



**HAL**  
open science

## Investigations moléculaires dans la mort subite du sujet de moins de 35 ans

Audrey Farrugia-Jacamon

► **To cite this version:**

Audrey Farrugia-Jacamon. Investigations moléculaires dans la mort subite du sujet de moins de 35 ans. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ074 . tel-00804339

**HAL Id: tel-00804339**

**<https://theses.hal.science/tel-00804339v1>**

Submitted on 25 Mar 2013

**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**

*pour obtenir le grade de*

### **DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG**

Discipline : Sciences du vivant

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

*présentée par*

**Audrey FARRUGIA-JACAMON**

### **Investigations moléculaires dans la mort subite du sujet de moins de 35 ans**

*Soutenue publiquement le 5 décembre 2012*

#### **Membres du jury**

Directeur de thèse

**Monsieur Bertrand LUDES**, Professeur à l'Université de Strasbourg

Rapporteurs externes

**Monsieur Angel CARRACEDO**, Professeur à l'Université de Saint-Jacques de Compostelle

**Monsieur Philippe CHEVALIER**, Professeur à l'Université de Lyon

Rapporteur interne

**Monsieur Guy MENSAH-NYAGAN**, Professeur à l'Université de Strasbourg

Examineur

**Monsieur Daniel ROUGE**, Professeur à l'Université de Toulouse



*A. Mathilde*



# Remerciements

Mes premiers remerciements sont destinés au Professeur Bertrand Ludes, qui a toujours su diriger avec sagesse et bienveillance ma formation, ma carrière et cette thèse. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de toute mon admiration et de ma plus profonde gratitude.

Aux Membres du jury, les Professeurs Angel Carracedo, Philippe Chevalier, Guy Mensah-Nyagan et Daniel Rougé, vous me faites l'honneur de juger ce travail. Soyez assurés de ma profonde reconnaissance et de mes remerciements les plus sincères.

Au Professeur Christine Keyser, un immense merci pour ton regard avisé, tes conseils et ta disponibilité, sans toi ce travail n'aurait pas pu aboutir.

Au Professeur Jean Louis Mandel, directeur du laboratoire de Diagnostic Génétique du Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg, vous m'avez permis d'avoir accès à la plateforme HRM Light cyler 480 et je tiens à vous en remercier.

A Angela, Luc et Aurélie, un grand merci pour leur aide précieuse à chacune des trois étapes de ce travail.

A Marie, Clémence et Caroline, je vous remercie chaleureusement pour vos avis scientifiques, vos conseils et surtout pour votre soutien sans faille de la rédaction de ce mémoire jusqu'à son impression !!!

A Anny, Antoine et Jean-Sébastien, un grand merci pour avoir participé activement au recueil des échantillons des cas de mort subite autopsiés à Strasbourg, vous m'avez libéré du temps pour mener à bien la rédaction de ce mémoire et je tiens à vous en remercier.

A Sara pour le soin de sa relecture ainsi qu'à toutes les personnes de l'Institut de Médecine légale pour l'ambiance chaleureuse qu'elles ont contribué à créer tout au long de ce travail, un grand Merci.

Une pensée pour Daniel, qui nous a quittés beaucoup trop tôt, et qui m'a initiée à différents logiciels informatiques indispensables pour la mise en forme de ce travail.

A ma famille et à ma belle-famille et notamment à mes parents et mes beaux-parents, votre soutien et vos encouragements ont été très précieux, un immense Merci.

Mes derniers remerciements, et non les moindres, s'adressent à mon mari Olivier, pour son soutien sans faille, ses mots réconfortants et sa disponibilité pour veiller sur notre fille lors de mes absences répétées. Tu m'as offert un climat serein pour finaliser ce projet et je t'en remercie du plus profond de mon cœur.



# Table des matières

Table des matières .....	1
Liste des tableaux .....	5
Liste des figures .....	7
Liste des annexes.....	9
Liste des abréviations et acronymes.....	11
Introduction générale.....	13
I Rappels Fondamentaux .....	15
I.1 Mort subite.....	17
I.1.1 Définition de la mort subite.....	17
I.1.2 Aspects médico-légaux de la mort subite.....	17
I.1.3 Epidémiologie de la mort subite.....	19
I.2 Arythmies ventriculaires malignes primitives associées aux morts subites inexpliquées.....	23
I.2.1 Syndrome du QT long congénital .....	24
I.2.2 Tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique .....	27
I.2.3 Syndrome de Brugada .....	28
I.2.4 Syndrome du QT court congénital .....	30
I.3 Les investigations moléculaires des canalopathies cardiaques.....	31
I.3.1 Stratégies utilisées en clinique auprès des patients .....	31
I.3.2 Stratégies utilisées en post-mortem dans les cas de mort subite inexpliquée ....	32
I.3.3 Résultats obtenus dans les études post-mortem .....	35
I.4 Problématique posée par l'exploitation des prélèvements FFIP prélevés en post- mortem comme source d'ADN pour les investigations moléculaires.....	37
II Matériel et Méthodes.....	41



