références bibliographiques

1. Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SA. (1999). MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell*. 97:175-187.
2. Ackerman MJ, Siu BL, Sturner WQ, Tester DJ, Valdivia CR, Makielski JC, Towbin JA. (2001). Postmortem molecular analysis of SCN5A defects in sudden infant death syndrome. *JAMA*. 286 : 2264-2269.
3. Allen NL, Hilton AC, Betts R, Penn CW. (2001). Use of representational difference analysis to identify *Escherichia coli* O157-specific DNA sequences. *FEMS Microbiology Letters*. 197 : 195-201.
4. Allensworth DC, Rice GJ, Lowe GW. (1969). Persistent atrial standstill in a family with myocardial disease. *Am. J. Med.* 47 : 775-784.
5. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, and Lipman DJ. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
6. Alyonycheva T, Cohen-Gould L, Siewert C, Fischman DA, Mikawa T. (1997). Skeletal muscle-specific myosin binding protein-H is expressed in Purkinje fibers of the cardiac conduction system. *Circ Res.* 80 : 665-672.
7. Anand-Srivastava MB, Thibault G, Sola C, Fon E, Ballak M, Charbonneau C, Haile-Meskel H, Garcia R, Genest J, Cantin M. (1989). Atrial natriuretic factor in Purkinje fibers of rabbit heart. *Hypertension*. 13 : 789-798.
8. Antzelevitch C, Sicouri S, Litovsky SH, Lukas A, Krishnan SC, Di Diego JM, Gintant GA, Liu DW (1991). Heterogeneity within the ventricular wall. Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial, and M cells. *Circ. Res.* 69 : 1427-1449.
9. Aoyama N, Tamaki H, Kikawada R, Yamashina S. (1995). Development of the conduction system in the rat heart as determined by Leu-7 (HNK-1) immunohistochemistry and computer graphics reconstruction. *Lab Invest.* 72 : 355-366.
10. Arguello C, Alanis J, Valenzuela B. (1988). The early development of the atrioventricular node and bundle of His in the embryonic chick heart. An electrophysiological and morphological study. *Development*. 102 : 623-637.

11. Attali B, Lesage F, Ziliani P, Guillemare E, Honore E, Waldmann R, Hugnot JP, Mattei MG, Lazdunski M, Barhanin J.(1993) Multiple mRNA isoforms encoding the mouse cardiac Kv1-5 delayed rectifier K⁺ channel. *J Biol Chem.* 268 : 24283-24289.
12. Aylward R.D. (1928). Congenital heart block (Memorandum). *Br. Med. J.* 1 : 932.
13. Balser JR. (1999). Structure and function of the cardiac sodium channels. *Cardiovasc Res.* 42 : 327-338.
14. Barak M, Herschkowitz S, Shapiro I, Roguin N. (1987). Familial combined sinus node and atrioventricular conduction dysfunctions. *Int. J. Cardiol.* 15 : 231-239.
15. Barbu M, Ziller C, Rong PM, Le Douarin NM. (1986). Heterogeneity in migrating neural crest cells revealed by a monoclonal antibody. *J Neurosci.* 6 : 2215-2225.
16. Bardien-Kruger S, Wulff H, Arieff Z, Brink P, Chandy KG, Corfield V. (2002). Characterisation of the human voltage-gated potassium channel gene, KCNA7, a candidate gene for inherited cardiac disorders, and its exclusion as cause of progressive familial heart block I (PFHBI). *Eur J Hum Genet.* 10 : 36-43.
17. Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G. (1996) K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature.* 384 : 78-80.
18. Barkinol-Watanabe S, Grob NA, Götz H, Henkel T, Karabinos A, Ktatzin H, Barkinol HU, Hilschmann N. (1994). Human protein NEFA, a novel DNA binding./EF-Hand/ Leucine Zipper protein. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA, isolated and characterization of the protein. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 375 : 497-512.
19. Baroudi G, Chahine M. (2000). Biophysical phenotypes of SCN5A mutation causing long QT and Brugada syndromes. *FEBS Letters.* 487 : 224-228.
20. Baroudi G, Pouliot V, Denjoy I, Guicheney P, Shrier A, Chahine M. (2001). Novel mechanism for Brugada syndrome: defective surface localization of an SCN5A mutant (R1432G). *Circ Res.* 88 : E78-83.

21. Baruscotti M, Westenbroek R, Catterall WA, DiFrancesco D, Robinson RB. (1997). The newborn rabbit sino-atrial node expresses a neuronal type I-like Na⁺ channel. *J Physiol.* 498 : 641-648.
22. Basson CT, Bachinsky DR, Lin RC, Levi T, Elkins JA, Soultis J, Grayzel D, Kroumpouzou E, Traill TA, Leblanc-Straceski J, Renault B, Kucherlapati R, Seidman JG, Seidman CE. (1997). Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat Genet.* 15 : 30-35.
23. Bastide B, Neyses L, Ganten D, Paul M, Willecke K, Traub O. (1993). Gap junction protein connexin40 is preferentially expressed in vascular endothelium and conductive bundles of rat myocardium and is increased under hypertensive conditions. *Circ Res.* 73 : 1138-1149.
24. Becker P, Hufnagle W, Peters G, Herrmann M. (2001). Detection of differential gene expression in biofilm-forming versus planktonic populations of staphylococcus aureus using micro-representational difference analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 : 2958-2965.
25. Bennet GS, Dillulo C. (1985). Transient expression of a neurofilament protein by replicating neuroepithelial cells of the embryonic chick brain. *Dev. Biol.* 107 : 107-127.
26. Bennett PB, Yazawa K, Naomasa M, George AL. (1995). Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature.* 376 : 683-685.
27. Benson DW, Silberbach GM, Kavanaugh-McHugh A, Cottrill C, Zhang Y, Riggs S, Smalls O, Johnson MC, Watson MS, Seidman JG, Seidman CE, Plowden J, Kugler JD. (1999). Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. *J Clin Invest.* 104 : 1567-1573.
28. Berkemeier LR, Ozcelik T, Francke U, Rosenthal A (1992). Human chromosome 19 contains the Neurotrophin-5 gene locus and three related genes that may encode novel acidic neurotrophins. *Somatic Cell and Molecular Genetics.* 18 : 233-245.
29. Bers DM. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 415 : 198-205.
30. Bezzina CR, Rook MB, Groenewegen WA, Herfst LJ, Van Der Wal AC, Lam J, Jongsma HJ, Wilde AM, Mannens M. (2003). Compound heterozygosity for mutations (W156X and R225W)

- in *SCN5A* associated with severe cardiac conduction disturbances and degenerative changes in the conduction system. *Cir. Res.* 92 : 159-166.
31. Bezzina CR, Rook MB, Wilde AM. (2001). Cardiac sodium channel and inherited arrhythmia syndromes. *Cardiovascular research.* 49 : 257-271.
 32. Bione S, Maestrini E, Rivella S, Mancini M, Regis S, Romeo G, Toniolo D. (1994). Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet.* 8 : 323-327.
 33. Bizarro RO, Callahan JA, Feldt RH, Kurland LT, Gordon H, Brandenburg RO. (1970). Familial atrial septal defect with prolonged atrioventricular conduction. A syndrome showing the autosomal dominant pattern of inheritance. *Circulation.* 41 : 677-683.
 34. Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Becane HM, Hammouda EH, Merlini L, Muntoni F, Greenberg CR, Gary F, Urtizberea JA, Duboc D, Fardeau M, Toniolo D, Schwartz K. (1999). Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet.* 21 : 285-288.
 35. Bortoluzzi S, Alessi F, Danieli A. (2000). A computational reconstruction of the adult human heart transcriptional profile. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32 : 1931-1938.
 36. Brahmajothi MV, Morales MJ, Liu S, Rasmusson RL, Campbell DL, Strauss HC. (1996). In situ hybridization reveals extensive diversity of K⁺ channel mRNA in isolated ferret cardiac myocytes. *Circ Res.* 78 : 1083-1089.
 37. Brink AJ et Torrington M.(1977). Progressive Familial heart Block- Two Types. *S.Afr.Med.J.* 52 : 53-59.
 38. Brink PA, Ferreira A, Moolman JC, Weymar HW, Van der Merwe PL, Corfield VA. (1995). Gene for progressive familial heart block type 1 maps to chromosome 19q13. *Circulation.* 91 : 1633-1640.
 39. Cabo C, Pertsov AM, Baxter WT, Davidenko JM, Gray RA, Jalife J. (1994). Wave-front curvature as a cause of slow conduction and block in isolated cardiac muscle. *Circ Res.* 75 : 1014-1028.
 40. Canale ED, Campbell GR, Smolich JJ, campbell JH. (1986). *Cardiac Muscle.* Berlin, Germany :Springer Verlag ; 1986.

41. Cantin M, Thibault G, Haile-Meskel H, Ding J, Milne RW, Ballak M, Charbonneau C, Nemer M, Drouin J, Garcia R, et al. (1989). Atrial natriuretic factor in the impulse-conduction system of rat cardiac ventricles. *Cell Tissue Res.* 256 : 309-325.
42. Carp CC. (1957). Dissociation auriculo-ventriculaire complète congénitale et familiale. *Arch. Mal. Cœur.* 50 : 654-659.
43. Chan-Thomas PS, Thompson RP, Robert B, Yacoub MH, Barton PJ. (1993). Expression of homeobox genes *Msx-1* (*Hox-7*) and *Msx-2* (*Hox-8*) during cardiac development in the chick. *Dev Dyn.* 197 : 203-216.
44. Chen CY, Schwartz RJ. (1995) Identification of novel DNA binding targets and regulatory domains of a murine tinman homeodomain factor, *nkx-2.5*. *J Biol Chem.* 270 :15628-15633.
45. Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, Brugada R, Brugada J, Brugada P, Potenza D, Moya A, Borggrefe M, Breithardt G, Ortiz-Lopez R, Wang Z, Antzelevitch C, O'Brien RE, Schulze-Bahr E, Keating MT, Towbin JA, Wang Q. (1998). Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature.* 392 : 293-296.
46. Chen S, Chung MK, Martin D, Rozich R, Tchou PJ, Wang Q. (2002). SNP S1103Y in the cardiac sodium channel gene *SCN5A* is associated with cardiac arrhythmias and sudden death in a white family. *J Med Genet.* 39 : 913-915.
47. Chen ZQ, Lefebvre D, Bai XH, Reaume A, Rossant J, Lye SJ. (1995). Identification of two regulatory elements within the promoter region of the mouse connexin 43 gene. *J Biol Chem.* 270 : 3863-3868.
48. Cheng G, Litchenberg WH, Cole GJ, Mikawa T, Thompson RP, Gourdie RG. (1999). Development of the cardiac conduction system involves recruitment within a multipotent cardiomyogenic lineage. *Development.* 126 : 5041-5049.
49. Christoffels VM, Keijsers AG, Houweling AC, Clout DE, Moorman AF. (2000). Patterning the embryonic heart: identification of five mouse Iroquois homeobox genes in the developing heart. *Dev Biol.* 224 : 263-274.
50. Clancy CE, Rudy Y. (2002). Na^{+} channel mutation that causes both Brugada and long-QT syndrome phenotypes: a simulation study of mechanism. *Circulation.* 105 : 1208-1213.

51. Combrink JM, Davis WH, Snyman HW. (1962). Familial bundle branch block. *Am. Heart J.* 64 : 397-400.
52. Coppén SR, Dupont E, Rothery S, Severs NJ. (1998). Connexin45 expression is preferentially associated with the ventricular conduction system in mouse and rat heart. *Circ Res.* 82 : 232-243.
53. Coppén SR, Severs NJ, Gourdie RG. 1999. Connexin45 (alpha 6) expression delineates an extended conduction system in the embryonic and mature rodent heart. *Dev Genet.* 24 : 82-90.
54. Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT. (1995). A molecular basis for cardiac arrhythmia : HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell.* 80 : 795-803.
55. Dai K S, Liew CC. (1999). Chromosomal, in silico and in vitro expression analysis of cardiovascular-based genes encoding winc finger proteins. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31 : 1749-1769.
56. Dalakas MC, Park KY, Semini-Mora C, Lee HS, Sivakumar K, Golfard LG. (2000). Desmin myopathy, a skeletal myopathy with cardiomyopathy caused by mutations in the desmin gene. *N. Engl. J. Med.* 342 : 770-780.
57. Davies MP, Anderson RH, Doevendans P, Kubalak S, Chien KR, Kass RS. (1996). Developmental changes in ionic channel activity in the embryonic murine heart. *Circ. Res.* 78 : 15-25.
58. Davis LM, Rodefeld ME, Green K, Beyer EC, Saffitz JE. (1995). Gap junction protein phenotypes of the human heart and conduction system. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 6 : 813-822.
59. de Groot IJ, Hardy GP, Sanders E, Los JA, Moorman AF. (1985). The conducting tissue in the adult chicken atria. A histological and immunohistochemical analysis. *Anat Embryol.* 172 : 239-245.
60. de Groot IJ, Lamers WH, Moorman AF. (1989). Isomyosin expression patterns during rat heart morphogenesis: an immunohistochemical study. *Anat Rec.* 224 : 365-373.
61. de Groot IJ, Sanders E, Visser SD, Lamers WH, de Jong F, Los JA, Moorman AF. (1987). Isomyosin expression in developing chicken atria : a marker for the development of conductive tissue. *Anat Embryol.* 176 : 515-523.
62. de Groot IJM, Wessels A, Viragh S, Lamers WH, Moorman AF. (1988). The relation between isomyosin heavy chain expression pattern and the architecture of sinoatrial nodes in chicken, rat

- and human embryos. In : Carraro U, ed. Sarcomeric and non- Sarcomeric Muscles : Basic and Applied research prospects for the 90s. Padova, Italy : Unipress. 1988 : 305-310.
63. De Jong F, Geerts WJ, Lamers WH, Los JA, Moorman AF. (1990). Isomyosin expression pattern during formation of the tubular chicken heart : a three-dimensional immunohistochemical analysis. *Anat Rec.* 226 : 213-227.
 64. De Meeus A, Stéphan E, Debrus S, Jean MK, Loiselet J, Weissenbach J, Demaille J, Bouvagnet P. (1995). An isolated cardiac conduction disease maps to chromosome 19q. *Cir. Res.* 77 : 735-740.
 65. Deal KK, England SK, Tamkun MM. (1996). Molecular physiology of cardiac potassium channels. *Physiol Rev.* 76 : 49-67.
 66. Dechesne CA, Leger JO, Leger JJ. (1987). Distribution of alpha- and beta-myosin heavy chains in the ventricular fibers of the postnatal developing rat. *Dev Biol.* 123 : 169-178.
 67. Delorme B, Dahl E, Jarry-Guichard T, Marics I, Briand JP, Willecke K, Gros D, Theveniau-Ruissy M. (1995). Developmental regulation of connexin 40 gene expression in mouse heart correlates with the differentiation of the conduction system. *Dev Dyn.* 204 : 358-371.
 68. Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J. (1996). A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature.* 380 : 152-154.
 69. Dobrzynski H, Rothery SM, Marples DD, Coppin SR, Takagishi Y, Honjo H, Tamkun MM, Henderson Z, Kodama I, Severs NJ, Boyett MR. (2000). Presence of the Kv1.5 K(+) channel in the sinoatrial node. *J Histochem Cytochem.* 48 : 769-780.
 70. Dumaine R, Towbin JA, Brugada P, Vatta M, Nesterenko DV, Brugada J, Brugada R, Antzelevitch C. (1999). Ionic mechanisms responsible for the electrocardiographic phenotype of the Brugada syndrome are temperature dependent. *Circ. Res.* 85 : 803-809.
 71. Dunnen JT, Antonarakis SE. (2000). Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations : A discussion. *Human Mutation.* 15 : 7-12.
 72. Emanuel R, O'Brien K, Somerville J, Jefferson K, Hegde M. (1975). Association of secundum atrial septal defect with abnormalities of atrioventricular conduction or left axis deviation. Genetic study of 10 families. *Br. Heart J.* 37 : 1085-1092.

73. Emery A.E. (1989). Emery-Dreifuss syndrome. *J. Med. Genet.* 26 : 637-641.
74. Erikson A, Wahlestedt C, Nordqvist K. (1999). Isolation of sex-specific cDNAs from fetal mouse brain using mRNA differential display and representational difference analysis. *Molecular Brain Research.* 74 : 91-97.
75. Eriksson A, Nordqvist K. (2001). Protocol for using signal peptide differential display and representational difference analysis to isolate differentially expressed cDNAs from fetal mouse brain. *Brain Research Protocol.* 6 : 119-128.
76. Eriksson A, Thornell L-E, Stigbrand T. (1979). Skeletin immunoreactivity in heart Purkinje fibers from several species. *J Histochem Cytochem.* 27 :1604-1609.
77. Eriksson A, Wahlestedt C, Nordqvist K. (1999). Isolation of sex-specific cDNAs from fetal mouse brain using mRNA differential display and representational difference analysis. *Molecular Brain Research,* 74 : 91-97.
78. Eriksson M, Brown TW, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, Erdos MR, Robbins CM, Moes TY, Berglund P, Dutra A, Pak E, Durkins S, et al. (2003). Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature.* 423 : 293-298.
79. Esscher E, Hardell LI, Michaelsson M. (1975). Familial, isolated, complete right bundle-branch block. *Br. Heart J.* 37 : 745-747.
80. Evans W. (1949). Familial cardiomegaly. *Br. Heart J.* 11 : 68-82.
81. Forsgren S, Strehler E, Thornell LE. (1983). Differentiation of the atrioventricular node, the atrioventricular bundle and the bundle branches in the bovine heart : an immunohistochemical and enzyme histochemical study. *Histochem J.* 15 :1099-1111.
82. Forsgren S, Thornell LE, Eriksson A. (1980). The development of the Purkinje fibre system in the bovine fetal heart. *Anat Embryol (Berl).* 159 : 125-135.
83. Franco D, Demolombe S, Kupersmidt S, Dumaine R, Dominguez JN, Roden D, Antzelevitch C, Escande D, Moorman AF. (2001). Divergent expression of delayed rectifier K(+) channel subunits during mouse heart development. *Cardiovasc Res.* 52 : 65-75.