II.1	Matériel biologique.....	43
II.1.1	Echantillons tests.....	43
II.1.2	Population d'étude.....	44
II.2	Extraction et quantification de l'ADN.....	49
II.2.1	Etape préliminaire à l'extraction des prélèvements FFIP .....	49
II.2.2	Extraction à partir des prélèvements FFIP .....	50
II.2.3	Extraction à partir des prélèvements congelés .....	53
II.2.4	Extraction à partir des cytobrosses.....	53
II.2.5	Quantification de l'ADN extrait.....	53
II.2.6	Analyses statistiques .....	55
II.3	Analyses génétiques menées .....	56
II.3.1	Choix des gènes d'intérêt .....	56
II.3.2	Détection de variants génétiques sur le gène KCNQ1 par la technologie HRM	57
II.3.3	Détection de variants génétiques sur le gène RYR2 par spectrométrie de masse..	64
II.3.3	.....	64
II.4	Précautions prises lors de l'analyse des échantillons FFIP .....	68
III	Résultats .....	69
III.1	Comparaisons des protocoles d'extraction et des substrats utilisés.....	71
III.1.1	Comparaison des trois types de protocoles .....	71
III.1.2	Comparaison des deux types de substrats .....	73
III.2	Criblage des variants sur le gène KCNQ1 par la technique HRM.....	74
III.2.1	Résultats de l'optimisation des conditions PCR .....	74
III.2.2	Comparaison des résultats de la technique HRM et du séquençage entre échantillons congelés et FFIP.....	74
III.2.3	Variants détectés dans la population d'étude .....	77
III.3	Génotypage des SNPs d'intérêt sur le gène RyR2 par spectrométrie de masse ....	78
III.3.1	Résultats du design des multiplexes.....	78
III.3.2	Comparaisons des résultats entre les expériences réalisées en duplicat.....	79

III.3.3	Comparaisons des résultats entre échantillons congelés et FFIP .....	79
III.3.4	Variants détectés dans la population d'étude .....	82
IV	Discussion .....	85
IV.1	Exploitation des prélèvements FFIP .....	88
IV.1.1	Validation d'un protocole adapté aux prélèvements FFIP .....	89
IV.2	Apport de la technique HRM couplé au séquençage ciblé pour la détection de variants sur le gène KCNQ1.....	91
IV.2.1	Optimisation de la technique HRM au niveau du gène KCNQ1 .....	92
IV.2.2	Evaluation de la reproductibilité de la technique HRM sur les échantillons FFIP par comparaison aux échantillons congelés .....	93
IV.2.3	Apport de la technique HRM comparativement à la méthode de choix par séquençage direct pour l'exploration du gène KCNQ1.....	94
IV.2.4	Prévalence des variants sur le gène KCNQ1 au sein de la population d'étude.	95
IV.3	Apport du génotypage par spectrométrie de masse MALDI-TOF pour la détection de variant sur le gène RyR2 .....	96
IV.3.1	Optimisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour la détection des SNPs d'intérêt sur le gène RyR2.....	97
IV.3.2	Evaluation de la reproductibilité de la spectrométrie de masse MALDI-TOF sur les échantillons congelés et FFIP .....	98
IV.3.3	Prévalence des variants sur le gène RyR2 au sein de la population d'étude....	100
IV.4	Limites et perspectives.....	101
IV.4.1	Du point de vue du recrutement .....	101
IV.4.2	Du point de vue méthodologique .....	102
IV.4.3	Corrélation entre le diagnostic moléculaire et la cause de la mort.....	104
	Conclusion générale .....	107
	Bibliographie.....	111
	Annexes.....	125
	Publications .....	141



# Liste des tableaux

Tableau 1 Indications des autopsies médico-légales de la Recommandation européenne n°R99(3) du comité des ministres aux états membres du Conseil de l'Europe .....	18
Tableau 2 Gènes identifiés dans le SQTl congénital .....	26
Tableau 3 Gènes principalement impliqués dans la TVPC.....	28
Tableau 4 Principaux gènes impliqués dans le Syndrome de Brugada.....	29
Tableau 5 Gènes impliqués dans le syndrome du QT court (SQTc).....	30
Tableau 6 Etudes post-mortem portant sur les gènes impliqués dans les canalopathies cardiaques chez les adultes jeunes et les enfants de plus de un an.....	34
Tableau 7 Caractéristiques des cas de mort subite inexplicée inclus de 2008 à 2011 .....	47
Tableau 8 Quantité moyenne d'ADN extrait ( $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ tissu) selon le type de protocole ....	72
Tableau 9 Comparaison des différences des moyennes d'extraction selon le type de protocole utilisé .....	72
Tableau 10 Quantité moyenne d'ADN extrait ( $\mu\text{g}/100\text{mg}$ tissu) selon le type de substrat quel que soit le protocole utilisé.....	73
Tableau 11 Comparaison des différences des moyennes d'extraction entre les deux types de substrats.....	73
Tableau 12 Variants criblés par la technique HRM et identifiés par le séquençage direct sur le gène KCNQ1 .....	77
Tableau 13 Variants génétiques identifiés sur le gène RyR2 au sein de notre population d'étude (12 cas).....	82



# Liste des figures

Figure 1 Principales causes de mort subite cardiaque chez l'adulte jeune dans deux populations d'études.....	22
Figure 2 Principaux gènes connus à ce jour pour être impliqués dans les canalopathies. Modifié d'après (Allegue 2010).....	23
Figure 3. Fréquence des mutations détectées dans une étude américaine portant sur 49 cas de mort subite inexplicée lors d'investigations génétiques ciblées sur les quatre principaux gènes : KCNQ1 (SQTL1), KCNH2 (SQTL2), SCN5A (SQTL3 et SBr), et RyR2 (TVPC). Adapté de (Tester and Ackerman 2007) .....	35
Figure 4 Fréquences des mutations retrouvées sur les gènes codant pour des canaux ioniques au sein de plusieurs cohortes de MSIN Adapté de (Klaver, Versluijs et al. 2011) .....	36
Figure 5 Adduit hydroxyméthyle (-CH <sub>2</sub> OH) et ponts méthyléniques (R-CH <sub>2</sub> -R') intra et intermoléculaires induit par le formaldéhyde.....	39
Figure 6 Cryotubes et blocs de paraffine contenant les prélèvements tissulaires (cardiaques et hépatiques) d'un cas inclus dans la population d'étude .....	48
Figure 7 Présentation d'une pièce cardiaque inclus au sein d'un bloc de paraffine et découpe de ce bloc au microtome.....	49
Figure 8 Présentation des différentes étapes des trois protocoles d'extraction-purification testées au cours de ce travail .....	52
Figure 9 Cinétique d'amplification : Augmentation progressive de la fluorescence jusqu'à une phase plateau en fonction du nombre de cycles .....	59
Figure 10 Décroissance de la fluorescence en pourcentage en fonction de l'augmentation progressive de la température. D'après Roche Applied Science ( <a href="https://www.roche-applied-science.com">https://www.roche-applied-science.com</a> ). .....	59
Figure 11 Différence des fluorescences en fonction d'une courbe de référence correspondant à la courbe d'un échantillon sauvage .....	60
Figure 12 Principe de la méthode iPLEX Gold de Sequenom .....	66
Figure 13 Courbes de fusion normalisées (A) et différences de fluorescence (B) pour chaque type de situations observées : .....	75
Figure 14 Comparaison des degrés de confiance des allèles assignés selon le type de prélèvement .....	80
Figure 15 Détection d'un artefact de séquence sur un échantillon FFIP.....	81



# Liste des annexes

Annexe 1 Tableau récapitulatif présentant la séquence des amorces PCR utilisées pour l'amplification des exons du gène KCNQ1 par PCR en temps réel sur la plateforme Light cycler 480. ....	127
Annexe 2 Liste des SNPs recherchés par spectrométrie de masse dans notre étude .....	128
Annexe 3 Séquences des amorces PCR et SBE utilisées avec la technologie iPLEX Gold sur le gène RyR2 .....	131
Annexe 4 Amorces PCR utilisées pour le séquençage direct des exons non inclus dans les multiplexes .....	135
Annexe 5 Résultats de la quantification d'ADN extrait à l'aide du kit Quantifiler <sup>TM</sup> à partir des 22 échantillons (11 échantillons de foie et 11 échantillons de cœur) selon les trois méthodes d'extraction et calcul de la quantité moyenne d'ADN extrait en fonction du poids de la coupe .....	136
Annexe 6 Résultats de l'analyse des 105 SNPs sur le gène RyR2 par la technologie iPLEX Gold de Sequenom .....	137
Annexe 7 Coût du séquençage direct (SD) versus la technique HRM couplée au séquençage direct ciblé (HRM/SDC) pour l'ensemble des exons du gène KCNQ1. Calcul réalisé pour les 8 échantillons selon le type d'échantillons (congelés ou FFIP) .....	140





# Liste des abréviations et acronymes

ADN acide désoxyribonucléique

Cp crossing point

DAI Défibrillateur Automatique Implantable

DHPLC « *Denaturing High Pressure Liquid Chromatography* » chromatographie liquide dénaturante haute performance

ECG électrocardiogramme

EDTA acide éthylène diamine tétra acétique

FFIP Fixé au formol et inclus en paraffine

HRM “High resolution Melting” courbe de fusion haute résolution

M molaire (mole/litre)

MALDI TOF Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time Of Flight

min minutes

MgCl<sub>2</sub> chlorure de magnésium

MSN mort subite du nourrisson

NCBI *National Center for Biotechnology Information*

nt nucléotide

pb paire de base

PCR “*Polymerase Chain Reaction*”

pH potentiel hydrogen

rpm rotation par minute

SBE "single base extension" extension d'amorce d'une seule base

SBr syndrome de Brugada

sec secondes

SNP « *Single Nucleotide Polymorphism* » polymorphisme ponctuel de séquence

SQTL syndrome du QT long

SQTC syndrome du QT court

SSCP polymorphisme de conformation simple brin

TVPC Tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique

°C degré Celsius

μL microlitre

# Introduction générale

En France, la mort subite est estimée à environ 60 000 décès par an (Loire 2007) sur un nombre total de 500 à 600 000 décès annuels. Dans 75 % des cas, la mort subite est d'origine cardiaque et pour près de la moitié des morts subites cardiaques survenant chez les sujets jeunes âgés de moins de 35 ans, le décès constitue l'évènement sentinelle justifiant la place prépondérante des investigations médico-légales afin de déterminer les causes et circonstances du décès. Au terme de la réalisation d'une autopsie médico-légale et des analyses anatomopathologiques, toxicologiques voire virologiques, il est possible d'exclure une mort violente et de confirmer l'origine naturelle du décès. Si dans la majorité des cas une anomalie structurale cardiaque ou extra-cardiaque est retrouvée, la cause du décès demeure indéterminée dans 3 à 30 % des cas qui sont par conséquent qualifiés de morts subites inexplicées. La principale hypothèse diagnostique retenue est alors l'arythmie consécutive aux canalopathies cardiaques avec une prédisposition génétique présumée.

Grâce aux données génétiques acquises dans la recherche clinique auprès de populations de patients symptomatiques et des apparentés, des avancées remarquables ont été faites dans la connaissance des gènes impliqués dans ces canalopathies cardiaques. La réalisation d'investigations moléculaires post-mortem visant à détecter d'éventuels variants pathologiques sur les gènes en cause représente alors à la fois un nouvel outil diagnostique permettant de déterminer la cause exacte du décès et un nouvel outil de prévention visant à prévenir la survenue de nouveaux décès au sein de la famille du défunt. Malgré l'existence d'un consensus global sur la nécessité de réaliser ces investigations moléculaires post-mortem, une grande disparité existent entre les différents centres médico-légaux français. Les discordances portent essentiellement sur le protocole autopsique employé et le type de prélèvements réalisés en vue d'éventuelles analyses génétiques si bien que la principale source d'acide désoxyribonucléiques (ADN) disponible s'avère être issue des prélèvements fixés au formol et inclus en paraffine (FFIP). Or les particularités de l'ADN extrait de prélèvements FFIP avec notamment l'apparition d'artéfacts de séquence perturbent l'interprétation des analyses.