84. Frohme M, Scharm B, Delius H, Knecht R, Hoheisel JD. (2000). Use of representational difference analysis and cDNA arrays for transcriptional profiling of tumor tissue. *Ann. N. Y. Acad Sci.* 910 : 85-104.
85. Fung YW, Liew CC. (1996). Identification of genes associated with myocardial development. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 28 : 1241-1249.
86. Gambetta M, Weese J, Ginsburg M, Shapiro D. (1973). Sick sinus syndrome in a patient with familial PR prolongation. *Chest.* 64 : 520-523.
87. Gassmann M, Casagrande F, Orioli D, Simon H, Lai C, Klein R, Lemke G. (1995). Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature.* 378 : 390-394
88. Gazes PC, Culler RM, Taber E, Kelly TE. (1965). Congenital familial cardiac conduction defects. *Circulation.* 35 : 32-34.
89. Geng M, Wallrapp C, Muller-Pillarsch F, Frohme M, Hoheisel JD, Gress TM. (1998). Isolation of differentially expressed genes by combining representational difference analysis (RDA) and cDNA library arrays. *Biotechniques.* 25 : 434-438.
90. Godin JF, Nicolas G, Bouhour JB, Horeau J. (1973). Familial form of atrio-ventricular conduction disorders. A propos of a case of syncopal atrioventricular block in a 21-month-old child. Pacemaker implantation. *Ann. Cardiol. Angeiol.* 22 : 331-337.
91. Gonzalez-Sanchez A, Bader D. (1985). Characterization of a myosin heavy chain in the conductive system of the adult and developing chicken heart. *J Cell Biol.* 100 : 270-275.
92. Gordon L, Wharton J, Moore SE, Walsh FS, Moscoso JG, Penketh R, Wallwork J, Taylor KM, Yacoub MH, Polak JM. (1990). Myocardial localization and isoforms of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in the developing and transplanted human heart. *J Clin Invest.* 86 : 1293-1300.
93. Gorza L, Ausoni S, Merciai N, Hastings KE, Schiaffino S. (1993). Regional differences in troponin I isoform switching during rat heart development. *Dev Biol.* 156 : 253-264.
94. Gorza L, Saggin L, Sartore S, Ausoni S. (1988c). An embryonic-like myosin heavy chain is transiently expressed in nodal conduction tissue of the rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 20 : 931-941.

95. Gorza L, Sartore S, Thornell LE, Schiaffino S. (1986). Myosin types and fiber types in cardiac muscle. III. Nodal conduction tissue. *J Cell Biol.* 102 : 1758-1766.
96. Gorza L, Schiaffino S, Vitadello M. (1988a). Heart conduction system: a neural crest derivative?. *Brain Res.* 457 : 360-366.
97. Gorza L, Thornell LE, Schiaffino S. (1988b). Nodal myosin distribution in the bovine heart during prenatal development : an immunohistochemical study. *Circ Res.* 62 : 1182-1190.
98. Gorza L, Vitadello M. (1989). Distribution of conduction system fibers in the developing and adult rabbit heart revealed by an antineurofilament antibody. *Circ Res.* 65 : 360-369.
99. Gould WL. (1957). Auricular fibrillations. Report of a story of a familial tendency, 1920-1956. *Arch. Intern. Med.* 100 : 916-926.
100. Gourdie RG, Green CR, Severs NJ, Anderson RH, Thompson RP. (1993a). Evidence for a distinct gap-junctional phenotype in ventricular conduction tissues of the developing and mature avian heart. *Circ Res.* 72 : 278-289.
101. Gourdie RG, Green CR, Severs NJ, Thompson RP. (1992). Immunolabelling patterns of gap junction connexins in the developing and mature rat heart. *Anat Embryol (Berl).* 185 : 363-378.
102. Gourdie RG, Kubalak S, Mikawa T. (1999). Conducting the embryonic heart : orchestrating development of specialized cardiac tissues. *Trends Cardiovasc Med.* 9 : 18-26.
103. Gourdie RG, Mima T, Thompson RP, Mikawa T. (1995). Terminal diversification of the myocyte lineage generates Purkinje fibers of the cardiac conduction system. *Development.* 121 : 1423-1431.
104. Gourdie RG, Severs NJ, Green CR, Rothery S, Germroth P, Thompson RP. (1993). The spatial distribution and relative abundance of gap-junction connexine 40 and connexine 43 correlate to functional properties of components of the cardiac atrioventricular conduction system. *J Cell Sci.* 105 : 985-991.
105. Gourdie RG, Wei Y, Kim D, Klatt SC, Mikawa T. (1998). Endothelin-induced conversion of embryonic heart muscle cells into impulse-conducting Purkinje fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95 : 6815-6818.

106. Gourdie RG, Wei Y, Kim D, Klatt SC, Mikawa T. (1998). Endothelin-induced conversion of embryonic heart muscle cells into impulse-conducting Purkinje fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95 : 6815-6818.
107. Grant AO. (2001). Molecular biology of sodium channels and their role in cardiac arrhythmias. *Am J Med.* 110 : 296-305.
108. Greenspahn BR, Denes P, Daniel W, Rosen KM. (1976). Chronic bifascicular block: evaluation of familial factors. *Ann. Intern. Med.* 84 : 521-525.
109. Grompe M. (1993). The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nat Genet.* 5 : 111-117.
110. Gros D, Jarry-Guichard T, Ten Velde I, de Maziere A, van Kempen MJ, Davoust J, Briand JP, Moorman AF, Jongsma HJ. (1994). Restricted distribution of connexin40, a gap junctional protein, in mammalian heart. *Circ Res.* 74 : 839-851.
111. Guilbot A, Williams A, Ravise N, Verny C, Brice A, Sherman DL, Brophy PJ, LeGuern E, Delague V, Bareil C, Megarbane A, Claustres M. (2001). A mutation in periaxin is responsible for CMT4F, an autosomal recessive form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum Mol Genet.* 10 : 415-521.
112. Guo L, Lynch J, Nakamura K, Fliegel L, Kasahara H, Izumo S, Komuro I, Agellon LB, Michalak M. (2001). COUP-TF1 antagonizes Nkx2.5-mediated activation of the calreticulin gene during cardiac development. *J Biol Chem.* 276 : 2797-2801.
113. Habets PE, Moorman AF, Clout DE, van Roon MA, Lingbeek M, van Lohuizen M, Campione M, Christoffels VM. (2002). Cooperative action of Tbx2 and Nkx2.5 inhibits ANF expression in the atrioventricular canal : implications for cardiac chamber formation. *Genes Dev.* 16 : 1234-1246.
114. Haeseleer F, Sokal I, Verlinde C L, Erdjument-Bromage H, Temps P, Pronin AN, Benovic J, Fariss R, Palczewski K. (2000). Five members of a novel Ca²⁺-binding protein (CABP) subfamily with similarity to Calmodulin. *J. Biol. Chem.* 275 : 1247-1260.

115. Hansson M, Forsgren S. (1993). Presence of immunoreactive atrial natriuretic peptide in nerve fibres and conduction cells in the conduction system of the bovine heart. *Anat Embryol.* 188 : 331-337.
116. Harvey RP. (1996). NK-2 homeobox genes and heart development. *Dev Biol.* 178 : 203-216.
117. Hasselbaink HD, Labruyere WT, Moorman AF, Lamers WH. (1990). Creatine kinase isozyme expression in prenatal rat heart. *Anat Embryol.* 182 : 195-203.
118. Hillier L. and Green P. (1991). OSP : a computer program for choosing PCR and DNA sequencing primers. *PCR Meth Appl.* 1 : 124-128.
119. Hofmann SL, Goldstein JL, Orth K, Moomaw CR, Slaughter CA, Brown MS. (1989). Molecular cloning of a histidine-rich Ca²⁺-binding protein of sarcoplasmic reticulum that contains highly conserved repeated elements. *The Journal of Biological Chemistry.* 264 : 18083-18090.
120. Hofmann SL, Matthew Topham M, Hsieh C-L, Francke U. (1990). cDNA and genomic cloning of HRC, a human sarcoplasmic reticulum protein, and localization of the gene of human chromosome 19 and mouse chromosome 7. *Genomics.* 9 : 656-669.
121. Houweling AC, Somi S, Van Den Hoff MJ, Moorman AF, Christoffels VM. (2002) Developmental pattern of ANF gene expression reveals a strict localization of cardiac chamber formation in chicken. *Anat Rec.* 266 : 93-102
122. Hubank M, Schatz D.G. (1994). Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis. *Nucleic Acids Research.* 22 : 5640-5648.
123. Husson GS, Blackman MS, Rogers MC, Bharati S, Lev M. (1973). Familial congenital bundle branch system disease. *Am. J. Cardiol.* 32 : 365-369.
124. Hwang DM, Dempsey A, Wang RX, Rezvani M, Barrans D, Dai KS, Wang HY, Ma H, Cukerman E, Liu YQ, Gu JR, Zhang JH, Tsui SKW, Waye MMY, Fung KP, Lee CY, Liew CC. (1997). A genome-based resource for molecular cardiovascular medicine : Toward a compendium of cardiovascular genes. *Circulation.* 96 : 4146-4203.
125. Hyer J, Johansen M, Prasad A, Wessels A, Kirby ML, Gourdie RG, Mikawa T. (1999). Induction of Purkinje fiber differentiation by coronary arterialization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96 :13214-13218.

126. Ikeda T, Iwasaki K, Shimokawa I, Sakai H, Ito H, Matsuo T. (1990). Leu-7 immunoreactivity in human and rat embryonic hearts, with special reference to the development of the conduction tissue. *Anat Embryol.* 182 : 553-562.
127. International Human Genome Sequencing Consortium. (2001). *Nature.* 409.
128. Ishii TM, Takano M, Xie LH, Noma A, Ohmori H. (1999). Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J Biol Chem.* 274 : 12835-12839.
129. Ismail RS, Baldwin RL, Fang J, Browning D, Karlan BY, Gasson JC, Chang DD. (2000). Differential gene expression between normal and tumor-derived ovarian epithelial cells. *Cancer Res.* 60 : 6744-6749.
130. Ito H, Iwasaki K, Ikeda T, Sakai H, Shimokawa I, Matsuo T. (1992). HNK-1 expression pattern in normal and bis-diamine induced malformed developing rat heart: three dimensional reconstruction analysis using computer graphics. *Anat Embryol.* 186 :327-334.
131. Kalman et al . (1998) . Genomic organisation, chromosomal localization, tissue distribution, and biophysical characterization a novel mammalian Shaker-related voltage-gated potassium channel, Kv1.7. *J. Biol. Chem.* 273 : 5851-5857.
132. Kanno S, Saffitz JE. (2001). The role of myocardial gap junctions in electrical conduction and arrhythmogenesis. *Cardiovasc Pathol.* 10 : 169-177.
133. Kanter HL, Laing JG, Beau SL, Beyer EC, Saffitz JE. (1993). Distinct patterns of connexin expression in canine Purkinje fibers and ventricular muscle. *Circ Res.* 72 : 1124-1131.
134. Kanzawa N, Poma CP, Takebayashi-Suzuki K, Diaz KG, Layliev J, Mikawa T. (2002). Competency of embryonic cardiomyocytes to undergo Purkinje fiber differentiation is regulated by endothelin receptor expression. *Development.* 129 : 3185-3194.
135. Kasahara H, Lee B, Schott JJ, Benson DW, Seidman JG, Seidman CE, Izumo S. (2000). Loss of function and inhibitory effects of human CSX/NKX2.5 homeoprotein mutations associated with congenital heart disease. *J Clin Invest.* 106 : 299-308.
136. Kasahara H, Wakimoto H, Liu M, Maguire CT, Converso KL, Shioi T, Huang WY, Manning WJ, Paul D, Lawitts J, Berul CI, Izumo S. (2001). Progressive atrioventricular conduction defects

- and heart failure in mice expressing a mutant Csx/Nkx2.5 homeoprotein. *J Clin Invest* ; 108(2):189-201.
137. Kass S, MacRae C, Graber HL, Sparks EA, McNamara D, Boudoulas H, Basson CT, Baker PB 3rd, Cody RJ, Fishman MC, et al. (1994). A gene defect that causes conduction system disease and dilated cardiomyopathy maps to chromosome 1p1-1q1. *Nat Genet.* 7 : 546-551.
138. Kelly MM, Phanhourath C, Brees DK, McCabe CF, Cole GJ. (1995). Molecular characterization of EAP-300 : a high molecular weight, embryonic polypeptide containing an amino acid repeat comprised of multiple leucine-zipper motifs. *Brain Res Dev.* 85 : 31-47.
139. Kennel AJ, Callahan JA, Maloney JD, Zajarias A. (1981). Adult-onset familial infra-Hisian block. *Am. Heart J.* 102 : 447-452.
140. Kim JS, Viragh S, Moorman AF, Anderson RH, Lamers WH. (2001). Development of the myocardium of the atrioventricular canal and the vestibular spine in the human heart. *Circ Res.* 88 : 395-402
141. Kirby ML, Kumiski DH, Myers T, Cerjan C, Mishima N. (1993). Backtransplantation of chick cardiac neural crest cells cultured in LIF rescues heart development. *Dev Dyn.* 198 : 296-311.
142. Kirby ML, Stewart DE. (1983). Neural crest origin of cardiac ganglion cells in the chick embryo: identification and extirpation. *Dev Biol.* 97 : 433-443.
143. Kirchhoff S, Nelles E, Hagendorff A, Kruger O, Traub O, Willecke K. (1998). Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice. *Curr Biol.* 8 : 299-302.
144. Kjorell U, Thornell LE, Lehto VP, Virtanen I, Whalen RG. (1987). A comparative analysis of intermediate filament proteins in bovine heart Purkinje fibres and gastric smooth muscle. *Eur J Cell Biol.* 44 : 68-78.
145. Koban MU, Brugh SA, Riordon DR, Dellow KA, Yang HT, Tweedie D, Boheler KR. (2001). A distant upstream region of the rat multipartite Na(+)-Ca(2+) exchanger NCX1 gene promoter is sufficient to confer cardiac-specific expression. *Mech Dev.* 109 : 267-279.

146. Kodama I, Nikmaram MR, Boyett MR, Suzuki R, Honjo H, Owen JM. (1997). Regional differences in the role of the Ca²⁺ and Na⁺ currents in pacemaker activity in the sinoatrial node. *Am J Physiol.* 272 : 2793-2806.
147. Komuro I, Nomoto K, Sugiyama T, Kurabayashi M, Takaku F, Yazaki Y. (1987). Isolation and characterization of myosin heavy chain isozymes of the bovine conduction system. *Circ Res.* 61 : 859-865.
148. Krawczak M, Reiss J, Cooper DN. (1992). The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum. Genet.* 90 : 41-54.
149. Kucera JP, Kleber AG, Rohr S. (1998). Slow conduction in cardiac tissue, II: effects of branching tissue geometry. *Circ Res.* 83 : 795-805.
150. Kunemund V, Jungalwala FB, Fischer G, Chou DK, Keilhauer G, Schachner M. (1988). The L2/HNK-1 carbohydrate of neural cell adhesion molecules is involved in cell interactions. *J Cell Biol.* 106 : 213-223.
151. Kunkel LM, Monaco AP, Middlesworth W, Ochs HD, Latt SA. (1985). Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82 : 4778-4782.
152. Kupersmidt S, Snyders DJ, Raes A, Roden DM. (1998). A K⁺ channel splice variant common in human heart lacks a C-terminal domain required for expression of rapidly activating delayed rectifier current. *J. Biol. Chem.* 273 : 27231-27235.
153. Kupersmidt S, Yang T, Anderson ME, Wessels A, Nieswender KD, Magnuson MA, Roden DM. (1999). Replacement by homologous recombination of the mink gene with lac Z reveals restriction of mink expression to the mouse cardiac conduction system. *Circ. Res.* 84 : 146-152.
154. Kupersmidt S, Yang T, Roden DM. (1998). Modulation of cardiac Na⁺ current phenotype by beta1-subunit expression. *Circ. Res.*; 83(4):441-447.
155. Kuro-o M, Tsuchimochi H, Ueda S, Takaku F, Yazaki Y. (1986). Distribution of cardiac myosin isozymes in human conduction system. Immunohistochemical study using monoclonal antibodies. *J Clin Invest.* 77 : 340-347.

156. Kwong KF, Schuessler RB, Green KG, Laing JG, Beyer EC, Boineau JP, Saffitz JE. (1998). Differential expression of gap junction proteins in the canine sinus node. *Circ Res.* 82 : 604-612.
157. Kyndt F, Probst V, Potet F, Demolombe S, Chevallier JC, Baro I, Moisan JP, Boisseau P, Schott JJ, Escande D, Le Marec H. (2001). Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation.* 104 : 3081-3086.
158. Kyndt F. (2002). Génétique des maladies cardiovasculaires dégénératives. pp.301. Thèse de Doctorat : Sciences de la vie et de la santé. Nantes.
159. Lamers WH, De Jong F, De Groot IJ, Moorman AF. (1991). The development of the avian conduction system, a review. *Eur J Morphol.* 29 : 233-253.
160. Lamers WH, Geerts WJ, Moorman AF, Dottin RP. (1989). Creatine kinase isozyme expression in embryonic chicken heart. *Anat Embryol.* 179 : 387-393.
161. Lander E, Botstein D. (1987). Homozygosity mapping : a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science.* 236 : 1567-1570.
162. Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J. (1985). Multilocus linkage analysis in humans : detection of linkage and estimation of recombination. *Am. J. Hum. Genet.* 37 : 482-498.
163. Lee HG, Hara Kang, Do Han Kim, Woo Jin Park. (2000). Interaction of HRC (Histidine-rich Ca⁺⁺-binding protein) and triadin in the lumen of sarcoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry.* 276 : 39533-39538.
164. Lee KF, Simon H, Chen H, Bates B, Hung MC, Hauser C. (1995). Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature.* 378 : 394-398.
165. Lefranc G, Rivat L, Serre JL, Lalouel JM, Pison G, Loiselet J, Ropartz C, de Lange G, van Loghem E. (1978). Common and uncommon immunoglobulin haplotypes among Lebanese communities. *Hum Genet.* 41 : 197-209.
166. Lenègre J, Deparis M, Auzepy P, Gay J. (1970). 2 cases (1 of them anatomo-clinical) of probably congenital atrio-ventricular block with regressive course. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.* 63 : 749-763.

167. Lenègre J, Moreau PH. (1963). Le bloc auriculo-ventriculaire chronique. Etude anatomique, clinique et histologique. *Arch. Mal. Cœur.* 56 : 867-888.
168. Lev M, Cuadros H, Paul MH. (1971). Interruption of the atrioventricular bundle with congenital atrioventricular block. *Circulation.* 43 : 703-710.
169. Lev M, Kinare SG, Pick A. (1970). The pathogenesis of atrioventricular block in coronary disease. *Circulation.* 42 : 409-425.
170. Lev M, Silverman J, Fitzmaurice FM, Paul MH, Cassels DE, Miller RA. (1971). Lack of connection between the atria and the more peripheral conduction system in congenital atrioventricular block. *Am. J. Cardiol.* 27 : 481-490.
171. Lev M. (1964). Anatomic basis for atrioventricular block. *Am. J. Cardiol.* 37 : 742-748.
172. Li D, Tapscoft T, Gonzalez O, Burch PE et al. (1999). Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 100: 461-464.
173. Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M. (1998). Transmural heterogeneity of action potentials and Ito1 in myocytes isolated from the human right ventricle. *Am. J. Physiol.* 275 : 369-377.
174. Li Z, Marchand P, Humbert J, Babinet C, Paulin D. (1993). Desmin sequence elements regulating skeletal muscle-specific expression in transgenic mice. *Development.* 117 : 947-959.
175. Liew CC, Hwang DM, Wang RX, Ng SH, Dempsey A, Wen DHY, Ma H, Cukerman E, Zhao XG, Liu YQ, Qiu XK, Zhou XM, Gu JR, Tsui S, Fung KP, Waye MMW, Lee CY. (1997). Construction of a human heart cDNA library and identification of cardiovascular based genes (CVBest). *Mol. Cell. Biochem.* 172 : 81-87.
176. Lin H, Pizer AS, Morin PJ. (2000). A frequent deletion polymorphism on chromosome 22q13 identified by representational difference analysis of ovarian cancer. *Genomics.* 69 : 391-394.
177. Lipka LJ, Siegelbaum SA, Robinson RB, Berman MF. (1996). An analogue of cAMP mimics developmental change in neonatal rat ventricular myocyte sodium current kinetics. *Am. J. Physiol.* 270 : 194-199.
178. Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M. (1993). Cloning the differences between two complex genomes. *Science.* 259 :946-951.