Dans ce contexte, l'objectif du travail de thèse présenté dans ce mémoire a été d'élaborer une approche diagnostique post-mortem des mutations au niveau des gènes impliqués dans les

canalopathies cardiaques applicable en routine et adaptée aux prélèvements FFIP et d'évaluer leur pathogénicité afin de pouvoir mettre en place les mesures de prévention adéquates chez les apparentés du défunt. Après avoir validé un protocole d'extraction d'ADN à partir de prélèvements FFIP, nous avons ciblés nos investigations sur deux gènes d'intérêt décrits comme les gènes les plus fréquemment le siège de mutations potentiellement impliquées dans les canalopathies cardiaques congénitales. En tenant compte des particularités de chacun de ces gènes et des résultats observés, nous avons évalué l'application de deux techniques de détection de variants génétiques à partir de prélèvements post-mortem congelés et FFIP recueillis de manière prospective.

Après un bref rappel des aspects médico-légaux de la mort subite et de son épidémiologie, les différentes canalopathies cardiaques congénitales et les études moléculaires post-mortem ciblées sur ces pathologies seront présentées dans la première partie de ce mémoire. Afin de comprendre les difficultés posées par l'exploitation et les résultats obtenus à partir de l'ADN extrait de prélèvement FFIP il sera également présenté dans cette première partie les principaux mécanismes de dégradation auquel l'ADN extrait de prélèvements FFIP est soumis. Les critères d'inclusion au sein de notre population d'étude, la stratégie méthodologique qui a été adoptée dans ce travail et les raisons pour lesquelles nous avons ciblé nos investigations sur deux gènes d'intérêt seront ensuite détaillés. Les résultats obtenus à partir des différents échantillons analysés seront exposés. Finalement, ces résultats seront discutés au regard des données actuelles afin de dégager les apports et les limites de notre travail et de définir les perspectives qu'il ouvre.

Ce travail de thèse a été validé par la publication de deux articles qui sont joints à la fin de ce mémoire, un troisième article est soumis.

# I **Rappels Fondamentaux**



## **I.1 Mort subite**

### **I.1.1 Définition de la mort subite**

La mort subite est classiquement définie comme une mort d'origine naturelle survenant de manière inattendue chez une personne apparemment saine dans les suites immédiates ou dans un délai très court après l'apparition de symptômes tels qu'une douleur dans la poitrine, une dyspnée ou des palpitations. Actuellement, il n'existe pas de réel consensus concernant l'intervalle de temps entre le début des symptômes et le décès. Ainsi, si certains auteurs (Virmani, Burke et al. 2001) considèrent comme morts subites les décès survenus dans les 24 premières heures suivant l'apparition des symptômes, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) retient un délai inférieur à 6 heures et la plupart des études portant sur la mort subite cardiaque un délai inférieur à 1 heure (Zipes and Wellens 1998). Dans la pratique médico-légale, cette définition est applicable avec beaucoup de réserves dans la mesure où 40 % des morts subites surviennent en l'absence de témoin (de Vreede-Swagemakers, Gorgels et al. 1997) et où la personne décédée peut être découverte plusieurs heures voire plusieurs jours après la mort.

### **I.1.2 Aspects médico-légaux de la mort subite**

Les caractéristiques de la mort subite, à savoir sa survenue brutale et inattendue surtout chez les sujets jeunes, en font une mort éminemment suspecte aux yeux de tous expliquant souvent son exploration dans un cadre médico-légal.

En France, la loi prévoit qu'en cas de découverte d'un cadavre dont la cause est inconnue ou suspecte (art.74 du code de procédure pénal), la réalisation d'une levée de corps médico-légale est obligatoire. Les autorités judiciaires peuvent demander en complément de la levée de corps, encore appelée examen externe du cadavre, une autopsie judiciaire afin d'établir les circonstances et causes de la mort.

Parallèlement à cette loi, la recommandation R(99)3 relative à l'harmonisation des règles en matière d'autopsie médico-légale du Conseil de l'Europe adoptée le 2 février 1999 lors de la 658<sup>e</sup> réunion des délégués des ministres établit une liste des situations devant lesquelles une



autopsie judiciaire est préconisée. La mort subite incluant la mort subite du nourrisson figure au sein de cette liste présentée dans le tableau ci-dessous (Tableau 1). Cette recommandation n'a cependant pas de caractère obligatoire et une grande disparité des pratiques dans les indications de l'autopsie, les procédures scientifiques et les modalités de recueil des prélèvements est notée sur le territoire français et également européen (Quatrehomme and Rouge 2003). Par conséquent l'ensemble des morts subites survenant en France ne bénéficient pas de manière systématique d'une autopsie médico-légale. De plus, certaines morts subites survenant dans un établissement de soins peuvent également bénéficier après accord de la famille d'une autopsie médicale et sortir ainsi du contexte médico-légal.