179. Ludwig A, Budde T, Stieber J, Moosmang S, Wahl C, Holthoff K, Langebartels A, Wotjak C, Munsch T, Zong X, Feil S, Feil R, Lancel M, Chien KR, Konnerth A, Pape HC, Biel M, Hofmann F. (2003). Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *EMBO J.* 22 : 216-224.
180. Ludwig A, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F, Biel M. (1999). Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J.* 18 : 2323-2329
181. Lupoglazoff JM, Cheav T, Baroudi G, Berthet M, Denjoy I, Cauchemez B, Extramiana F, Chahine M, Guicheney P. (2001). Homozygous SCN5A mutation in long-QT syndrome with functional two-to-one atrioventricular block. *Circ Res.* 89 : 16-21.
182. Lynch HT, Mohiuddin S, Moran J, Kaplan A, Sketch M, Zencka A, Runco V. (1975). Hereditary progressive atrioventricular conduction defect. *Am. J. Cardiol.* 36 : 297-301.
183. Lynch HT, Mohiuddin S, Sketch MH, Krush AJ, Carter S, Runco V. (1973). Hereditary progressive atrioventricular conduction defect. A new syndrome? *JAMA.* 225 : 1465-1470.
184. Lyons I, Parsons LM, Hartley L, Li R, Andrews JE, Robb L, Harvey RP. (1995). Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene *Nkx2-5*. *Genes Dev.* 9 : 1654-1666.
185. Maier SK, Westenbroek RE, Yamanushi TT, Dobrzynski H, Boyett MR, Catterall WA, Scheuer T. (2003). An unexpected requirement for brain-type sodium channels for control of heart rate in the mouse sinoatrial node. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100 : 3507-3512.
186. Marchionni MA. (1995). Cell-cell signalling. new tack on neuregulin. *Nature.* 378 : 334-335.
186. Mesaeli N, Nakamura K, Zvaritch E, Dickie P, Dziak E, Krause KH, Opas M, MacLennan DH, Michalak M. (1999). Calreticulin is essential for cardiac development. *J Cell Biol.* 144 : 857-868.
187. Messina DN, Speer MC, Pericak-Vance MA, McNally EM. (1997). Linkage of familial dilated cardiomyopathy with conduction defect and muscular dystrophy to chromosome 6q23. *Am J Hum Genet.* 61 : 909-917.
188. Meyer D, Birchmeier C. (1995). Multiple essential functions of neureglin in development. *Nature.* 378 : 386-390.

189. Michalak M, Corbett EF, Mesaeli N, Nakamura K, Opas M.(1999). Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J.* 344 : 281-292.
190. Michiels L, Van Leuven F, Van Den Oord JJ, De Wolf-Peeters C, Delabie J. (1998). Representational difference analysis using minute quantities of DNA. *Nucleic Acids Res.* 26 : 3608-3610.
191. Mikawa T, Fischman DA. (1996). The polyclonal origin of myocyte lineages. *Annu Rev Physiol.* 58 : 509-521.
192. Miura K, Hirai M, Kanai Y, Kurosawa Y. (1996). Organization of the human gene for Nucleobindin (NUC) and its chromosomal assignment to 19q13.2-q13.4. *Genomics.* 34 : 181-186.
193. Miura K, Kurosawa Y, Kanai Y. (1994). Calcium-binding activity of nucleobindin mediated by an EF hand moiety. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199 : 1388-1393.
194. Miura K, Titani K, Kurosawa Y, Kanai Y. (1992). Molecular cloning of nucleobindin, a novel DNA-binding protein that contains both a signal peptide and a leucine zipper structure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* ; 187 (1) : 375-380.
195. Mohler PJ, Schott JJ, Gramolini AO, Dilly WK, Guatimosim S, duBell Wh, et al. (2003). Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature.* 421 : 634-639.
196. Molkenin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN. (1997). Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev* ;11(8):1061-1072.
197. Moorman AF, de Jong F, Denyn MM, Lamers WH. (1998). Development of the cardiac conduction system. *Circ Res.* 82 : 629-644.
198. Moorman AF, Houweling AC, de Boer PA, Christoffels VM. (2001). Sensitive nonradioactive detection of mRNA in tissue sections: novel application of the whole-mount in situ hybridization protocol. *J Histochem Cytochem.* 49 : 1-8.
199. Moosmang S, Stieber J, Zong X, Biel M, Hofmann F, Ludwig A.(2001). Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur J Biochem.* 268 : 1646-1652.

200. Mootha VK, Lepage P, Miller K, Bunkenborg J, Reich M, Hjerrild M, Delmonte T, Villeneuve A, Sladek R, Xu F, Mitchell GA, Morin C, Mann M, Hudson TJ, Robinson B, Rioux JD, Lander ES. (2003). Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100 : 605-610.
201. Morgans CM, Gray KE, Robb GH. (1974). A survey of familial heart block. *Br. Heart J.* 36 : 693-696.
202. Morquio L. (1901). Sur une maladie infantile et familiale caractérisée par des modifications permanentes du pouls, des attaques syncopales et pileptiformes et la mort subite. *Arch. Med. Enfants.* 4 : 467-475.
203. Nakamura K, Robertson M, Liu G, Dickie P, Nakamura K, Guo JQ, Duff HJ, Opas M, Kavanagh K, Michalak M. (2001). Complete heart block and sudden death in mice overexpressing calreticulin. *J Clin Invest.* 107 : 1245-1253.
204. Nakamura TY, Artman M, Rudy B, Coetzee WA. (1998). Inhibition of rat ventricular IK1 with antisense oligonucleotides targeted to Kir2.1 mRNA. *Am J Physiol.* 274 : 892-900.
205. Nancy YI, Ibanez FC, Nye S, McClain J, Jones PF, Gies DR, Belluscio L, Le Beau MM, et al. (1992). Mammalian neurotrophin-4 : structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89 : 3060-3064.
206. Nguyen-Tran VT, Kubalak SW, Minamisawa S, Fiset C, Wollert KC, Brown AB, Ruiz-Lozano P, Barrere-Lemaire S, Kondo R, Norman LW, Gourdie RG, Rahme MM, Feld GK, Clark RB, Giles WR, Chien KR. (2000). A novel genetic pathway for sudden cardiac death via defects in the transition between ventricular and conduction system cell lineages. *Cell.* 102 : 671-682.
207. O'Neill MJ, Sinclair AH. (1997). Isolation of rare transcripts by representational difference analysis. *Nucleic Acids Research.* 25 : 2681-2682.
208. Odeberg J, Wood T, Blücher A, Rafter J, Norstedt G, Lundeberg J. (2000). A cDNA RDA protocol using solid-phase technology suited for analysis in small tissue samples. *Biomolecular Engineering.* 17 : 1-9.
209. Olson TM, Keating MT. Mapping a cardiomyopathy locus to chromosome 3p22-p25. (1996). *J Clin Invest.* 97 : 528-532.

210. Oltvai ZN, Milliman C, Korsmeyer SJ. (1993). Bcl2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 74 : 609-619.
211. Oosthoek PW, Van Kempen MJA, Wessels A, Lamers WH, Moorman AFM. (1990). Distribution of the cardiac gap junction protein, connexin-43 in the neonatal and adult human heart. In : Marechal G, Carraro U, eds. *Muscle and Motility*. 2nd ed. Andover, Hampshire, UK : Intercept. 85-90.
212. Oosthoek PW, Viragh S, Lamers WH, Moorman AF. (1993). Immunohistochemical delineation of the conduction system. II : The atrioventricular node and Purkinje fibers. *Circ Res*. 73 : 482-491.
213. Oosthoek PW, Viragh S, Mayen AE, van Kempen MJ, Lamers WH, Moorman AF. (1993). Immunohistochemical delineation of the conduction system. I : The sinoatrial node. *Circ Res*. 73 : 473-481.
214. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 : 2766-2770.
215. Osler W. (1903). On the so-called Stokes-Adams disease. *Lancet* 2 : 516-524.
216. Otte S, Barkinol-Watanabe S, Vorbrüggen G, Hilschmann N. (1999). NUCB1, the *Drosophila melanogaster* homolog of the mammalian EF-hand proteins NEFA and nucleobindin. *Mechanisms of Development*. 86 : 155-158.
217. Panaud O, Vitte C, Hivert J, Muzlak S, Talag J, Brar D, Sarr A. (2002). Characterization of transposable elements in the genome rice (*Oryza sativa* L.) using Representational Difference Analysis. *Mol. Genet. Genomics*. 268 : 113-121.
218. Papadatos GA, Wallerstein PM, Head CE, Ratcliff R, Brady PA, Benndorf K, Saumarez RC, Trezise AE, Huang CL, Vandenberg JI, Colledge WH, Grace AA. (2002). Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *PNAS*. 99 : 6210-6215.

219. Pastorian K, Hawel III L, Byus C.V. (2000). Optimization of cDNA representational difference analysis for the identification of differentially expressed mRNAs. *Anal. Biochem.* 283 : 89-98.
220. Pathak RK, Anderson R, Hofman SL (1992) Histidine-rich calcium binding protein, a sarcoplasmic reticulum protein of striated muscle is also abundant in arteriolar smooth muscle cells, *J Muscle Res Cell Motil.* 13 : 366-372.
221. Patten BM. 1956. The development of the sinoventricular conduction system. *Univ Mich Med Bull.* 22 : 1-21.
222. Picello E, Damiani E, Margreth A. (1992). Low affinity Ca^{2+} -binding sites versus Zn^{2+} -binding sites in histidine-rich Ca^{2+} -binding protein of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum, *Biochem Biophys Res Commun.* 186 : 659-667.
223. Priori SG, Barhanin J, Hauer RN, Haverkamp W, Jongsma HJ, Kleber AG, McKenna WJ, Roden DM, Rudy Y, Schwartz K, Schwartz PJ, Towbin JA, Wilde AM. (1999). Genetic and molecular basis of cardiac arrhythmias: impact on clinical management parts I and II. *Circulation.* 99 : 518-528, 647-681.
224. Probst V, Kyndt F, Potet F, Trochu JN, Mialet G, Demolombe S, Schott JJ, Baro I, Escande D, Le Marec H. (2003). Haploinsufficiency in combination with aging causes SCN5A-linked hereditary Lenegre disease. *J Am Coll Cardiol.* 41 : 643-52
225. Rae JL and Shepard AR. (2000). Kv3.3 potassium channels in lens epithelium and corneal endothelium. *Exp. Eye Res.* 70 : 339-348.
226. Rampazzo A, Nava A, Miorin M, Fonderico P, Pope B, Tiso N, Livolsi B, Zimbello R, Thiene G, Danieli GA. (1997). ARVD4, a new locus for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, maps to chromosome 2 long arm. *Genomics.* 45 : 259-263.
227. Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM, Rossant J.(1995). Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science.* 267 : 1831-1834.

228. Rentschler S, Vaidya DM, Tamaddon H, Degenhardt K, Sassoon D, Morley GE, Jalife J, Fishman GI. (2001). Visualization and functional characterization of the developing murine cardiac conduction system. *Development*. 128 : 1785-1792.
229. Rentschler S, Zander J, Meyers K, France D, Levine R, Porter G, Rivkees SA, Morley GE, Fishman GI. (2002). Neuregulin-1 promotes formation of the murine cardiac conduction system. *Proc Natl Acad Sci*. 99 : 10464-10469.
230. Rivolta I, Clancy CE, Tateyama M, Liu H, Priori SG, Kass RS. (2002). A novel SCN5A mutation associated with long QT-3 : altered inactivation kinetics and channel dysfunction. *Physiol Genomics*. 10 : 191-197.
231. Rohr S, Kucera JP, Kleber AG. (1998). Slow conduction in cardiac tissue, I: effects of a reduction of excitability versus a reduction of electrical coupling on microconduction. *Circ Res*. 83 : 781-794.
232. Sacchetto R, Damiani E, Turcato F, Nori A, Margreth A. 2001. Ca^{++} -dependant interaction of triadin with histidine-rich Ca^{++} -binding protein carboxyl-terminal region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* . 289 : 1125-1134.
233. Saffitz JE, Laing JG, Yamada KA. (2000). Connexin expression and turnover : implications for cardiac excitability. *Circ Res*. 86 : 723-728.
234. Sanders E, de Groot IJ, Geerts WJ, de Jong F, van Horssen AA, Los JA, Moorman AF. (1986). The local expression of adult chicken heart myosins during development. II. Ventricular conducting tissue. *Anat Embryol*. 174 : 187-193.
235. Sanders E, Moorman AF, Los JA. (1984). The local expression of adult chicken heart myosins during development. I : The three days embryonic chicken heart. : *Anat Embryol*. 169 : 185-191.
236. Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, Keating MT. (1996). Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature*. 384 : 80-83.

237. Santoro B, Chen S, Luthi A, Pavlidis P, Shumyatsky GP, Tibbs GR, Siegelbaum SA. (2000). Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J Neurosci.* 20 : 5264-5275.
238. Sanyanusin P, Schimmenti LA, McNoe TA, Ward TA, Pierpont ME, Sullivan MJ, Dobyns WB, Eccles MR. (1996). Mutation of the gene in a family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux. *Nat Genet.* 13 :129.
239. Sarachek NS et Leonard JJ. (1972) . Familial heart block and sinus bradycardia : classification and natural history. *AM. J.Cardiol.* 29 : 451-458.
240. Sartore S, Gorza L, Pierobon Bormioli S, Dalla Libera L, Schiaffino S. (1981). Myosin types and fiber types in cardiac muscle. I : Ventricular myocardium. *J Cell Biol.* 88 : 226-233.
241. Sartore S, Pierobon-Bormioli S, Schiaffino S. (1978). Immunohistochemical evidence for myosin polymorphism in the chicken heart. *Nature.* 274 : 82-83.
242. Schaal SF, Seidensticker J, Goodman R, Wooley CF. (1973) . Familial right bundle branch block, left axis deviation, complete heart block and early death. A heritable disorder of cardiac conduction. *Ann. Intern. Med.* 79 : 63-66.
243. Schaal SF, Seidensticker J, Goodman R, Wooley CF. (1973). Familial right bundle-branch block, left axis deviation, complete heart block, and early death. A heritable disorder of cardiac conduction. *Ann. Intern. Med.* 79 : 63-66.
244. Schiaffino S. (1997). Protean patterns of gene expression in the heart conduction system. *Circ Res.* 80 : 749-750.
245. Schmitz AA, Lucito R, Van Aelst L. (2002). Using cDNA-representational difference analysis (cDNA-RDA) in combination with microarrays to identify Rac regulated genes. *Methods Mol Biol.* 189 : 25-43.
246. Schonberger J, Levy H, Grunig E, Sangwatanaroj S, Fatkin D, MacRae C, Stacker H, Halpin C, Eavey R, Philbin EF, Katus H, Seidman JG, Seidman CE. (2000). Dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss: a heritable syndrome that maps to 6q23-24. *Circulation.* 101 : 1812-1818.

247. Schott JJ, Alshinawi C, Kyndt F, Probst V, Hoorntje TM, Hulsbeek M, Wilde AA, Escande D, Mannens MM, Le Marec H. (1999). Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nature genetics*. 23 : 20-21.
248. Schott JJ, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach GM, Moak JP, Maron BJ, Seidman CE, Seidman JG. (1998). Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science*. 281 : 108-111.
249. Schulze-Bahr E, Isbrandt D, Neu A, Friederich P, Kaupp B, Pongs O, Breithardt G. (2001). A mutation in the cardiac pacemaker channel gene hHCN4 is linked to human sinus node disease. *Circulation*. 104 : 185-192.
250. Schulze-Bahr E, Neu A, Friederich P, Kaupp UB, Breithardt G, Pongs O, Isbrandt D. (2003). Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *J Clin Invest*. 111 : 1537-1545.
251. Segall HN. (1961). Congenital arrhythmias and conduction abnormalities in a father and four children. *The Canad. M.A.J.* 84 : 1283-1296.
252. Seul KH, Tadros PN, Beyer EC. (1997). Mouse connexin40: gene structure and promoter analysis. *Genomics*. 46 : 120-126.
253. Shaw RM, Rudy Y. (1997). Ionic mechanisms of propagation in cardiac tissue. Roles of the sodium and L-type calcium currents during reduced excitability and decreased gap junction coupling. *Circ Res*. 81 : 727-741.
254. Shi W, Wymore R, Yu H, Wu J, Wymore RT, Pan Z, Robinson RB, Dixon JE, McKinnon D, Cohen IS. (1999). Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ Res*. 85 : 1-6
255. Shiojima I, Komuro I, Inazawa J, Nakahori Y, Matsushita I, Abe T, Nagai R, Yazaki Y. (1995)
Assignment of cardiac homeobox gene CSX to human chromosome 5q34. *Genomics*. 27 : 204-206.
256. Shorofsky SR, Balke CW. (2001). Calcium currents and arrhythmias : insights from molecular biology. *Am J Med*. 110 : 127-140.