**Tableau 1 Indications des autopsies médico-légales de la Recommandation européenne n°R99(3) du comité des ministres aux états membres du Conseil de l'Europe**

Homicide ou suspicion d'homicide
Mort subite inattendue y compris la mort subite du nourrisson
Violation des droits de l'Homme, telle que suspicion de torture ou de toute forme de mauvais traitement
Suicide ou suspicion de suicide
Suspicion de faute médicale
Accident de transport, de travail ou domestique
Maladie professionnelle
Catastrophe naturelle ou technologique
Décès en détention ou associé à des actions de police ou militaires
Corps non identifié ou restes squelettiques

Classiquement les investigations médico-légales de la mort subite se divisent en quatre étapes (Cohle and Sampson 2001) :

- le recueil des circonstances du décès et des informations cliniques ante-mortem ;
- la réalisation de l'autopsie avec un examen cardiaque minutieux et des prélèvements en vue des investigations complémentaires ;
- la réalisation des examens complémentaires toxicologiques, anatomopathologiques voire bactériologiques et virologiques, sous réserve qu'ils aient été demandés sur réquisition par un Magistrat du Parquet ;

- la formulation des causes de la mort en procédant à la synthèse de l'ensemble des éléments précédents.

Au terme de cette démarche il est possible d'exclure une mort violente d'origine accidentelle, suicidaire ou criminelle (Farrugia and Ludes 2010) et de confirmer l'origine naturelle du décès en distinguant trois catégories médico-légales :

1. **Les morts subites lésionnelles** avec la découverte de lésions organiques ou de troubles métaboliques importants (tel qu'un choc septique) incompatibles avec la survie. Parmi les lésions organiques on distingue (i) les causes cardiaques et (ii) les causes extra-cardiaques essentiellement d'origine cérébrale, pulmonaire et digestive ;
2. **Les morts subites fonctionnelles avec un état pathologique préexistant**, non symptomatique et sans remaniements aigus récents tel qu'un athérome coronarien sans aspect d'infarctus récent où la mort peut être occasionnée par un facteur déclenchant tel qu'un effort, le froid ou un état d'ivresse venant rompre un équilibre fonctionnel jusque-là bien maintenu ;
3. **Les morts subites fonctionnelles sans état pathologique décelable**, on parle alors de morts subites inexplicées (MSI) qui représentent entre 1 et 5 % des autopsies médico-légales (Lawler 1990).

### **I.1.3 Epidémiologie de la mort subite**

La mort subite est estimée en France à environ 10 % des décès annuels soit 60 000 décès par an (Loire 2007). Dans 75 % des cas la mort subite est d'origine cardiaque et constitue le premier et dernier symptôme chez plus de 50 % des patients (Jouven and Escande 2006).

L'étiologie de la mort subite diffère selon l'appartenance à trois groupes d'âges différents.

**Au-delà de 35 ans**, la principale cause de mort subite est la maladie athéromateuse coronarienne (Virmani, Burke et al. 2001).

**Chez le nourrisson de moins d'un an et de plus d'un mois**, la première cause de décès dans les pays développés reste à l'heure actuelle le syndrome de mort subite du nourrisson (MSN) récemment qualifié de mort subite inexplicée du nourrisson (MSIN) (Bloch, Denis et al. 2011, Denjoy, Maltret et al. 2012). Une des définitions récentes du syndrome de MSN donnée en 2004 par Krous et al. est celle d'un « décès inexplicé d'un enfant de moins de un an,

survenant apparemment pendant le sommeil, qui reste inexpliqué après des investigations post-mortem comprenant une autopsie complète et une revue complète des circonstances du décès et de l'histoire clinique » (Krous, Beckwith et al. 2004). Ainsi, ce n'est qu'après une exploration approfondie qu'une mort inattendue du nourrisson c'est-à-dire « tout décès survenu brutalement chez un nourrisson que rien dans ses antécédents ne laissait prévoir » peut être qualifiée de mort subite inexpliquée du nourrisson (diagnostic d'élimination). En France, le centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès (CépiDc) de l'Inserm a enregistré en 2008 (dernière année disponible), 244 cas sous la dénomination de Syndrome de MSN ce qui correspondait à un taux national de 0,33/1000 naissances, parfois en l'absence des investigations post-mortem nécessaires pour affirmer le diagnostic. A titre indicatif, aux Etats Unis en 2005 le taux national de décès par Syndrome de MSN ou « *sudden infant death syndrome (SIDS)* » était évalué à 0,54/1000 naissances (Kung, Hoyert et al. 2008). Classiquement, les Syndromes de MSN ou MSIN surviennent à 90 % avant 6 mois, avec un pic autour de 2-4 mois, et plus souvent chez les petits garçons (Bloch, Denis et al. 2011).

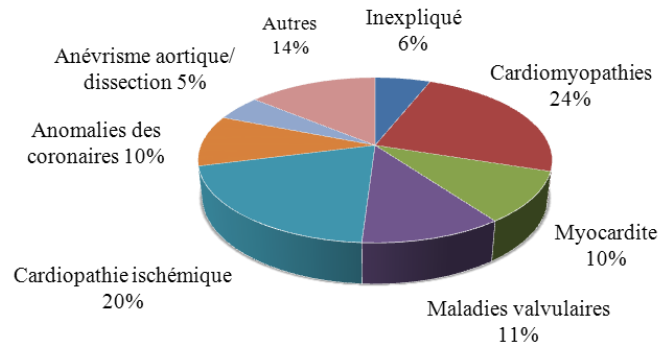
Malgré la diminution considérable de plus de 50 % de la prévalence de la MSIN depuis 1992 grâce aux recommandations concernant les conseils positionnels pendant le sommeil (couchage sur le dos), la prévalence de la MSIN reste élevée et sa physiopathologie exacte demeure en grande partie inconnue. L'hypothèse du triple risque a été proposée (Guntheroth and Spiers 2002) associant la survenue d'un facteur de stress exogène (infection, hyperthermie) à une période critique du développement de l'enfant qui présente une vulnérabilité sous-jacente d'origine environnementale (coucher en position ventrale, exposition au tabagisme) et d'origine génétique à l'origine de désordre métabolique, immunologique ou autonome. Le rôle potentiel des canalopathies cardiaques et notamment du syndrome du QT long dans la survenue des MSN a été évoquée pour la première fois en 1976 (Maron, Clark et al. 1976, Schwartz 1976) puis identifié comme une des causes de MSN plusieurs années plus tard (Schwartz, Priori et al. 2000, Schwartz, Priori et al. 2001). La prévalence des canalopathies cardiaques parmi les cas de MSN est estimée entre 10 % et 20 % (Ackerman, Siu et al. 2001, Tester and Ackerman 2005, Arnestad, Crotti et al. 2007, Millat, Kugener et al. 2009, Klaver, Versluijs et al. 2011).

**Chez l'adulte jeune âgé de moins de 35 ans et l'enfant âgé de plus d'un an**, les principales causes de mort subite sont des pathologies cardiaques structurales, détectables à l'autopsie et lors d'analyses anatomopathologiques, incluant les cardiomyopathies congénitales (telles que la cardiomyopathie hypertrophique, la dysplasie arythmogène du ventricule droit), les cardiopathies ischémiques, les anomalies congénitales des artères coronaires, les myocardites et les anomalies du système de conduction (Drory, Turetz et al. 1991, Basso, Calabrese et al. 2001, Doolan, Langlois et al. 2004).

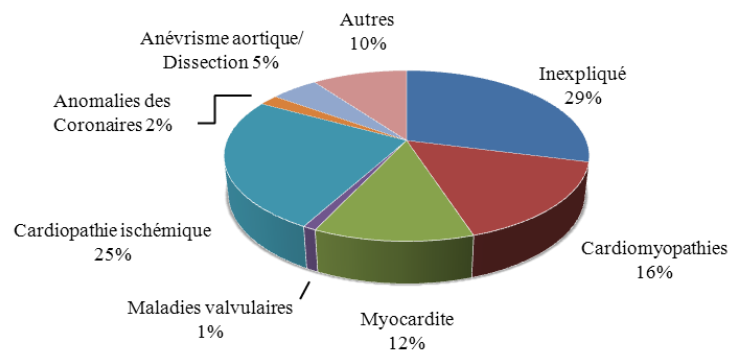
L'incidence de la mort subite cardiaque chez les sujets jeunes âgés de 1 à 30 ans a été évaluée entre 1,3 et 8,5 pour 100 000 individus par année avec une prédominance masculine et une cause cardiaque identifiée dans 2/3 des cas (Liberthson 1996).

Parmi les cas de mort subite survenant chez les adultes jeunes et les enfants, le pourcentage de morts subites inexplicées varie selon les études post-mortem de 3 à 30 % (Corrado, Basso et al. 2001, Maron 2003, Doolan, Langlois et al. 2004, Puranik, Chow et al. 2005). A titre indicatif les principales causes de mort subite cardiaque retrouvées dans une étude italienne et australienne sont présentées dans la figure 1.

### Etude italienne



### Etude australienne



**Figure 1 Principales causes de mort subite cardiaque chez l'adulte jeune dans deux populations d'études.**

**Etude italienne : 273 cas, intervalle d'âge 1-35 ans (Corrado, Basso et al. 2001)**

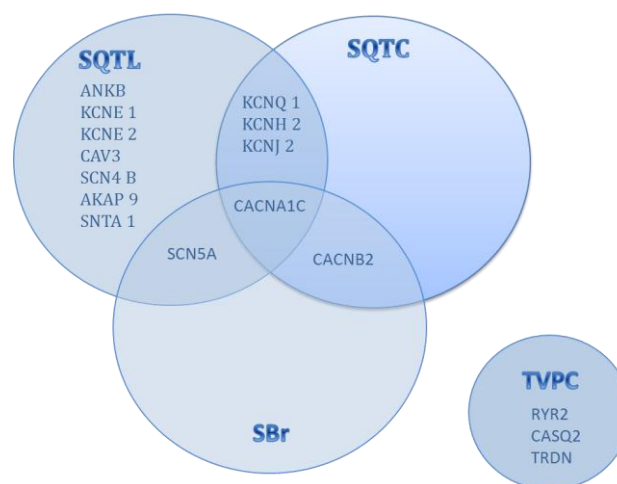
**Etude australienne : 241 cas, intervalle d'âge 1-35 ans (Puranik, Chow et al. 2005)**

En cas de mort subite inexpliquée chez le sujet de moins de 35 ans, la principale hypothèse diagnostique retenue est alors l'arythmie consécutive aux canalopathies cardiaques avec une prédisposition génétique présumée.

## I.2 Arythmies ventriculaires malignes primitives associées aux morts subites inexplicées

Les arythmies ventriculaires malignes primitives encore appelées canalopathies cardiaques congénitales sont dues à des anomalies de fonctionnement primitif des canaux ioniques cardiaques pouvant conduire à une arythmie fatale sur un cœur structurellement sain. Parmi les canalopathies cardiaques, on distingue le syndrome du QT long (SQTL), la tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique (TVPC), le syndrome de Brugada (SBr) et le syndrome du QT court (SQTC). En clinique, le dépistage cardiologique de l'un de ces syndromes repose sur l'analyse de l'ECG, les antécédents personnels de chaque membre de la famille, et éventuellement sur les résultats de l'échocardiographie ou de tests pharmacologiques de sensibilisation. Les récents progrès des techniques de biologie moléculaire ont permis des avancées très importantes dans la connaissance des gènes impliqués dans les canalopathies cardiaques (Figure 2).

La connaissance de ces gènes rend possible, au sein d'équipes multidisciplinaires spécialisées, la prise en charge des apparentés présymptomatiques ou symptomatiques dont le diagnostic n'aurait pas été établi et permettant dans certains cas d'adapter la thérapeutique au génotype détecté.