257. Simon AM, Goodenough DA. (1998). Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends Cell Biol.* 8 : 477-483.
258. Simonsen EE, Madsen EG. (1970). Four cases of right-sided bundle-branch block and one case of atrioventricular block in three generations of a family. *Br. Heart J.* 32 : 501-504.
259. Smith NM, Ho SY. (1994). Heart block and sudden death associated with fibrosis of the conduction system at the margin of a ventricular septal defect. *Pediatr. Cardiol.* 15 : 139-142.
260. Smith TP, Grosse WM, Freking BA, Roberts AJ, Stone RT, Casas E, Wray JE, White J, Cho J, Fahrenkrug SC, Bennett GL, Heaton MP, Laegreid WW, Rohrer GA, Chitko-McKown CG, Perteau G, Holt I, Karamycheva S, Liang F, Quackenbush J, Keele JW. (2001). Sequence evaluation of four pooled-tissue normalized bovine cDNA libraries and construction of a gene index for cattle. *Genome Res.* 11 : 626-630.
261. Soldatov NM. (1994). Genomic structure of human L-type Ca²⁺ channel. *Genomics.* 22 : 77-87.
262. Spellberg RD. (1971). Familial sinus node disease. *Chest.* 60 : 246-251.
263. Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL, Moss AJ, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM, Keating MT. (2000). Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation.* 102 : 1178-1185.
264. Splawski I, Tristani-Firouzi M, Lehmann MH, et al. (1997). Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress I_{Ks} function. *Nat Genet.* 17 : 338-340.
265. Spritz RA, Strunk K, Surowy CS, Mohrenweiser HW. (1990). Human U1-70K Ribonucleoprotein antigen gene : organization, nucleotide sequence, and mapping to locus 19q13.3. *Genomics.* 8 : 371-379.
266. Srivastava D, Olson EN. (2000). A genetic blueprint for cardiac development. *Nature.* 407 : 221-226.
267. Steenkamp WF. (1972). Familial trifascicular block. *Am. Heart J.* 84 : 758-760.
268. Stephan E, Aftimos G, Allam C. (1985). Familial fascicular block : histologic features of Lev's disease. *Am. Heart J.* 109 : 1399-1401.

269. Stephan E, Ashoush R, Megarbane A, Kassab R, Salem N, Loiselet J, Bouvagnet P. (2000). Autosomal dominant Mendelian midline complex. Secundum atrial septal defect associated with cardiac and facial-thoracic defects. A familial case. *Arch Mal Coeur Vaiss* 93 :641-647.
270. Stéphan E, Chedid R, Loiselet J, Bouvagnet P. (1998). Génétique clinique et moléculaire d'un bloc de branche familial lié au chromosome 19. *Arch. Mal. Cœur.* 91 : 1465-1474.
271. Stéphan E, de Meeus A, Bouvagnet P. (1997). Hereditary bundle branch defect : Right bundle branch blocks of different etiologies have different morphologies. *Am. Heart J.* 133 : 249-256.
272. Stephan E. (1954). Bloc auriculo-ventriculaire chez trois membres d'une même famille. *Rev. Med. Moyen-Orient.* 11 : 246.
273. Stephan E. (1961). Bloc auriculoventriculaire familial. *Arch. Mal. Cœur.* 3 : 333-341.
274. Stephan E. (1978). Hereditary bundle-branch system defect. Survey of a family with four affected generations. *Am. Heart J.* 95 : 89-95.
275. Stephan E. (1979) . Hereditary bundle branch system defect. A new genetic entity? *Am.Heart J.* 97 : 708-718.
276. Sugi Y, Hirakow R. (1986). Ultrastructural quantitative characterisation of sinus and atrioventricular nodal cells in the developing caprine heart compared with ordinary atrial and ventricular myocardial cells. *J Anat.* 148 : 13-24.
277. Takasuga A, Hirotsune S, Itoh R, Jitohzono A, Suzuki H, Aso H, Sugimoto Y. (2001). Establishment of a high throughput EST sequencing system using poly(A) tail-removed cDNA libraries and determination of 36,000 bovine ESTs. *Nucleic Acids Res.* 29 : 108.
278. Takebayashi-Suzuki K, Pauliks LB, Eltsefon Y, Mikawa T. (2001). Purkinje fibers of the avian heart express a myogenic transcription factor program distinct from cardiac and skeletal muscle. *Dev Biol.* 234 : 390-401.
279. Takebayashi-Suzuki K, Yanagisawa M, Gourdie RG, Kanzawa N, Mikawa T. (2000). In vivo induction of cardiac Purkinje fiber differentiation by coexpression of preproendothelin-1 and endothelin converting enzyme-1. *Development.* 127 : 3523-3532.

280. Tan HL, Bink-Boelkens MT, Bezzina CR, Viswanathan PC, Beaufort-Krol GC, van Tintelen PJ, van den Berg MP, Wilde AA, Balser JR. (2001). A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature*. 409 : 1043-1047.
281. Tanaka T., Ogiwara A., Uchiyama I., Takagi T., Yazaki Y., Nakamura Y. (1996). Construction of a normalized directionally cloned cDNA library from adult heart and analysis of 3040 clones by partial sequencing. *Genomics*. 35 : 231-235.
282. Thomas PS, Kasahara H, Edmonson AM, Izumo S, Yacoub MH, Barton PJ, Gourdie RG. (2001). Elevated expression of Nkx-2.5 in developing myocardial conduction cells. *Anat Rec*. 263 : 307-313.
283. Thomas SA, Schuessler RB, Saffitz JE. (1998). Connexins, conduction, and atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 9 : 608-611.
284. Thornell LE, Eriksson A. (1981). Filament systems in the Purkinje fibers of the heart. *Am J Physiol*. 241 : 291-305.
285. Ton C, Hwang DM, Dempsey AA, Tang HC, Yoon J, Lim M, Mably JD, Fishman MC, Liew CC. (2000). Identification, characterization, and mapping of expressed sequence tags from an embryonic zebrafish heart cDNA library. *Genome Res*. 10 : 1915-1927.
286. Töpert C, Döring F, Derst C, Daut J, Grzeschik KH, Karschin A. (2000). Cloning, structure and assignment to chromosome 19q13 of the human Kir 2.4 inwardly rectifying potassium channel gene (KCNJ14). *Mammalian Genome*. 11 : 247-249.
287. Toshimori H, Toshimori K, Oura C, Matsuo H, Matsukura S. (1988). Immunohistochemical identification of Purkinje fibers and transitional cells in a terminal portion of the impulse-conducting system of porcine heart. *Cell Tissue Res*. 253 : 47-53.
288. Tristani-Firouzi M, Chen J, Mitcheson JS, Sanguinetti MC. (2001). Molecular biology of K(+) channels and their role in cardiac arrhythmias. *Am J Med*. 110 : 50-59.
289. Tsagaris TJ, Bustamante RA, Friesendorff RA. (1967). Familial heart disease. *Dis. Chest*. 52 : 153-158.

290. Tucker GC, Aoyama H, Lipinski M, Tursz T, Thiery JP. (1984). Identical reactivity of monoclonal antibodies HNK-1 and NC-1: conservation in vertebrates on cells derived from the neural primordium and on some leukocytes. *Cell Differ.* 14 : 223-230.
291. Van der Velden HM, Van Kempen MJ, Wijffels MC, Van Zijverden M, Groenewegen WA, Allesie MA, Jongsma HJ. (1998). Altered pattern of connexin40 distribution in persistent atrial fibrillation in the goat. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 9 : 596-607.
292. Van Kempen MJ, Fromaget C, Gros D, Moorman AF, Lamers WH. (1991). Spatial distribution of connexin43, the major cardiac gap junction protein, in the developing and adult rat heart. *Circ Res.* 68 : 1638-1651.
293. Van Kempen MJ, Ten Velde I, Wessels A, Oosthoek PW, Gros D, Jongsma HJ, Moorman AF, Lamers WH. (1995). Differential connexin distribution accommodates cardiac function in different species. *Microsc Res Tech.* 31 : 420-436.
294. Van Kempen MJA, Vermeulen JL, Moorman AF, Gros D, Paul DL, Lamers WH. (1996). Developmental changes of connexin40 and connexin43 mRNA distribution patterns in the rat heart. *Cardiovasc Res.* 32 : 886-900.
295. Vassal-Adams PR. (1982). The development of the atrioventricular bundle and its branches in the avian heart. *J. Anat.* 134 : 169-183.
296. Veldkamp MW, Viswanathan PC, Bezzina CR, Baatscheer A, Wilde AAM, Balsler JR. (2000). Two distinct congenital arrhythmias evoked by a multidysfunctional Na⁺ channel. *Circ. Res.* 86 : 91-97.
297. Verpy I, Masmoudi S, Zwaenepoel I, Leibovici M, Hutchin TP, Castillo ID, Nouaille S, Blanchard S, Lainé S, Popot JL, Moreno F, Mueller RE, Petit C. (2001). Mutations in a new gene encoding a protein of the hair bundle cause non-syndromic deafness at the DFNB16 locus. *Nature Genetics.* 29 : 345-349.
298. Viragh S, Challice CE. (1977). The development of the conduction system in the mouse embryo heart. II : Histogenesis of the atrioventricular node and bundle. *Dev Biol.* 56 : 397-411.

299. Viragh S, Challice CE. (1980). The development of the conduction system in the mouse embryo heart. *Dev Biol.* 80 : 28-45.
300. Viragh S, Porte A. (1973). The fine structure of the conducting system of the monkey heart (*Macaca mulatta*). I : The sino-atrial node and the internodal connections. *Zellforsch Mikrosk Anat.* 145 : 191-211.
301. Virtanen I, Narvanen O, Thornell LE. (1990). Monoclonal antibody to desmin purified from cow Purkinje fibers reveals a cell-type specific determinant. *FEBS Lett.* 267 : 176-178.
302. Virtaneva KI, Angelisova P, Baumruker T, Horjesi V, Nevanlinna H, Schröder J. (1993). The genes for CD37, CD53, and R2, all members of a novel gene family, are located on different chromosomes. *Immunogenetics.* 37 : 461-465.
303. Viswanathan PC, Bezzina CR, George AL Jr, Roden DM, Wilde AA, Balser JR. (2001). Gating dependent mechanisms for flecainide action in SCN5A-linked arrhythmia syndromes. *Circulation.* 104 : 1200-1205.
304. Vitadello M, Matteoli M, Gorza L. (1990). Neurofilament proteins are co-expressed with desmin in heart conduction system myocytes. *J Cell Sci.* 97 : 11-21.
305. Vitadello M, Vettore S, Lamar E, Chien KR, Gorza L. (1996). Neurofilament M mRNA is expressed in conduction system myocytes of the developing and adult heart. *J. Mol. Cell . Cardiol.* 28 : 1833-1844.
306. Wan X, Chen S, Sadeghpour A, Wang Q, Kirsch GE, (2001). Accelerated inactivation in a mutant Na⁺ channel associated with idiopathic ventricular fibrillation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280 : 354-360.
307. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglou T, Hubbell E, Robinson E, Mittmann M, Morris MS, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson TJ, Lander ES, et al. (1998). Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science.* 280 : 1077-1082.

308. Wang DW, Viswanathan PC, Balsler JR, George AL Jr, Benson DW. (2002). Clinical, genetic, and biophysical characterization of SCN5A mutations associated with atrioventricular conduction block. *Circulation*. 105 : 341-346.
309. Wang L, Feng ZP, Kondo CS, Sheldon RS, Duff HJ. (1996). Developmental changes in the delayed rectifier K⁺ channels in mouse heart. *Circ. Res.* 79 : 79-85.
310. Wang Q, Curran ME, Splawski I, et al. (1996). Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet.* 12 : 17-23.
311. Wang Q, Shen J, Splawski I, et al. (1995). SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell.* 80 : 805-811.
312. Warren KS, Fishman MC. (1998). "Physiological genomics": mutant screens in zebrafish. *Am J Physiol.* 275 : 1-7.
313. Watanabe M, Timm M, Fallah-Najmabadi H. (1992). Cardiac expression of polysialylated NCAM in the chicken embryo: correlation with the ventricular conduction system. *Dev Dyn.* 194 : 128-141.
314. Waxman MB, Catching JD, Felderhof CH, Downar E, Silver MD, Abbott MM. (1975). Familial atrioventricular heart block; an autosomal dominant trait. *Circulation.* 51 : 226-233.
315. Waxman MB, Catching JD, Felderhof CH, Downar E, Silver MD, Abbott MM. (1975). Familial atrioventricular heart block : an autosomal dominant trait. *Circulation.* 51 : 226-233.
316. Welford SM, Gregg J, Chen E, Garrison D, Sorensen PH, Denny CT, Nelson SF. (1998). Detection of differentially expressed genes in primary tumor tissues using representational differences analysis coupled to microarray hybridization. *Nucleic Acids Res.* 26 : 3059-3065.
317. Wenink AC. (1976). Development of atrio-ventricular conduction pathways. *Bull Assoc Anat.* 60 : 623-629.
318. Wessels A, Vermeulen JL, Verbeek FJ, Viragh S, Kalman F, Lamers WH, Moorman AF. (1992). Spatial distribution of "tissue-specific" antigens in the developing human heart and skeletal muscle. III : An immunohistochemical analysis of the distribution of the neural tissue

- antigen G1N2 in the embryonic heart; implications for the development of the atrioventricular conduction system. *Anat Rec.* 232 : 97-111.
319. Wessels A, Vermeulen JL, Viragh S, Kalman F, Lamers WH, Moorman AF. (1991). Spatial distribution of "tissue-specific" antigens in the developing human heart and skeletal muscle. II : An immunohistochemical analysis of myosin heavy chain isoform expression patterns in the embryonic heart. *Anat Rec.* 229 : 355-368.
320. Wharton J, Anderson RH, Springall D, Power RF, Rose M, Smith A, Espejo R, Khaghani A, Wallwork J, Yacoub MH, et al. (1988). Localisation of atrial natriuretic peptide immunoreactivity in the ventricular myocardium and conduction system of the human fetal and adult heart. *Br Heart J.* 60 : 267-274.
321. Williams DO, Nagle RE, Smith B. (1972). Familial atrial cardiomyopathy with heart block. *Q. J. Med.* 41 : 491-508.
322. Yang T, Roden DM. (1996). Regulation of sodium current development in cultured atrial tumor myocytes (AT-1 cells). *Am. J. Physiol.* 271 : H541-H547.
323. Zahler R, Brines M, Kashgarian M, Benz EJ Jr, Gilmore-Hebert M. (1992). The cardiac conduction system in the rat expresses the alpha 2 and alpha 3 isoforms of the Na⁺,K⁺-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89 : 99-103.
324. Zareba W, Sattari MN, Rosero S, Couderc JP, Moss AJ. (2001). Altered atrial, atrioventricular, and ventricular conduction in patients with the long QT syndrome caused by the DeltaKPQ SCN5A sodium channel gene mutation. *Am J Cardiol.* 88 : 1311-1314.
325. Zha H, Aime-Sempe C, Sato T, Reed J. (1996). Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *J. Biol. Chem.* 271 : 7740-7744.
326. Zhou M, Demo SD, McClure N, Crea R, Bitler C. (1998). A novel splice variant of the cell death-promoting protein Bax. *J. Biol. Chem.* 273 : 11930-11936.
327. Zoldos V, Yakovlev SS, Papes D, Sarr A, Panaud O. (2001). Representational difference analysis reveals genomic differences between *Q. robur* and *Q. suber* : implications for the study of genome evolution in the genus *Quercus*. *Mol. Genet. Genomics.* 265 : 234-241.

Clonage positionnel d'un syndrome de Kartagener à transmission liée à l'X et exclusion de deux gènes candidats : MID2 et AKAP28

IV. Clonage positionnel d'un syndrome de Kartagener à transmission liée à l'X et exclusion de deux gènes candidats : *MID2* et *AKAP28*

I.1. Introduction

Le syndrome de Kartagener a été décrit par Siewert en 1904. Il fait partie des dyskésies ciliaires primitives (DCP) associées à un défaut de latéralisation. La DCP est caractérisée par un dysfonctionnement des cils des muqueuses respiratoires des voies aériennes supérieures et inférieures, provoquant des infections respiratoires récidivantes. Pour les défauts de latéralisation, les patients ont une inversion droite/gauche des organes du thorax (comme le cœur) et de l'abdomen (l'estomac). Cette inversion peut être complète (Situs inversus SI) ou incomplète (situs ambiguus). Dans les familles qui ont le syndrome de DCP, seulement la moitié des atteints ont un SI complet (syndrome de Kartagener).

L'axonème est la structure centrale des cils et des flagelles. Il est composé de 9 doublets de microtubules situés en périphérie du cil, sur chacun desquels se trouve deux bras de dynéine, interne et externe. Les dynéines sont composées de chaîne lourde (DHC), intermédiaire (IC) et légère (LC). Au centre de la structure se trouve une paire de microtubules nommée C1 et C2, qui est reliée aux doublets de microtubules périphériques par des fibres radiaires. Des ponts de nexines permettent de relier les doublets de microtubules périphériques entre eux (figure voir EL ZEIN L et al., 2003).

DCP et SI sont associées à des anomalies de la structure des cils qui peuvent être détectées par microscopie électronique. L'anomalie de structure correspond soit à une absence totale ou partielle de bras de dynéine, une absence de paire de microtubules centrale, et une absence des fibres radiaires qui connectent les microtubules centraux aux microtubules périphériques (Afzelius BA et al., 2001). Ces anomalies peuvent être également observées dans les flagelles de spermatozoïdes, et souvent les patients souffrent d'une stérilité ou d'une fertilité réduite.

Une algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* possède deux flagelles qui ont une structure d'axonème hautement similaire aux axonèmes de cils et de flagelles chez l'homme. L'analyse de

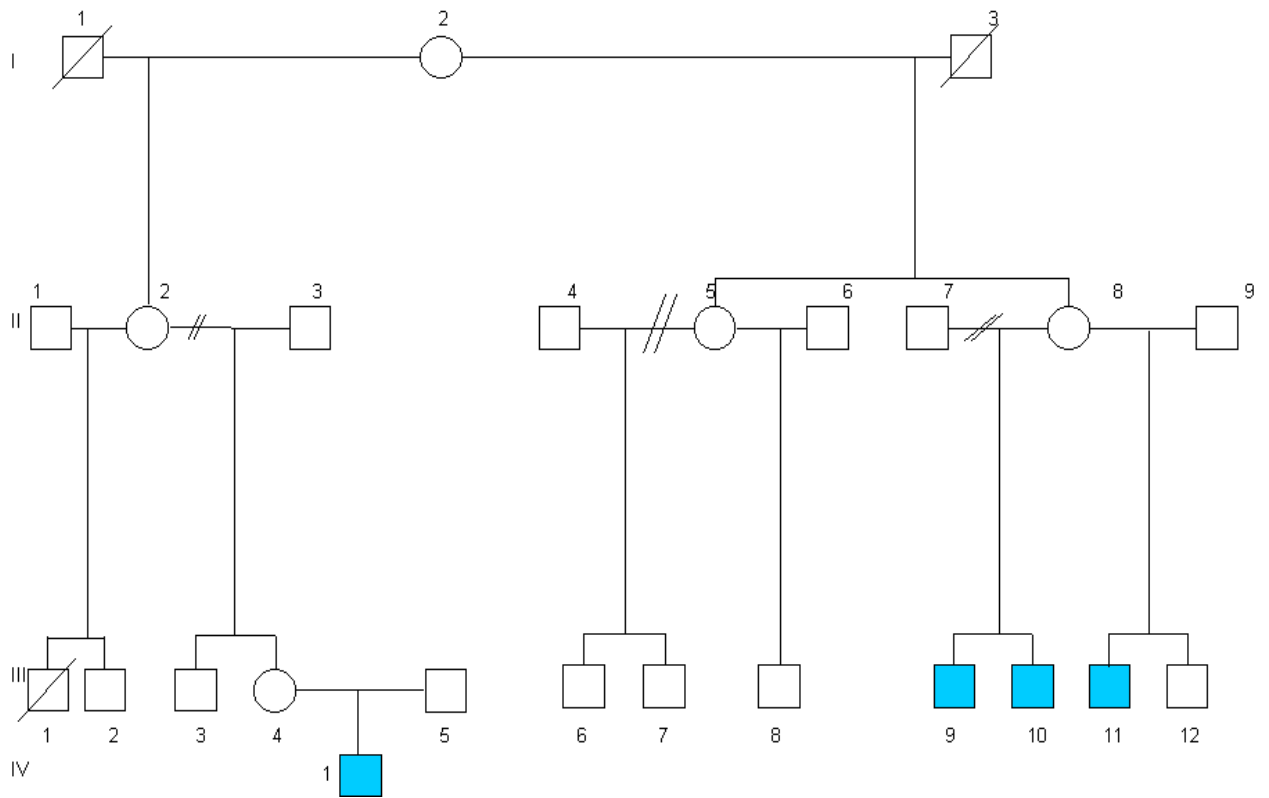


Figure 1 : Arbre généalogique de la famille française atteinte du syndrome de Kartagener. Les malades sont présentés par les carrés sombres.

souches mutantes a permis d'identifier plusieurs gènes qui codent les dynéines axonémales incluant les chaînes lourdes, intermédiaires et légères.

Le syndrome de Kartagener est autosomique récessif, exceptionnellement autosomique dominant (Narayan D et al., 1994). Jusqu'à présent, les gènes qui ont été identifiés pour la DCP à transmission autosomique récessive sont *DNAI-1* (Pennarun et al., 1999, Guichard C et al., 2001), qui code une chaîne intermédiaire de dynéine axonémale de type 1, localisé en 9p13-p21, *DNAH5* (Olbrich H et al., 2002) et *DNAH11* (Bartoloni L et al., 2002), qui code respectivement la chaîne lourde de dynéine axonémale de type 5 et 11.

Jusqu'à présent, aucun cas de syndrome de Kartagener lié à l'X n'a été décrit, et par conséquent aucun gène n'a encore été identifié. Par ailleurs, le gène *ZIC3* en Xq26 est responsable de défaut de latéralisation lié à l'X, sans DCP mais associé à une anomalie du développement de la ligne médiane (Gebbia et al., 1997).

Dans notre travail, nous décrivons pour la première fois le syndrome de Kartagener (DCP associée à SI) lié à l'X dans une famille française dont 4 hommes sont atteints. Nous étudions par clonage positionnel cette famille dans le but de localiser la mutation et nous excluons deux gènes *MID2* et *AKAP28* comme gènes candidats.

I.2. Résultats et Discussion

I.2.1. Aspect clinique de la famille

Dans cette famille (figure 1) la transmission de la maladie est liée à l'X, avec 4 hommes atteints : parmi eux, 3 présentent une DCP associée à un SI complet (III-9, III-10, IV-1), le quatrième souffre d'une DCP associée à un Situs Ambiguus avec malformations cardiaques (oreillette unique, canal auriculoventriculaire complet, ventricule droit à double issue), une polysplénie et un foie médian. A 3 ans, il a eu un BAV intermittent, après une intervention chirurgicale pour anastomose cavo-bipulmonaire. A 10 ans, il a présenté un rythme jonctionnel.

Dans cette famille, on observe que tous les atteints ont une DCP associée à un défaut de latéralisation.

I.2.2. Etude anatomopathologique

L'analyse de la fréquence de battement des cils et la mobilité de flagelles des spermatozoïdes ont été effectués à partir de biopsie prélevée du patient (III-10). Cette analyse a montré l'absence totale de battement des cils, mais une mobilité normale de flagelles de spermatozoïdes. L'analyse par microscopie électronique de cils (biopsie nasale) et de flagelles de spermatozoïde a montré l'absence totale de bras de dynéine externe et interne, qui constitue la cause majeure d'anomalie de structure des axonèmes responsable de DCP.

I.2.3. Etude de liaison

Pour l'étude de liaison, nous avons étudié une série de marqueurs microsatellites polymorphes AFM (Dib C et al., 1996) du chromosome X (ABI Prism linkage Map set, version 2,0, panel 28, PE Biosystems) à une distance moyenne de 10-20 cM. Les réactions d'amplification et de séparation sur gel d'acrylamide ont été faites selon les instructions du fabricant (PE Biosystems). L'analyse de liaison a été effectuée par l'analyse de lod Score en bipoint et multipoint en utilisant FASTLINK version 3.0P. Nous avons estimé que la maladie est à pénétrance complète et que la fréquence de la mutation est de 1/10 000.

Le génotypage du chromosome X a permis la sélection de deux régions, en Xp21 et Xq24.

I.2.3.1. Xp21-p22 :

Pour la région Xp21-p22 (figure 2) nous avons : 2 atteints (III-10) et (III-11) qui ont une recombinaison dans cet intervalle situé entre DXS1226 (du côté télomérique) et DXS993 (du côté centromérique). Au milieu de cet intervalle entre DXS1226 et DXS993, se trouve le marqueur DXS1214 (dans l'intron 62 du gène DMD, muscular dystrophy, Duchenne and Becker types) qui est

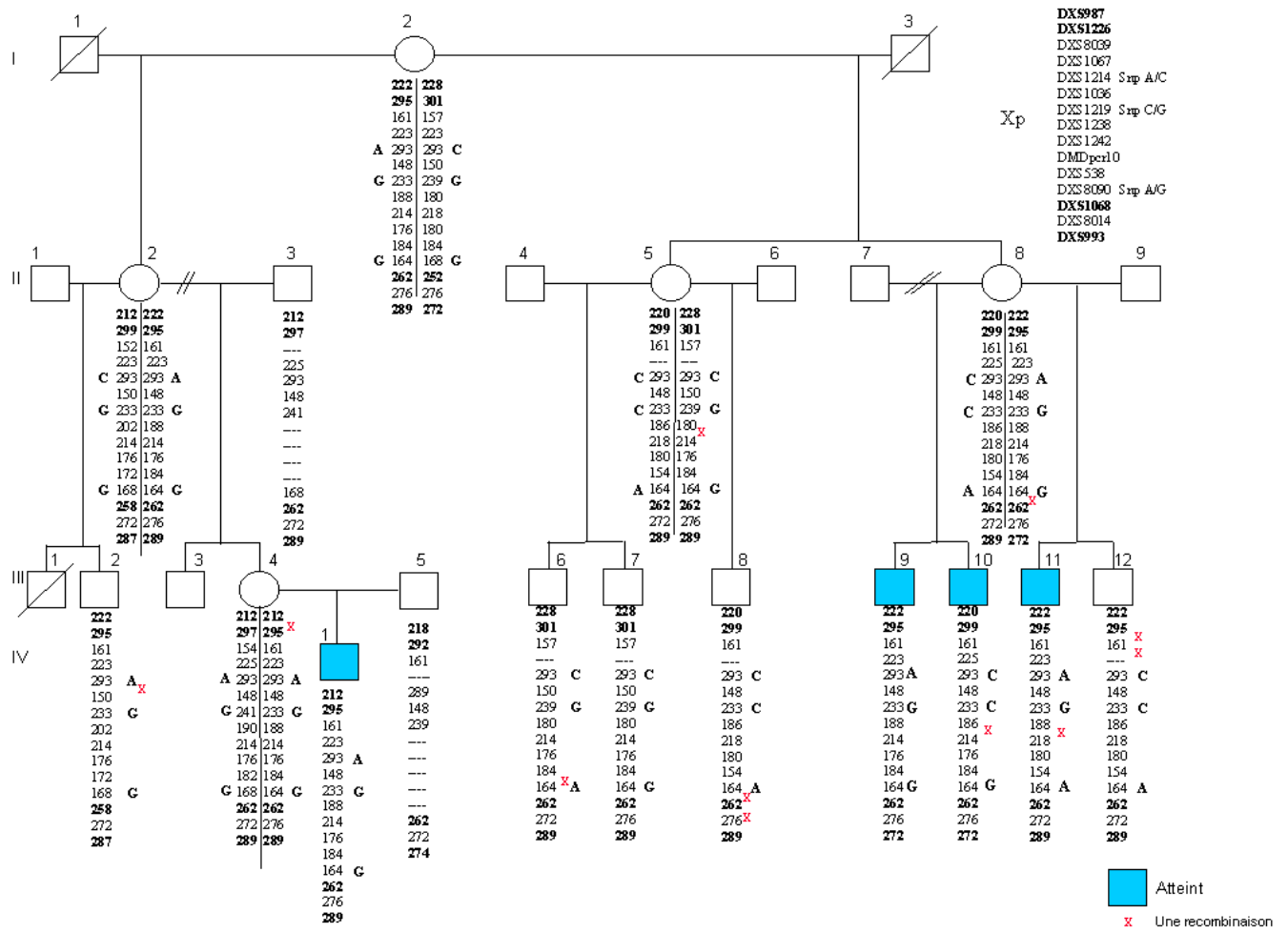


Figure 2 : Les haplotypes de la famille française atteinte du syndrome de Kartagener en Xp. Les marqueurs testés sont présentés en haut à droite, du télomère au centromère (haut vers le bas). Les marqueurs en gras sont les marqueurs polymorphes du chromosome X (ABI Prism linkage Map set, version 2,0, panel 28, PE Biosystems). Les SNP testés sont indiqués à droite à côté des marqueurs DXS1214, DXS1219 et DXS8090. Les patients III-10 et III-11 ont eu une recombinaison entre DXS1238 et DXS1242.

non informatif (homozygote chez toutes les femmes) et le marqueur DXS1068 pour lequel la mère de 3 atteints (II-8) est homozygote. Afin de déterminer où exactement a eu lieu la recombinaison chez les deux patients (III-10) et (III-11) (pour savoir si les 3 atteints (III-9, III-10 et III-11) partagent un même fragment d'ADN), nous avons testé des marqueurs supplémentaires entre DXS1226 et DXS993 soit un intervalle de 36 cM d'intervalle.

Dans l'intervalle entre DXS1226 et DXS993, tout d'abord, nous avons testé les marqueurs suivants du télomère au centromère : DXS1202, DXS1218, DXS7106, DXS8049 (résultats non indiqués sur l'arbre généalogique), DXS8039, DXS1067, DXS1036 (dans l'intron 51 du gène DMD), DXS1219 (dans l'intron 44 du gène DMD), DXS538, DXS8090 et DXS8014. Pour les marqueurs DXS1202, DXS1218, DXS8049, DXS1067, DXS538 et DXS8014, la mère de 3 atteints (II-8) est hétérozygote. Cela nous a permis de délimiter cet intervalle entre DXS1067 (télomérique, exclu) et DXS538 (centromérique, exclu). Le SNP 3002428 près de DXS8090 (à une distance de 18283 pb du côté télomérique de DXS8090) nous a permis de déterminer les recombinaisons chez les individus III-6 et III-8. Pour les deux marqueurs DXS1214 et DXS1219, à l'intérieur de cet intervalle (DXS1067 et DXS538), pour lesquels la mère (II-8) des 3 atteints est homozygote, nous avons testé des SNP (SNP 2807790 près de DXS1214 (à une distance de 8741 pb, du côté centromérique de DXS1214) et le SNP 1293891 près de DXS1219 (à une distance de 9148 pb, du côté télomérique de DXS1219). Grâce à ces deux SNP, nous avons réduit l'intervalle entre DXS1219 et DXS538. Plus tard, nous avons testé des marqueurs entre DXS1219 et DXS538, extraits des bases de données GDB, NCBI, Ensembl Human Genome et Leiden Muscular Dystrophy pages. Ces marqueurs sont : DXS1238 (DMD pcr44, situé à 13.8 kb en 3' de l'exon 44 du gène DMD), DXS1242 (DMDpcr12, situé à 1.2 kb en 5' du promoteur/exon 1 de l'isoforme Dp427c, cerveau) et DMD pcr10.1 (situé à 3.5 kb en 5' du promoteur/exon 1 de l'isoforme Dp427c) (figure 3). Ces marqueurs ont permis d'exclure une grande partie de cet intervalle grâce à une recombinaison chez les 2 patients (III-10) et (III-11) entre les deux marqueurs DXS1238 et DXS1242 (figure 2), qui sont localisés à une distance physique de 1 Mb l'un de l'autre. Cet intervalle contient seulement le gène DMD, il nous reste à tester d'autres marqueurs ou SNP entre ces deux marqueurs (DXS1238 et DXS1242) pour vérifier que les atteints ne partagent pas

dans cet intervalle un fragment d'ADN commun, et pour pouvoir éliminer la possibilité que la maladie soit liée à une des isoformes du gène DMD. Le gène DMD est un gène de 2.4 Mb, et il produit plusieurs isoformes de taille différente (voir figure 4) soit par l'utilisation de promoteurs tissu-spécifique (8 promoteurs), soit par épissage alternative.

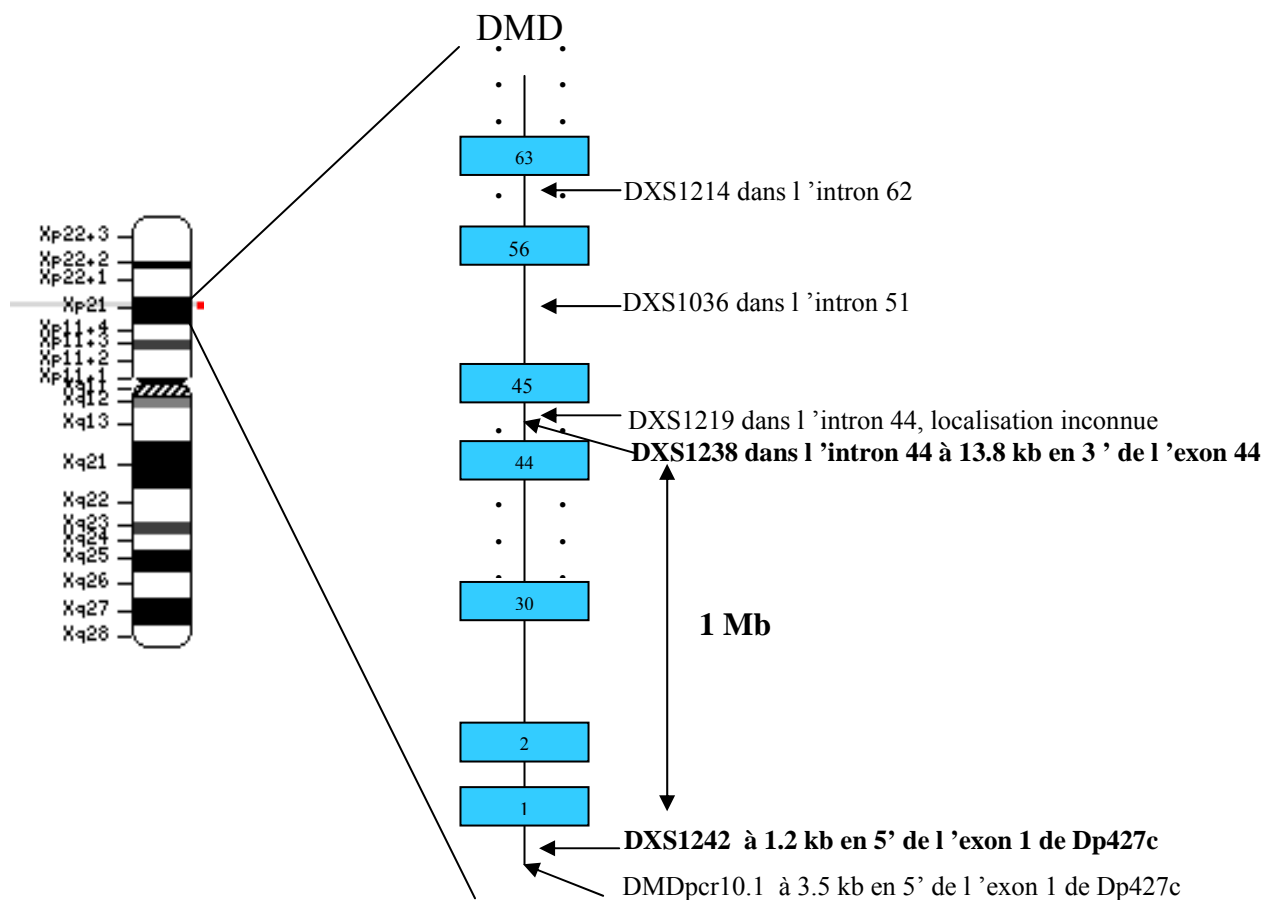


Figure 3 : Localisation des différents marqueurs polymorphes utilisés lors de notre étude dans le gène DMD en Xp21. Les rectangles représentent les exons du gène DMD, (nous ne présentons pas les 88 exons de ce gène), la ligne représente les introns. Les marqueurs qui sont en gras sont les 2 marqueurs qui flanquent les recombinaisons chez les deux patients (III-10 et III-11).

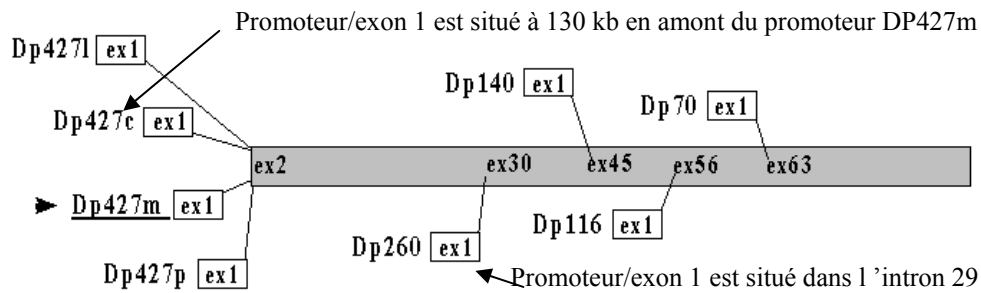


Figure 4 : Représentation des différentes isoformes du gène de la dystrophine. Dp427m (muscle) est considérée comme l'isoforme de référence; Dp427l (rétine) est une isoforme qui est épissée au niveau de l'exon 3 du Dp427m; Dp427c (cerveau) son promoteur/exon1 est situé à 130 kb en 5' du promoteur Dp427m; Dp427p (cellules de Purkinje) son promoteur/exon1 est situé dans l'intron 1 de Dp427m; Dp260 (est exprimée dans le cerveau et le cœur) son promoteur/exon1 est situé dans l'intron 29 du Dp427m; Dp140 son promoteur/exon1 est situé dans l'intron 44 du Dp427m, sa transcription commence dans l'exon 51; Dp116 son promoteur/exon1 est situé dans l'intron 55 du Dp427m; Dp70 son promoteur/exon 1 est situé à 8 kb en amont de l'exon 63 du Dp427m. Dans la famille étudiée, les deux recombinaisons observées chez le patient (III-10) et le patient (III-11) sont localisées en amont du promoteur Dp427c et en aval de l'exon 44. Les différentes isoformes Dp427m, Dp427l, Dp427p et Dp260 ne sont pas exclus. Nous devons tester d'autres marqueurs afin de pouvoir exclure ces différentes isoformes.