**Figure 2 Principaux gènes connus à ce jour pour être impliqués dans les canalopathies.**  
Modifié d'après (Allegue 2010)

### I.2.1 Syndrome du QT long congénital

Le SQTl congénital est caractérisé par une anomalie de la repolarisation ventriculaire se traduisant par un allongement de l'intervalle QT corrigé sur l'ECG de base. Ce défaut de repolarisation favorise la survenue d'arythmies ventriculaires polymorphes et en particulier des torsades de pointes pouvant aboutir à une syncope voire une mort subite par fibrillation (Crotti, Celano et al. 2008). Le SQTl congénital est d'origine génétique et obéit à deux modes de transmission :

- un mode autosomique dominant (syndrome de Romano Ward) (Romano, Gemme et al. 1963, Ward 1964) dont la prévalence est estimée à 1/2500 individus (Hedley, Jorgensen et al. 2009) avec une pénétrance (variant de 25 à 90 %) et une expressivité variables (Priori, Napolitano et al. 1999) ;
- un mode autosomique récessif (syndrome de Jervell et Lange-Nielsen) qui est beaucoup plus rare (prévalence 1/50 000 individus) et qui s'accompagne d'une surdité (Jervell and Lange-Nielsen 1957).

Il existe également des formes acquises du SQTl qui sont plus fréquentes que le SQTl congénital et qui sont liées à la prise de certains médicaments tels que la chloroquine, l'érythromycine ou encore certains neuroleptiques comme l'haloperidol (<http://www.azcert.org/medical-pros/drug-lists/bycategory.cfm>) ou à des anomalies cardiaques structurales (Saffitz 2005). Ces formes acquises sont détectables lors de l'autopsie et des investigations toxicologiques et n'entrent donc pas dans la catégorie des morts subites inexplicées.

Le SQTl congénital est une maladie génétique hétérogène causée par des mutations sur des gènes qui ont comme caractéristique commune de coder pour des sous-unités formant les canaux ioniques ou pour des protéines régulant leur fonction. Depuis le commencement de ce travail de thèse, le nombre de gènes connus a progressivement augmenté (8 gènes connus en 2008) et actuellement 13 gènes sont connus pour être impliqués dans le SQTl dont la liste est présentée dans le tableau 2. A partir de très larges cohortes d'études portant sur des patients et leur apparentés (Splawski, Shen et al. 2000, Napolitano, Priori et al. 2005, Tester, Will et al. 2005, Berge, Haugaa et al. 2008) il a été décrit plus de 600 mutations sur ces 13 gènes. La définition de « mutation » retenue dans ces différentes études de cohorte portant sur les canalopathies est celle de variant

génétique non synonyme modifiant l'acide aminé ou les sites d'épissage absent de 400 allèles de références.

Chez 70 à 75 % des patients atteints de SQTl des mutations sont retrouvées au niveau de 3 gènes majeurs : le gène *KCNQ1*, responsable du type de SQTl le plus fréquent (LQT1), codant pour la sous unité  $\alpha$  du canal potassique générant la composante rapide du courant potassique rectificiant retardé ( $I_{Kr}$ ), le gène *KCNH2* (LQT2) codant pour la sous unité  $\alpha$  du canal potassique générant la composante lente du courant potassique rectificiant retardé ( $I_{Ks}$ ) et le gène *SCN5A* (LQT3) codant pour la sous unité  $\alpha$  d'un canal sodique. Les 10 autres gènes mineurs contribuent à environ 5 % des mutations identifiées.

Le SQTl est probablement la pathologie rythmique héréditaire où la relation génotype-phénotype est la mieux établie (Zareba, Moss et al. 1998, Schwartz, Priori et al. 2001, Priori, Schwartz et al. 2003). Cette connaissance permet l'orientation diagnostique voire pronostique et thérapeutique de ce syndrome. Par exemple certains facteurs déclenchant les accidents rythmiques sont plus fréquemment associés à un gène qu'à un autre : les patients LQT1 ont des syncopes d'effort physique, les patients LQT2 sont très sensibles aux émotions ou aux stimulations auditives et les patients LQT3 présentent des troubles du rythme surtout au repos (Tableau 2).

Malgré une très bonne connaissance des origines génétiques de ce syndrome, le diagnostic génétique ne peut être établi pour 25 à 30 % des patients, c'est-à-dire qu'aucune mutation n'est identifiée sur les gènes connus (Tester, Will et al. 2005). Par conséquent, le défaut d'identification d'une mutation sur les gènes connus ne permet pas d'exclure la présence de la pathologie.



**Tableau 2 Gènes identifiés dans le SQTl congénital** [Adapté de (Morita, Wu et al. 2008, Hedley, Jorgensen et al. 2009)]

Type	Gène	Protéine	Courant	Mécanisme	Facteur déclenchant	Fréquence des mutations (%)
LQT1	KCNQ1	Kv7.1 $\alpha$	I <sub>Ks</sub>	Perte de fonction	Exercice (nage), émotion	30-35
LQT2	KCNH2	Kv11.1 $\alpha$	I <sub>Kr</sub>	Perte de fonction	Repos, bruit, émotion	25-30
LQT3	SCN5A	Na <sub>v</sub> 1.5 $\alpha$	I <sub>Na</sub>	Gain de fonction	Sommeil, repos et émotion	5-10
LQT4	ANK2	Ankyrin-B	I <sub>Na-K</sub>	Perte de fonction	Exercice	Rare (<1)
LQT5	KCNE1	minK	I <sub>Ks</sub>	Perte de fonction	Exercice, émotion	Rare (<1)
LQT6	KCNE2	MiRP1	I <sub>Kr</sub>	Perte de fonction	Repos, exercice	Rare (<1)
LQT7	KCNJ2	Kir2.1 $\alpha$	I <sub>K1</sub>	Perte de fonction	Syndromique (Andersen)	Rare (<1)
LQT8	CACNA1C	Ca <sub>v</sub> 1.2 $\alpha$ 1c	I <sub>Ca,L</sub>	Gain de fonction	Syndromique (Timothy)	Rare (<1) syndactylie
LQT9	CAV3	Caveolin-3	I <sub>Na</sub>	Perte de fonction	Repos, sommeil	Rare (<1)
LQT10	SNC4B	Nav $\beta$ 4	I <sub>Na</sub>	Perte de fonction	Exercice, post-partum	Rare (<0,1)
LQT11	AKAP9	Yotiao	I <sub>Ks</sub>	Perte de fonction	Exercice	Rare (<0,1)
LQT12	SNTA1	Syntrophin-A1	I <sub>Na</sub>	Perte de fonction	Repos	Rare (<0,1)
LQT13	KCNJ5	Kir3.4	I <sub>KACH1</sub>	Perte de fonction	/	Rare (<0,1)