I.2.3.2. Xq21-q24 :

Le calcul de lod score a donné une valeur maximale pour le marqueur DXS1001 (AFM248we5) de 2.61 pour $\theta = 0.00$ en bipoint, et de 2.10 pour $\theta = 0.00$ en multipoint. Avec une analyse de simulation en utilisant un marqueur polymorphe idéal, nous obtenons une valeur de lod score en bipoint de 2.70, ceci est dû à la taille réduite de la famille et au faible nombre de patients. L'analyse des marqueurs supplémentaires en Xq21-q24, nous a permis de délimiter un intervalle de 34 cM entre DXS8020 (AFMa162tct, exclus) et DSX8057 (AFM211za7, exclus) (figure 5).

Nous avons testé deux gènes candidats dans cet intervalle, *MID2* et *AKAP28* par séquençage de leur parties codantes (les conditions d'amplification sont présentées dans le tableau 1 et 2).

MID2 pour *midline 2* (Buchner G et al., 1999) ou *FXY2* (Perry J et al., 1999) en Xq22. C'est un gène composé de 9 exons, avec un cadre de lecture ouvert de 2064 pb, codant une protéine de 688 a.a. La protéine est un membre de la famille « *RING finger* », qui possède au niveau de la terminaison N-terminale les domaines RBCC (*RING finger, 2 B-box, coiled coil*), un domaine B30.2 au niveau de la terminaison C-terminale, et un domaine de fibronectine de type III localisé entre le domaine RBCC et B30.2 domaines. Elle interagit avec les microtubules. Elle présente 83% et 70% d'homologie avec *MID1* au niveau de la séquence protéique et la séquence nucléotidique respectivement. *MID1* est localisé en Xp22.3 et il est responsable du syndrome d'Opitz GG/BBB (OS) lié à l'X. Cette maladie se caractérise par une malformation de la septation cardiaque, de la ligne médiane et hypertélorisme (Quaderi NA et al., 1997).

AKAP28 pour *A-Kinase Anchoring Protein* : Ce gène est localisé en Xq24. Il est formé de 5 exons et code une protéine de 197 a.a. de 28 kDa (Kultgen PL et al., 2002). Ce gène est fortement exprimé dans les cils des muqueuses respiratoires et 3 isoformes sont présentes dans la trachée et les testicules. Elle interagit avec la *PKA* (Protein Kinase A). La *PKA* est associée aux axonèmes des cils, et son activation augmente la fréquence des battements ciliaires.

Tableau : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage des 9 exons du gène MID2.

Fragment	Taille de l'exon en pb	Séquence des amorces	Taille de produit de PCR en pb	Température d'hybridation en °C
Exon 1	660	1a F : 5'-AGC CTC CGT GGT TCT TAA TG-3'	397	60°
		1a R : 5'-AAT TCG CTC GCT AGA CAT GG -3'	462	60
Exon 2	100	1b F : 5'- AGA AGG CTT CAG TCA GTG GG-3'		
		1b R : 5'-GAA CTT GCT AAC TGC ATT TAT GCG -3'		
Exon 3	108	2F : 5'-CTA CTG ACT AAC CGA TTT TCA C-3'	286	54
		2 R : 5'-AGG CTA CAC TCT GAC AAA AC-3'		
Exon 4	159	3 F : 5'-AGT CCG AAC CTT TTA GAG CC-3'	296	56
		3 R : 5'-CCC CCT ATA ATC TCA TTT CTT C-3'		
Exon 5	128	4 F : 5'-GCC TCC TTC ATG TTG TTT TTT ATT G -3'	340	56
		4 R : 5'-GTA AAA TCT TCA GGT GGC AG-3'		
Exon 6	238	5 F : 5'-GAA ATC AAA CAC TGG GTG AAA G-3'	337	56
		5R : 5'-CTG TCT GAA AAG ACA CAT GC -3'		
Exon 7	162	6 F : 5'-GAA GAG AAA GTA TGC TTT CC-3'	341	54
		6 R : 5'-GCT TAC ACT GTC TAT GAA AC-3'		
Exon 8	200	7 F : 5'-TTC ATT CTG TCT CTC TTA CC-3'	268	56
		7 R : 5'-TGG CAT GGA GAA GAA AAT TG-3'		
Exon 9	403	8 F : 5'-GTG ATG ATG CTG GTG GAA AAG-3'	340	60
		8 R : 5'-GGA ACC TAA TGA CAG AGG AC-3'		
Exon 9	403	9 F : 5'-ATG GTG TCT TAC ACA ACT CAG-3'	538	62
		9R : 5'-TAA CTT AGG TGT AGG AGG GG -3'		

Tableau : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage des 5 exons du gène AKAP28.

Exon	Taille de l'exon en pb	Séquence des amorces	Taille de produit de PCR en pb	Température d'hybridation en °C
1	169	1_2 D 5'CCTGTCTCTTGTGATTCTTC 3'	530	54
	92	1_2 R 5'CTCTTTATTGTTCTTCACACCG 3'		
3	182	3 D 5'TGCTGCATTTATCTACAGGAC 3'	261	52
		3R 5'CATTCTCACTGAAGCCTCAC 3'		
4	53	4 D 5 'AGAGTTGGTATGACTGGTCTG 3'	160	60
		4 R 5' TGCTGGATTCTGGAGTGTG 3'		
5	100	5 D 5' TAGGGAATCCCCTTTGTTTG 3'	265	53
		5 R 5'TGGTTTGACGTGCTGTATTG 3'		

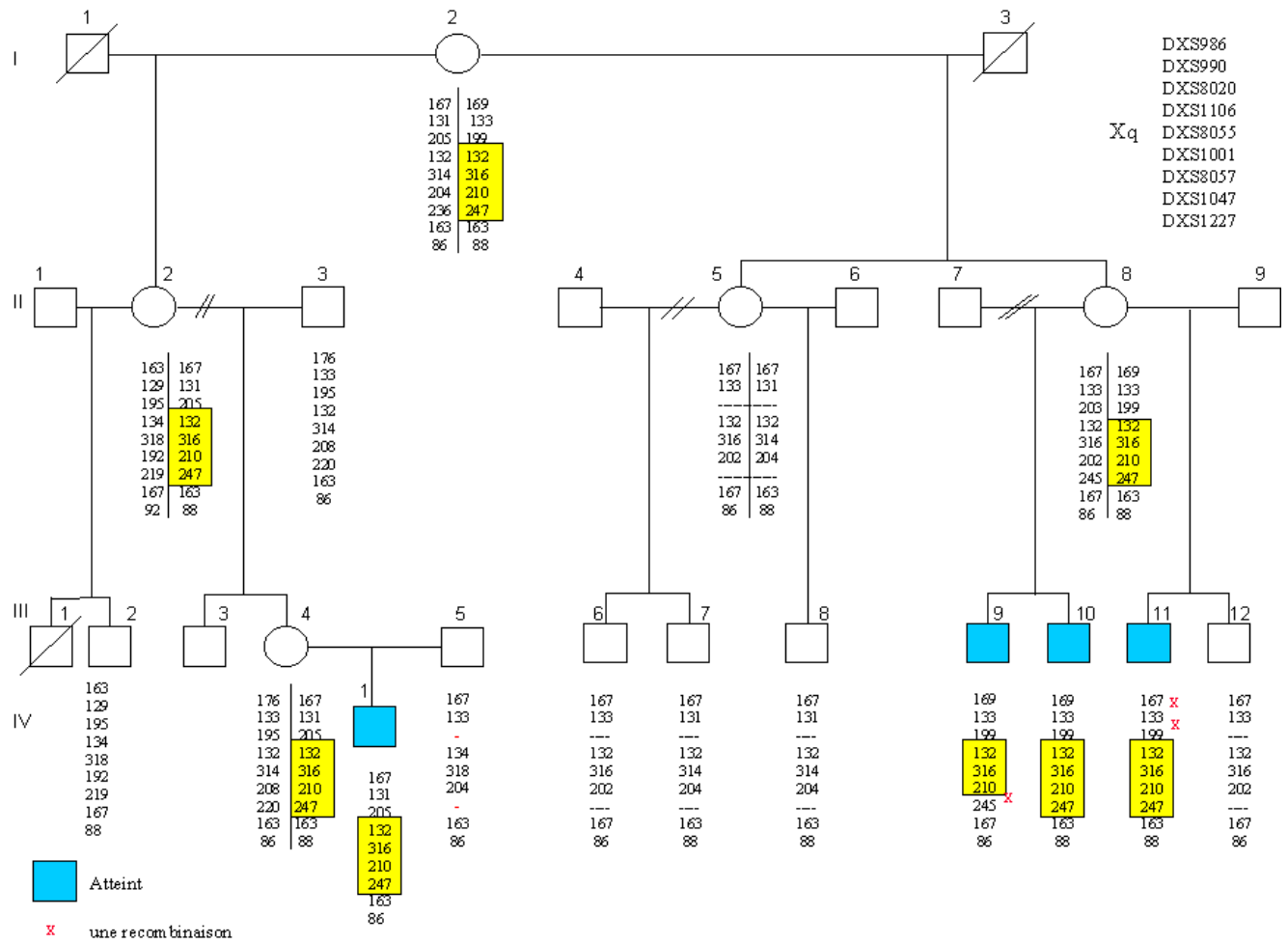


Figure 5 : Les haplotypes de la famille française atteinte du syndrome de Kartagener en Xq. Les marqueurs testés sont présentés en haut à droite, du centromère au télomère (haut vers le bas). Les haplotypes encadrés représentent la partie d'haplotype commune aux malades.

Le séquençage des parties codantes de *MID2* et *AKAP28* n'a révélé aucun changement de séquence. Par conséquent, ces deux gènes sont exclus comme étant responsables du syndrome de Kartagener lié à l'X.

I.3. Conclusions et perspectives

L'analyse de liaison du syndrome de Kartagener lié à l'X chez une famille française a donné une valeur maximale de lod score de 2.61 pour $\theta = 0.00$ en bipoint pour le marqueur DXS1001 (AFM248we5). L'analyse de deux gènes candidats *MID2* et *AKAP28* nous a permis d'exclure leurs parties codantes.

Pour le deuxième intervalle, nous envisageons de tester d'autres marqueurs entre DXS1238 et DMDpcr12.

L'analyse de cas sporadiques atteints du syndrome de Kartagener permettra de réduire l'intervalle de la mutation (par recherche de microdélétions). En parallèle, dans notre laboratoire, une étude pour identifier les gènes exprimés dans les cils respiratoires est en cours de réalisation.

I.4. Références

1. Afzelius BA. (2000). Ciliary structure in health and disease. *Acta Otorhinolaryngol Belg.* 54 : 287-291.
2. Bartoloni L, Blouin JL, Pan Y, Gehrig C, Maiti AK, Scamuffa N, Rossier C, Jorissen M, Armengot M, Meeks M, Mitchison HM, Chung EM, Delozier-Blanchet CD, Craigen WJ, Antonarakis SE. (2002). Mutations in the DNAH11 (axonemal heavy chain dynein type 11) gene cause one form of situs inversus totalis and most likely primary ciliary dyskinesia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99 : 10282-10286.
3. Buchner G, Montini E, Andolfi G, Quaderi N, Cainarca S, Messali S, Bassi MT, Ballabio A, Meroni G, Franco B. (1999). MID2, a homologue of the Opitz syndrome gene MID1: similarities in subcellular localization and differences in expression during development. *Hum Mol Genet.* 8: 1397-1407.
4. Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J. (1996). A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature.* 380 : 152-154.
5. Gebbia M, Ferrero GB, Pilia G, Bassi MT, Aylsworth A, Penman-Splitt M, Bird LM, Bamforth JS, Burn J, Schlessinger D, Nelson DL, Casey B. (1997). X-linked situs abnormalities result from mutations in ZIC3. *Nat Genet.* 17 : 305-308.
6. Guichard C, Harricane MC, Lafitte JJ, Godard P, Zaegel M, Tack V, Lalau G, Bouvagnet P. (2001). Axonemal dynein intermediate-chain gene (DNAI1) mutations result in situs inversus and primary ciliary dyskinesia (Kartagener syndrome). *Am J Hum Genet.* 68 : 1030-1035.
7. Kultgen PL, Byrd SK, Ostrowski LE, Milgram SL. (2002). Characterization of an a-kinase anchoring protein in human ciliary axonemes. *Mol Biol Cell.* 13 : 4156-4166.
8. Olbrich H, Haffner K, Kispert A, Volkel A, Volz A, Sasmaz G, Reinhardt R, Hennig S, Lehrach H, Konietzko N, Zariwala M, Noone PG, Knowles M, Mitchison HM, Meeks M, Chung EM, Hildebrandt F, Sudbrak R, Omran H. (2002). Mutations in DNAH5 cause primary ciliary dyskinesia and randomization of left-right asymmetry. *Nat Genet.* 30 : 143-144.

9. Pennarun G, Escudier E, Chapelin C, Bridoux AM, Cacheux V, Roger G, Clement A, Goossens M, Amselem S, Duriez B. (1999). Loss-of-function mutations in a human gene related to *Chlamydomonas reinhardtii* dynein IC78 result in primary ciliary dyskinesia. *Am J Hum Genet.* 65 : 1508-1519.
10. Perry J, Short KM, Romer JT, Swift S, Cox TC, Ashworth A. (1999). FXY2/MID2, a gene related to the X-linked Opitz syndrome gene FXY/MID1, maps to Xq22 and encodes a FNIII domain-containing protein that associates with microtubules. *Genomics.* 62 : 385-394.
11. Quaderi NA, Scheweiger S, Gaudenz K, Franco B, Rugarli EI, Berger W, Feldman GJ, Volta M, Andolfi G et al. (1997). Opitz G/BBB syndrome, a defect of midline development is due to mutations in a new RING finger gene on Xp22. *Nature Genet.* 17 : 285-291.
12. Loubna El ZEIN, Heymut Omran, Patrice Bouvagnet. (2003). Lateralization defects and ciliary dyskinesia : lessons from algae. *Trends in genetics.* 19 : 162-167.

Publications

Lateralization defects and ciliary dyskinesia : lessons from algae

Trends in genetics. 19 (3) : 162-167.



Lateralization defects and ciliary dyskinesia: lessons from algae

Loubna El Zein¹, Heymut Omran³ and Patrice Bouvagnet^{1,2}

¹Laboratoire de Génétique Moléculaire Humaine, Faculté de Médecine Pharmacie, 8, avenue Rockefeller 69373 Lyon Cedex 8, France

²Service de Cardiologie Pédiatrique Hôpital Louis Pradel 69500 Bron, France

³University Children's Hospital Mathildenstrasse 1, 79106 Freiburg, Germany

Flagella and cilia are two very similar organelles that 'beat' to move cells and to propel fluid over tissues. They are highly conserved, being found in organisms ranging from prokaryotes to plant and animal eukaryotes. In humans, cilia are present in almost every organ, and several human conditions involve dysfunctional cilia; for example, lateralization defects, where the positions of organs are reversed, and primary ciliary dyskinesia, a rare condition where patients suffer from recurrent respiratory infections. In this article, we will discuss how information gained from studies on algae has aided research into these human diseases. These studies found a variety of functions that was previously unsuspected, renewing interest in cilia.

Flagella are found throughout the plant and animal kingdom providing motility for cells living in a liquid environment. Cilia have a similar structure to flagella, and they are found in animals beating coordinately to propel fluid over tissues. Although plants and animals are separated by more than 1 billion years of evolution, plant flagella are amazingly similar in structure and function to animal flagella and cilia. As a consequence, these organelles are a rare, if not unique, example of the relevance of a vegetal model to human genetic defects. Mutagenesis of *Chlamydomonas reinhardtii*, a model alga that has two flagella, has provided a number of mutants with anomalies in flagellar ultrastructure and beating. Once cloned, the genes disrupted in these mutants turned out to be relevant to the study of two human conditions: primary ciliary dyskinesia (PCD, [Box 1](#)) and lateralization defects (LD). In PCD, the cilia of the respiratory epithelial cells that border the upper and lower respiratory tracts do not beat normally, so the normal drainage of inhaled microbes and particles is altered, resulting in recurrent respiratory infections. About half of PCD patients have a *situs inversus*; that is, a complete left–right reversal of internal organs. PCD with *situs inversus* is referred to as Kartagener syndrome ([Fig. 1](#)). In LD, patients have various mispositions of lateral organs of the thorax (e.g. the heart) and/or abdomen (e.g. the stomach). LD might be complete (*situs inversus*) or incomplete (*situs ambiguus*). This article will focus on cilia and flagella, and the way mutations in these structures discovered in

Chlamydomonas have helped to illuminate LD and PCD in humans.

Structure of flagella and cilia

The structure of cilia and flagella is similar in *Chlamydomonas* and humans [[1,10](#)] ([Fig. 2](#)). Both organelles protrude from the cells and contain a highly organized scaffold of molecules called the axoneme. Usually, the axoneme is formed from ten pairs of microtubules, with nine peripheral pairs arranged around a central pair (i.e. a 9 + 2 formation; [Fig. 2a](#)). The peripheral pairs are each composed of a complete tubule (A) fused to a partial tubule (B). The central pair of microtubules are termed C1 and C2. Dynein arms are attached to the peripheral A microtubules, and it is these that generate motion by ATP-driven reactions [[1,10](#)]. In *Chlamydomonas*, the outer dynein arms (ODAs) are spaced along the longitudinal axis of the axoneme, with a 24-nm period. The inner dynein arm (IDA) components are arranged along the A tubule with a 96-nm longitudinal repeat pattern ([Fig. 2b](#)). The inner and outer dynein arms are composed of several dynein peptides classified depending on their molecular weight into heavy (500–400 kD), intermediate (110–55 kD) and light (45–8 kD) chains (abbreviated as HCs, ICs and LCs, respectively) [[1](#)]. In humans, the ODAs contain two HCs, whereas *Chlamydomonas* ODAs contain three HCs (alpha, beta and gamma). IDAs probably contain two HCs in both humans and *Chlamydomonas*. These dimers or trimers of HCs are associated with various ICs and LCs. Four different genes encode ODA HCs in humans, and IDA HCs are probably encoded by seven

Box 1. Primary ciliary dyskinesia

In primary ciliary dyskinesia (PCD), also known as 'immotile cilia syndrome', recurrent infections of the respiratory tract, sinus and middle ear are caused by a reduced mucociliary clearance of the airway. Chronic pulmonary damage often leads to bronchiectasis, which is characterized by an irreversible destructive dilatation of the bronchial airway. The disease can progress to end-stage respiratory failure warranting lung transplantation. Often male patients are sterile because of dysmotile or immotile spermatozoa. Female patients are not sterile, but might be 'hypofertile'. In families with PCD, all affected patients have respiratory symptoms, but only half of the affected siblings have a *situs inversus* ([Fig. 1](#)). This is due to randomization of the left–right body asymmetry. In some animal models and population isolates, PCD is not associated with *situs inversus*.

Corresponding author: Patrice Bouvagnet (pbouv@rockefeller.univ-lyon1.fr).

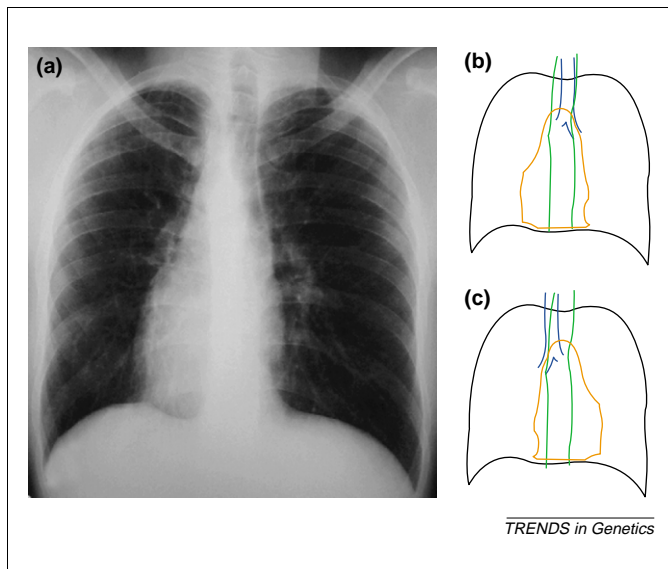


Fig. 1. Lateralization defects and primary ciliary dyskinesia (PCD). (a) Chest radiograph of a PCD patient with complete *situs inversus* (Kartagener syndrome). (b) Diagram taken from the radiograph outlining the cardio-aortic (red), tracheo-bronchial tree (blue), vertebral column (green) and thorax (black). Note the complete *situs inversus* with dextro-position of the heart. (c) Normal position of the cardio-aortic and tracheo-bronchial organs with respect to the vertebral column and thorax limits. Note that the cardio-aortic and tracheo-bronchial tree are left-right reversed.

(human [2]) to 11 (*Chlamydomonas* [1]) genes. In addition, there is evidence for different isoforms being generated through alternative splicing. The number of genes encoding dynein ICs and LCs are not precisely known in mammals.

Among different dynein HCs, the C-terminal motor domain is the most conserved region. This large domain extends over more than two-thirds of the entire protein (>3000 amino acids). This C-terminal domain forms the

globular motor domain, which is organized into six ATPase-associated protein (AAA) modules and a microtubule-binding domain [3] (Fig. 2c). The microtubule-binding domain, which is predicted to form an extended hairpin-like stalk of anti-parallel coiled-coils [4], is located between modules 4 and 5 (Fig. 2c). Among the six AAA modules, module 1 has the strongest homology to the ATPase consensus sequence and is the only one that has a demonstrated ATPase activity. The other modules have decreasing homology with the ATPase sequence from 2 to 6, and some of them (2 and 3) might facilitate module 1 ATPase activity.

The N-terminal domain of dynein HCs is responsible for binding to different ICs and LCs, which are presumed to mediate dynein arm assembly, attach to microtubules and regulate motor function. The only known exception is *Chlamydomonas* dynein gamma-HC, which binds LC1 near the AAA module 1 within the motor domain [5].

In *Chlamydomonas*, 170–250 polypeptides compose the flagella, so genetic deficiencies of the flagella (and by extension also of cilia) could be one of the most genetically heterogeneous conditions [6] because a mutation in any of the genes encoding these proteins might underlie such a deficiency. This hypothesis is consistent with electron microscopic studies in humans, where up to 18 categories of ultrastructural anomalies have been described in respiratory cilia and/or sperm flagella [7], dynein arm defects being the largest group. However, by comparing ultrastructural anomalies before and after culture of human respiratory epithelial cells (Fig. 3), Jorissen *et al.* [8] observed that only a subset of anomalies persist in culture, thus differentiating secondary from primary cilia defects (Fig. 4). Secondary cilia defects presumably result from local infection and inflammation, whereas primary cilia defects are genetic. The sample group in Jorissen's

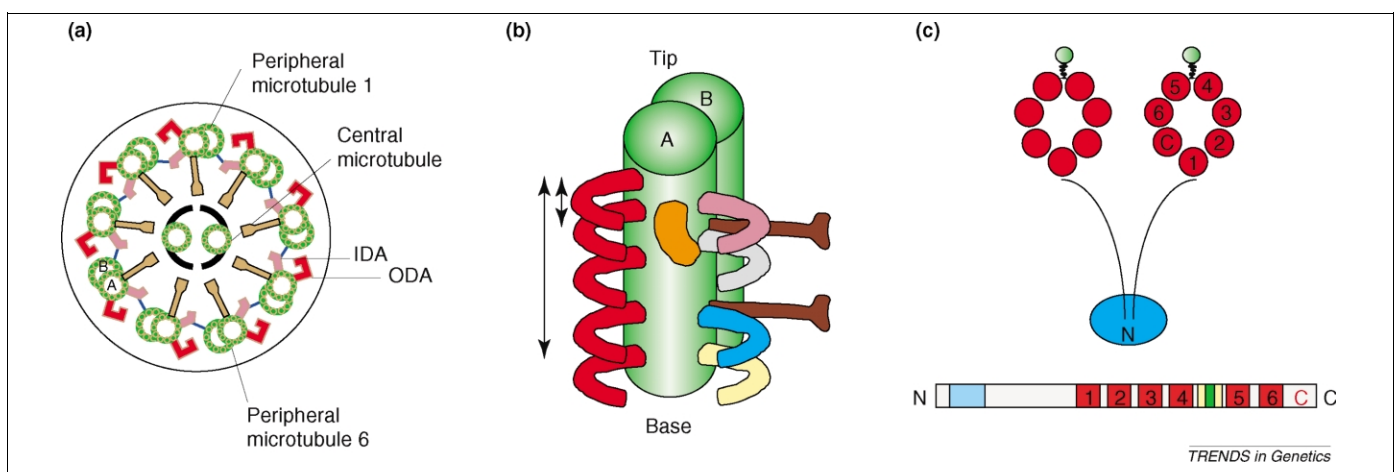


Fig. 2. Cilia and dynein arm structure. (a) Transverse section of a cilia or flagella. The section is seen looking from the tip of the cilia toward the base (cell body). Nine microtubule pairs (green) formed of an A microtubule and a B microtubule are arranged peripherally, with the pair on the median of the microtubule central pair numbered 1. The outer (ODA, red) and inner (IDA, pink) dynein arms of microtubule pair 1 are directed toward microtubule pair 2. The central microtubule on the left is called C2, the one on the right C1. Brown, radial spokes, blue, nexin links. (b) Longitudinal view of a peripheral pair of microtubule as view from the B-tubule of the adjacent doublet. The proximal end of the cilia (adjacent to the cell body) is to the bottom. ODAs (red) are spaced every 24 nm (short arrow). IDA arrangement is more complicated, with inner arms forming different types of complex (pink, grey, blue and yellow) with a 96 nm repeat (long arrow). The dynein regulatory complex (DRC, orange) is composed of seven polypeptides. It might function as a scaffold for attachment of regulatory enzymes that regulate dynein activity, or as a system that senses tension within the axoneme and provides a mechanical feedback to the dynein arm. The radial spoke (brown) closest to DRC is termed S2, the other one is termed S1. (c) A model of dynein which is composed of a globular head (~350 kD) and a stem part (~160 kD). The globular part has a ring shape formed by seven lobes surrounding a central cavity. Each lobe contains an AAA motif (red) with the C-terminal region forming the seventh globular domain. Between lobes 4 and 5 lies a pair of coiled-coil segments that are separated by a domain of interaction with the microtubule (green). They form a stalk-like structure terminating in a small globular formation, emanating from the head of dynein. The N-terminal part of dynein heavy chain (HC, light blue) is necessary for HC dimerization and interaction with the intermediate chain-light chain complex.

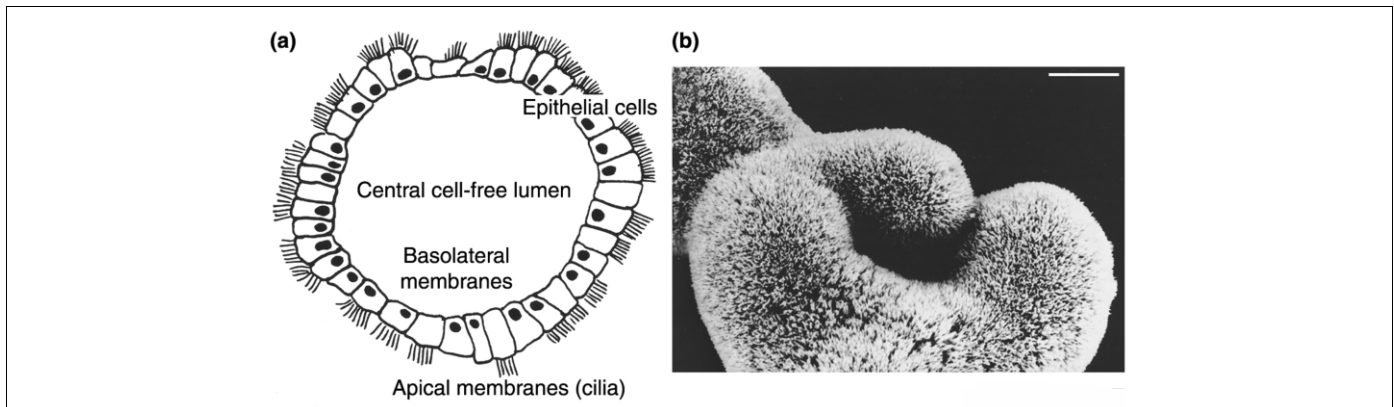


Fig. 3. Human respiratory epithelial cell in culture after ciliogenesis. Nasal or bronchial biopsies are cultured on collagen. After dedifferentiation and loss of cilia, cells proliferate. Then, collagen is lysed and cells are cultured in suspension. They form empty vesicles and cells re-differentiate with ciliogenesis. With normal cilia beating, vesicles float and rotate constantly in the culture medium. Scale in (b): 20 μ m. Figure courtesy of T. Willems and M. Jorissen.

study was diagnosed on the basis of clinical symptoms and absence of coordinated ciliary activity after ciliogenesis in culture.

Sperm flagella and respiratory epithelial cell cilia all have a 9 + 2 axoneme structure. However, cells with a single cilium are extremely widespread in mammals [9], and these cilia have no central pair of microtubules (i.e. 9 + 0). Such 9 + 0 cilia might act as sensory organelles, displaying receptors (e.g. the kidney principal cells of duct and collector tubules) or/and initiating a fluid flow (e.g. the mouse embryonic ventral node).

***Chlamydomonas* mutants and their mammal counterparts**

Dynein arms

At least 28 *Chlamydomonas* mutants with different dynein arm anomalies have been characterized [10]. Mutations in the dynein IC78 of *Chlamydomonas* cause slow-swimming mutants with ultrastructural defects of the ODA [11]. Cloning of the orthologous human gene, *DNAI1* (DN for dynein, A for axonemal and I for intermediate chain), showed that it is mutated in several, but not all, patients with PCD [12,13]. ODAs were absent from the five

reported PCD patients carrying *DNAI1* mutations, indicating that the function of *DNAI1* has been evolutionarily conserved [12,13]. All patients shared one *DNAI1* mutant allele that hindered splicing and peptide truncation, but it is not clear yet whether this allele is a hot spot for mutation or a founder effect. The *DNAI1* study also demonstrated a link between ciliary function and *situs* determination, because in several sibships, the same mutations in *DNAI1* resulted in PCD with either *situs solitus* (normal organ positioning) or *situs inversus* (Kartagener syndrome). In addition, PCD is the only condition in which *situs inversus* has a demonstrable autosomal recessive inheritance in humans.

Homozygosity mapping of a large consanguineous PCD family exhibiting an absence of ODA (Fig. 5) identified a novel gene locus [14]. The critical disease interval on chromosome 5p15–p14 contained *DNAH5*, a gene encoding a human dynein HC related to *Chlamydomonas* dynein gamma-HC [14]. The *DNAH5* gene has 79 exons and spans 250 kb, and it was considered an excellent candidate, because gamma-HC-mutant algae are slow-swimming and show the same axonemal ODA defect as observed in this PCD family [14–16]. Sequence analysis in 25 PCD families that showed allele segregation compatible with linkage to the 5p-locus, identified different mutations in eight PCD families, all resulting in nonfunctional *DNAH5* [17]. No mutation could be found in the remaining 17 families, suggesting that either *DNAH5* mutations were undetected or that another gene was mutated. In total, Olbrich *et al.* [17] found *DNAH5* mutations in eight cases from 72 PCD families (~ 11%). Together, *DNAI1* and *DNAH5* account for about 24% of PCD patients [12,13]. Moreover, patients with a mutation in either *DNAI1* or *DNAH5* mutations and have had an electron microscopy study of their cilia all had ODA deficiencies, so it can be assumed that the two genes account for even a larger percentage of cases in the PCD subgroup with ODA deficiencies.

More recently, a homozygous nonsense mutation in the dynein *DNAH11* gene was seen in a child with *situs inversus* and severe respiratory disease. He was diagnosed as having cystic fibrosis secondary to homozygosity for the F508del mutation. Both *DNAH11* and *CFTR* genes are carried by human chromosome 7, and the patient had a

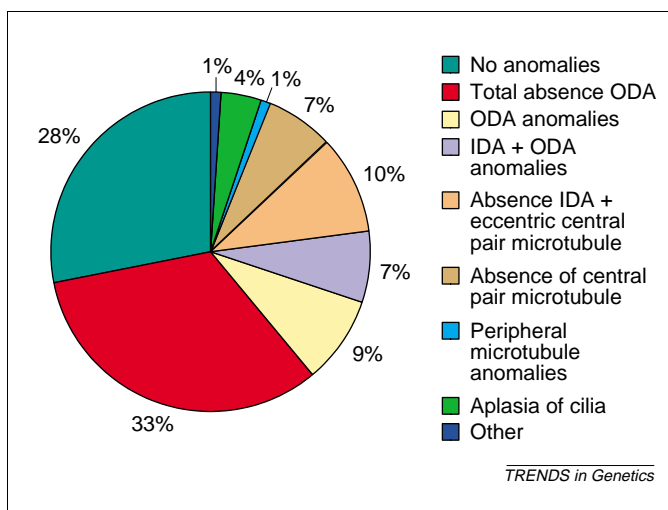


Fig. 4. Ciliary anomalies in primary ciliary dyskinesia (PCD) patients. Pattern of cilia anomalies observed after culture of respiratory epithelial cells (according to Jorissen *et al.* [8]). Note that 28% have no ultrastructure anomalies and 59% have some kind of dynein arm anomalies. IDA: inner dynein arm, ODA: outer dynein arm.

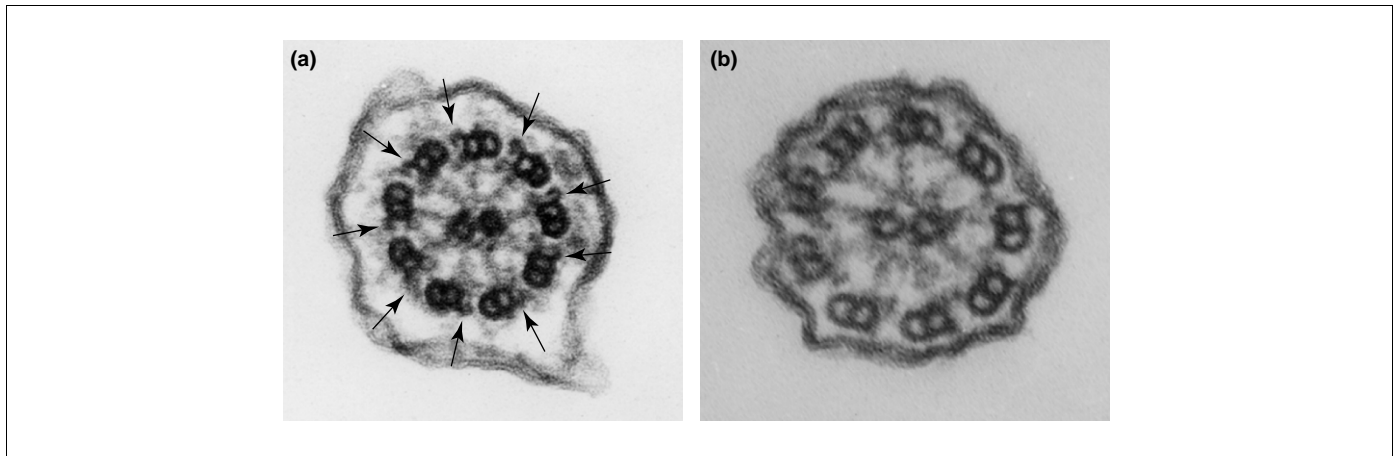


Fig. 5. Electron micrograph of a cross-section of respiratory cilia from (a) a healthy individual and (b) a primary ciliary dyskinesia (PCD) patient with absence of all outer dynein arms. Arrows point to outer dynein arms.

paternal uniparental disomy of this chromosome explaining the co-occurrence of two distinct recessive disorders [18].

In *Chlamydomonas* dysmotile mutant strains, absence of ODAs was associated with twelve independent loci [19]. Several of the other genes involved have now been identified and appear to be ideal candidates for human PCD. However, searches of the human orthologous genes of the ODA encoding light chain 2 (*TCTEX2*), intermediate chain 2 (*DNAI2*), dynein HC7 and HC9 (*DNAH7* and *DNAH9*) have been unsuccessful in identifying mutations associated with PCD [20–23]. Similar to other light chains (LC6, LC7 and LC8), *TCTEX2* has a role in cytoplasmic dynein function [24], and therefore it is possible that mutations in one of these genes result in a more severe phenotype.

The components of the ODA have been studied extensively, but much less is known about the IDA. However, several loci and genes encoding components of the IDA have also been reported [25]. Targeted disruption of murine *MDHC7*, a gene orthologous to *Chlamydomonas* IDA HC genes, resulted in male infertility because of reduced motility of spermatozoa [26]. In addition, *MDHC7*-deficient mice showed a reduction of ciliary beat frequency from 13.7 to 7.6 Hz/s but notably no *situs inversus*. Moreover, no ultrastructural cilia defect was observed, supporting the view that although the mutated dynein HC was only produced in small amounts, it was inserted normally in the inner arm. More generally, there is, so far, no clear phenotype–genotype relationship relating beat frequency or waveform pattern to a particular arm or gene defect.

Finally, several polypeptides seem to control dynein arm activity; for example, protein phosphatase (PP1 and PP2A) [27], casein kinase I (CK1) [28] and the intermediate chain 138 (IC138). Mutations in the genes encoding these polypeptides might also result in flagella beat anomalies, but have yet to be studied.

Radial spokes

Radial spokes are T-shaped structures anchored on the A microtubule of each outer doublet adjacent to the inner dynein arms (Fig. 2a,b). The spokes project toward the central microtubule pair apparatus, where the spoke

heads interact with the central pair projections. In the long axis, radial spokes repeat in either pairs or triplet groups every 96 nm along each doublet microtubule, in exact register with the inner dynein arms. Radial spokes are composed of 22 proteins, including calmodulin, an A-kinase anchor protein predicted to anchor protein kinase A (PKA) in position near the inner dynein arms, and a particular dynein light chain (LC8). LC8 is an extraordinarily ubiquitous protein associated in multiple copies with many diverse structures and enzymes: outer and inner dynein arms, cytoplasmic dynein, myosin V and nitric oxide synthetase.

There are at least seven *Chlamydomonas* genes specifically affecting the assembly and function of the flagellar radial spokes [29], one of them being required for the specific *in vivo* phosphorylation of spoke polypeptides. There is a similar radial spokes defect observed in humans, which accounts for 10% of PCD cases, and is always associated with IDA anomalies [8]. So far, however, no causal human gene has been identified, although the *Chlamydomonas* genes are obvious candidates.

Central pair microtubule

The central microtubular pair complex is affected in seven of *Chlamydomonas* mutant strains, being either totally absent (pf15, pf16, pf19 and pf20) or partially absent (pf6-2, pf15 and CPC1) [30]. Interestingly, none of these mutants has a defect in tubulins. Furthermore, these proteins bind to either C1 (PF6-2, PF16) or C2 (PF20), demonstrating that each central microtubule has a different role. The human gene orthologous to PF20 (hPF20) was screened for mutation in five patients with abnormal central complexes, but no mutations were found [31].

Length of cilia or flagella

Rare *Chlamydomonas* mutants show variation in flagellar length, including mutants with long flagella (lf) and short flagella (shf), and mutants with flagellum assembly defects (fla). The axoneme is actually a dynamic structure that is subject to permanent turnover at the flagellar tip. A balance of assembly and disassembly of the components regulate flagellar length. Axoneme components are transported by intraflagellar transport (IFT) with anterograde

movement of particles to the plus end of the flagellum and retrograde movement to the base of the organelle. Anterograde transport is driven by a heterotrimeric kinesin-II and retrograde transport by cytoplasmic dynein 1B. IFT particles occur in chains called 'rafts' (not to be confused with lipid rafts) with a higher anterograde speed than retrograde. IFT particles are composed of at least 17 polypeptides (including LC8). Mutations in the *kinesin-II* gene and *bld1* lead to a flagella-less phenotype by alteration of anterograde transport. Other *Chlamydomonas* mutants (fl15, fl16 and fl17-1) have defective retrograde transport particles resulting also in absence of cilia. IFT is not restricted to axoneme proteins; it also transports components of receptors and channels that are localized to the ciliary membranes in vertebrate cells.

Absence of cilia is a rare condition in PCD patients (4%) [8] and no causal genes were so far identified. Hepatocyte nuclear factor-3/forhead homologue 4 (HFH-4) null mice have no airway cilia, but ventral node cilia are present. Curiously, this mutant mouse has LD [32].

Establishment of left–right asymmetry and the role of cilia

An important question that has recently received an answer concerns the relationship between ciliary function and body lateralization: why do half of PCD patients present with *situs inversus*?

The looping of the primitive heart tube to the right is the first evidence of lateralization in the embryo. It is thought that lateralization occurs in four steps: (1) initial breaking of bilateral symmetry; (2) establishment of asymmetric gene expression patterns within the embryonic organizer (the mouse ventral node, Hensen's node in chick, dorsal blastopore in *Xenopus* and dorsal forerunner cells in zebrafish) during early gastrulation [33]; (3) transfer of asymmetrical signals from the embryonic organizer to the lateral plate mesoderm; (4) transfer of this positional information to organ primordia.

Cilia are involved in the initial break of bilateral asymmetry in the ventral node in mice. The ventral node is a cup-like structure at the anterior tip of the primitive streak. Cells of the ventral layer of the mouse node (termed nodal pit cells) have a single cilium that rotates generating a leftward flux of periembryonic fluid. This rotational movement is important to trigger the initial step of lateralization because mouse mutants with no cilia movement [34] or lacking cilia [35,36] show left–right randomization. For instance, mice deficient in *Kif3a* or *Kif3b* [35,36], two members of the kinesin superfamily, or *Polaris* (also termed *Tg737*) [37] lack monocilia of the ventral node, have a randomized left–right polarity, and do not survive beyond midgestation. It is not known whether they have normal respiratory cilia and sperm flagella, but a hypomorphic allele of *Polaris* results in polycystic kidney disease, liver and pancreatic cysts and monocilia in the kidney are shorter than normal. It was shown that *Polaris* is the ortholog of *Chlamydomonas* IFT88, a protein involved in intraflagellar transport, and that it maps to the basal bodies and in the axoneme of monociliated and multiciliated epithelium and sperm.

The periembryonic flow might induce a left–right gradient of concentration of putative signal molecule(s) over the mouse ventral node leading to the second step of lateralization. This hypothesis is supported by a recent report demonstrating that a mechanical reversal of this periembryonic flux over a normal node was actually able to reverse left–right polarity in embryos [38]. Although the other steps involved in left–right determination seem to differ among species, it was recently shown that mouse, chick, *Xenopus* and zebrafish all have nodal cilia that express a dynein heavy chain at the end of gastrulation, providing evidence for a conserved initial step in lateralization in all vertebrates [33].

Left–right defects

Any type of disturbance of left–right polarity is termed collectively lateralization defect (LD) or heterotaxy. The incidence of LD is roughly 1 in 8000 births. A person with *situs inversus* and no other anomaly is symptom free. However, anomalies such as midline defects or ciliary dyskinesia that might be associated with *situs inversus* do cause symptoms. Furthermore, complications are frequent in incomplete left–right reversal (*situs ambiguus*). In *situs ambiguus*, the normal cardiac architecture and connections between the heart and vessels are frequently disturbed, resulting in a variety of cardiovascular malformations. In some cases, a cardiovascular malformation such as transposition of the great arteries might be the only expression of an LD as was suggested by familial case studies [39,40].

Most human LD cases seem to be sporadic, and it is a common belief that the rare familial cases are autosomal recessive. Nevertheless, there has been, so far, no molecular confirmation of autosomal recessive inheritance in humans except in Kartagener syndrome. Rare autosomal dominant and X-linked familial cases of LD have been described and a causal gene (*ZIC3*) has been identified on the X chromosome [39]. By contrast, mouse genomic engineering has indicated a large number of genes that are in the molecular pathway to lateralization determination. Among these, only a small subset has been tested in human LD cases, and they are mutated in only 1 to 2% of cases. Moreover, when available, unaffected family members of these LD patients were tested and they were also found to carry the mutation, suggesting that the mutations only predispose the person to LD. It is possible that heterozygous mutations in two or more genes encoding polypeptides of the cascade determining normal lateralization is sufficient to disrupt the normal process, whether these polypeptides are part of the same step of lateralization or not.

Conclusion

The molecular mechanisms controlling the normal growth and function of *Chlamydomonas* arms have obvious implications for the understanding of cilia and flagella in vertebrates. However, the kinetics of *Chlamydomonas* arms differ from vertebrate cilia and flagella. Moreover, these organelles in vertebrates have beating patterns that vary among tissues, and some cilia are immotile (e.g. monocilia of kidney epithelial cells).

This versatility suggests that beside basic components, there are proteins or isoforms that are specific to particular cilia types. There is visible evidence of this diversity at the ultrastructural level, with two types of cilia (9 + 2 and 9 + 0) and with tissue-specific expression of several proteins or isoforms. A complete list of components of cilia of each tissue will help to understand the function of cilia and relate the spectrum of clinical symptoms to the causal gene. It will also help to classify LD not according to its pattern of inverted organs, which is largely irrespective to the gene defect but rather according to anomalies such as midline defects that will give clues to the search for defective gene.

Acknowledgements

We thank Heidi Felix for electron microscopy; Bjorn Afzelius and the reviewers for their help in improving the manuscript; Mark Jorissen and Tom Willems for providing us with a picture of human respiratory epithelial cells in culture; and Julien Bouvagnet for his help in preparing the figures.

References

- Mitchell, D.R. (2000) *Chlamydomonas* flagella. *J. Phycol.* 36, 261–273
- Maiti, A.K. *et al.* (2000) Identification, tissue specific expression, and chromosomal localisation of several human heavy chain genes. *Eur. J. Hum. Genet.* 8, 923–932
- Mocz, G. and Gibbons, I.R. (2001) Model for the motor component of dynein heavy chain based on homology to the AAA family of oligomeric ATPases. *Structure* 9, 93–103
- Gee, M.A. *et al.* (1997) An extended microtubule-binding structure within the dynein motor domain. *Nature* 390, 636–639
- Benashki, S.E. *et al.* (1999) Light chain 1 from the *Chlamydomonas* outer dynein arm is a leucine-rich protein associated with the motor domain of the gamma heavy chain. *Biochemistry* 38, 7253–7264
- Dutcher, K.S. (1995) Flagellar assembly in two hundred and fifty easy to follow steps. *Trends Genet.* 11, 398–404
- Afzelius, B.A. and Mossberg, B. (1995) Immotile cilia syndrome (primary ciliary dyskinesia) including Kartagener syndrome. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver, C.R. *et al.*, eds), pp. 3943–3954, McGraw-Hill
- Jorissen, M. *et al.* (2000) Ultrastructural expression of primary ciliary dyskinesia after ciliogenesis. *Acta Otorhinolaryngol. Belg.* 54, 343–356
- Wheatley, D.N. *et al.* (1996) Expression of primary cilia in mammalian cells. *Cell Biol. Int.* 20, 73–81
- Silflow, C.D. and Lefebvre, P.A. (2001) Assembly and motility of eukaryotic cilia and flagella. Lessons from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 127, 1500–1507
- Wilkerson, C.G. *et al.* (1995) The 78,000 M(r) intermediate chain of *Chlamydomonas* outer arm dynein is a WD-repeat protein required for arm assembly. *J. Cell Biol.* 129, 169–178
- Pennarun, G. *et al.* (1999) loss-of-function mutations in a human gene related to *Chlamydomonas reinhardtii* dynein IC78 result in primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 1508–1519
- Guichard, C. *et al.* (2001) Axonemal dynein intermediate-chain gene (DNAI1) mutations result in *situs inversus* and primary ciliary dyskinesia (Kartagener syndrome). *Am. J. Hum. Genet.* 68, 1030–1035
- Omran, H. *et al.* (2000) Homozygosity mapping of a gene locus for primary ciliary dyskinesia on chromosome 5p and identification of the heavy dynein chain DNAH5 as a candidate gene. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 23, 696–702
- Wilkerson, C.G. *et al.* (1994) Molecular analysis of the gamma heavy chain of *Chlamydomonas* flagellar outer-arm dynein. *J. Cell Sci.* 107, 497–506
- Rupp, G. *et al.* (1996) The sup-pf-2 mutations of *Chlamydomonas* alter the activity of the outer dynein arms by modification of the gamma-dynein heavy chain. *J. Cell Biol.* 135, 1853–1865
- Olbrich, H. *et al.* (2002) Mutations in DNAH5 cause primary ciliary dyskinesia and randomization of left–right asymmetry. *Nat. Genet.* 30, 143–144
- Bartoloni, L. *et al.* (2002) Mutations in the DNAH11 (axonemal heavy chain dynein type 11) gene cause one form of *situs inversus totalis* and most likely primary ciliary dyskinesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 10282–10286
- Kamiya, R. (1988) Mutations at twelve independent loci result in absence of outer dynein arms in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* 107, 2253–2258
- Neesen, J. *et al.* Identification of the human ortholog of the t-complex-encoded protein *TCTEX2* and evaluation as a candidate gene for primary ciliary dyskinesia. *Hum. Genet.*
- Pennarun, G. *et al.* (2000) The human dynein intermediate chain 2 gene (*DNAI2*): cloning, mapping, expression pattern, and evaluation as a candidate for primary ciliary dyskinesia. *Hum. Genet.* 107, 642–649
- Bartoloni, L. *et al.* (2001) Axonemal beta heavy chain dynein DNAH9: cDNA sequence, genomic structure, and investigation of its role in primary ciliary dyskinesia. *Genomics* 72, 21–33
- Zhang, Y.J. *et al.* (2002) Identification of dynein heavy chain 7 as an inner arm component of human cilia that is synthesized but not assembled in a case of primary ciliary dyskinesia. *J. Biol. Chem.* 277, 17906–17915
- DiBella, L.M. *et al.* (2001) The Tctex1/Tctex2 class of dynein light chains. Dimerization, differential expression, and interaction with the LC8 protein family. *J. Biol. Chem.* 276, 14366–14373
- Holzbaun, E.L. and Vallee, R.B. (1994) DYNEINS: molecular structure and cellular function. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10, 339–372
- Neesen, J. *et al.* (2001) Disruption of an inner arm dynein heavy chain gene results in asthenozoospermia and reduced ciliary beat frequency. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1–11
- Yang, P. *et al.* (2000) Protein phosphatases PP1 and PP2A are located in distinct positions in the *Chlamydomonas* flagellar axoneme. *J. Cell Sci.* 113, 91–102
- Yang, P. and Sale, W.S. (2000) Casein kinase I is anchored on axonemal doublet microtubules and regulates flagellar dynein phosphorylation and activity. *J. Biol. Chem.* 275, 18905–18912
- Huang, B. *et al.* (1981) Radial spokes of *Chlamydomonas* flagella: genetic analysis of assembly and function. *J. Cell Biol.* 88, 80–88
- Adams, G.M. *et al.* (1981) Central-pair microtubular complex of *Chlamydomonas* flagella: polypeptide composition as revealed by analysis of mutants. *J. Cell Biol.* 91, 69–76
- Pennarun, G. *et al.* (2002) Isolation and expression of the human hPF20 gene orthologous to *Chlamydomonas* PF20: evaluation as a candidate for axonemal defects of respiratory cilia and sperm flagella. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26, 362–370
- Brody, S.L. *et al.* (2000) Ciliogenesis and left–right axis defect in forkhead factor HFH-4-null mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 23, 45–51
- Essner, J.J. *et al.* (2002) Conserved function for embryonic nodal cilia. *Nature* 418, 37–38
- Okada, Y. *et al.* (1999) Abnormal nodal flow precedes *situs inversus* in *iv* and *inv* mice. *Mol. Cell* 4, 459–468
- Nonaka, S. *et al.* (1998) Randomization of left–right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* 95, 829–837
- Takeda, S. *et al.* (1999) Left–right asymmetry and kinesin superfamily protein KIF3A: new insights in determination of laterality and mesoderm induction by Kif3A^{-/-} mice analysis. *J. Cell Biol.* 145, 825–836
- Murcia, N.S. *et al.* (2000) The Oak Ridge Polycystic Kidney (*orpk*) disease gene is required for the left–right axis determination. *Development* 127, 2347–2355
- Nonaka, S. *et al.* (2002) Determination of left right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature* 418, 96–99
- Gebbia, M. *et al.* (1997) X-linked *situs* abnormalities result from mutations in ZIC3. *Nat. Genet.* 17, 305–308
- Mégarbané, A. *et al.* (2000) X-linked transposition of the great arteries and incomplete penetrance among males with a nonsense mutation in ZIC3. *Eur. J. Hum. Genet.* 8, 704–708

RESUME en français

Notre objectif est d'identifier un gène muté responsable d'une forme familiale de bloc de conduction cardiaque. Cette maladie, à transmission autosomique dominante, a été localisée sur le chromosome 19q13.3 dans un intervalle de 10 cM. L'étude de liaison nous a permis de réduire l'intervalle à 7 cM. Par l'approche de gènes candidats nous avons cherché des mutations dans les parties codantes de 9 gènes, mais aucune anomalie n'a été identifiée. Les données du séquençage du génome humain montrent qu'il y a plus de 100 gènes dans cet intervalle. Nous avons donc entrepris l'approche de la *RDA* (*Representational Difference Analysis*) afin de sélectionner les gènes spécifiquement exprimés dans les voies de conduction cardiaque, en supposant que le gène responsable de la maladie est exprimé spécifiquement dans ce tissu. Ce travail nécessite l'extraction spécifique des transcrits des voies de conduction cardiaque (impossible chez l'homme). Nous avons donc choisi de travailler sur le cœur de bovin. Nous avons réalisé toutes les étapes jusqu'à l'obtention des clones. Après séquençage et tri informatique, nous avons obtenus une quarantaine de clones correspondants seulement à une quinzaine de gènes dont la fonction et la localisation chromosomique sur le génome humain est connue. Nous avons vérifié la spécificité tissulaire par RT-PCR et la localisation cellulaire des transcrits spécifiques est testée par l'hybridation *In Situ*, en cours d'optimisation. En parallèle, nous avons localisé le syndrome de Kartagener lié à l'X en Xq21-q24 chez une famille française à un intervalle de 34 cM, et nous avons exclu deux gènes *MID2* et *AKAP28* comme gènes candidats.

TITRE en anglais

Study of cardiac conduction tissue : identification of genes specifically expressed and implicated in conduction blocs.

RESUME en anglais

We aim to identify a mutated gene responsible for familial cardiac conduction defect. This disease, which is transmitted as autosomal dominant, was localised to 19q13.3 at an interval of 10 cM. Linkage study permitted us to reduce the genetic interval to 7 cM. Using a candidate gene approach, we screened for mutation the coding sequence of 9 genes and no mutation was found. Human genome sequence DataBase revealed the presence of more than 100 genes in this interval. We chose to use the *RDA* (*Representational Difference Analysis*) approach in order to select genes that are specifically expressed in the cardiac conduction tissue, supposing that the gene responsible for this disease is expressed specifically in this tissue. This work requires the obtention of conduction tissue (impossible for human), so we decided to work with bovin hearts. We realised all steps and obtained about forty transcripts, but only about fifteen are genes of known function and localisation on human genome. Their tissue specificity was verified by semi-quantitative RT-PCR and their cellular specificity is tested by *In Situ* Hybridisation, to be optimised. In parallel, we localised an X-linked Kartagener syndrome in a french family to Xq21-q24 at an interval of 34 cM, and we ruled out two genes *MID2* and *AKAP28* as candidate genes.

DISCIPLINE **Génétique et biologie moléculaire**

MOTS-CLES

Bloc de conduction ; HBB ; autosomique dominant ; RDA ; Representational Difference Analysis, Hybridation soustractive ; gènes candidats, marqueurs polymorphes ; Analyse de liaison

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

**Laboratoire « Génétique Moléculaire Humaine », EA 3088
Faculté de Médecine-Pharmacie
8 avenue rockefeller
69373 lyon cedex 08**