I<sub>Kr</sub> courant potassique sortant repolarisant rapide ; I<sub>Ks</sub> courant potassique sortant repolarisant lent ; I<sub>K1</sub> courant potassique à rectification entrante ; I<sub>Na</sub> courant entrant sodique rapide ; I<sub>Ca</sub> courant calcique entrant dépolarisant (lent) ; I<sub>KACH1</sub> courant dépendant de l'acétylcholine ; nd non défini

La prise en charge thérapeutique des patients symptomatiques ou asymptomatiques comporte (i) un traitement médicamenteux par bêtabloquants voire, lorsque les patients ne répondent pas à ce traitement, la mise en place d'un défibrillateur automatique implantable (DAI) (ii) la mise en place de précautions adaptées au type de SQTl telle que la contre-indication de la pratique sportive de compétition (iii) un dépistage familial des apparentés du premier degré du cas index pour lequel des recommandations récentes ont été publiées (Ackerman, Priori et al. 2011).

Etant donné que la mort subite représente un évènement sentinelle pour 5 à 10 % des cas de SQTl (Schwartz 2006), la mise en place d'investigations post-mortem sur les gènes impliqués dans le SQTl s'avère également justifiée.

## **I.2.2 Tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique**

La TVPC se caractérise par des arythmies ventriculaires polymorphes ou bidirectionnelles de déclenchement adrénérgique pouvant conduire à des syncopes et des morts subites en l'absence de toute anomalie morphologique cardiaque avec un ECG de repos normal (Leenhardt, Lucet et al. 1995). La TVPC survient essentiellement chez les enfants et les adultes jeunes (Priori, Napolitano et al. 2002) et a également été décrite dans des cas de syndrome de MSN (Tester, Dura et al. 2007). La prévalence de la TVPC est estimée à 1/2000. Les circonstances de survenue des arythmies sont principalement décrites dans un contexte d'émotion et d'effort physique notamment lors de la natation pouvant alors être à l'origine de noyades (Choi, Kopplin et al. 2004, Creighton, Virmani et al. 2006). De rares cas de survenue au cours du sommeil ont également été rapportés (Allouis, Probst et al. 2005, Tester, Salisbury et al. 2005). La mortalité des TVPC est très élevée atteignant 30 à 50 % à l'âge de 40 ans (Cerrone, Colombi et al. 2004).

La TVPC présente deux modes de transmission :

- un mode autosomique dominant causé par des mutations sur le gène RyR2 codant pour le récepteur cardiaque à la ryanodine situé dans le réticulum endoplasmique (RE) correspondant à l'un des canaux calciques impliqué dans le relargage du calcium à partir du RE, le contrôle de l'homéostasie calcique intracellulaire et la contraction du muscle cardiaque (Laitinen, Brown et al. 2001). A ce jour plus de 150 mutations (variants génétiques non synonymes) ont été décrites sur ce gène (Priori and Chen 2011). Les mutations sur le gène RyR2 sont identifiées chez 50-60 % des patients atteints de TVPC avec un degré de pénétrance élevé de 80 % (Cerrone, Colombi et al. 2004).
- un mode autosomique récessif, beaucoup plus rare, causé par des mutations sur le gène CASQ2 codant pour la calséquestrine, protéine située dans le RE impliquée dans la liaison avec le calcium (Lahat, Pras et al. 2001).

Les mutations sur les gènes RyR2 et CASQ2 sont identifiées chez 50-60 % des patients atteints de TVPC (Priori, Napolitano et al. 2002, Cerrone, Colombi et al. 2004) (Tableau 3). D'autres gènes sont donc potentiellement impliqués dans la pathologie. Une étude récente a d'ailleurs identifié trois mutations survenant sur le gène TRND, codant pour la triadine (une

protéine d'ancrage), qui co-ségrègent avec la maladie selon un mode de transmission récessif dans deux familles au sein d'une cohorte de 97 patients (Roux-Buisson, Cacheux et al. 2012) .

**Tableau 3 Gènes principalement impliqués dans la TVPC**

Gène	Protéine	Mécanisme	Fréquence des mutations (%)
RYR2	Récepteur à la ryanodine 2	Perte de Fonction	50-60
CASQ2	calséquestrine 2	Perte de Fonction	<10

La prise en charge thérapeutique des TVPC est quasi-identique à celle du SQT et s'adresse aux patients symptomatiques et aux patients asymptomatiques porteurs de mutations sur les gènes RyR2 ou CASQ2.

### I.2.3 Syndrome de Brugada

Le syndrome de Brugada (SBr) est une entité clinique identifiée en 1992 (Brugada and Brugada 1992) qui est caractérisé typiquement à l'ECG par un sus-décalage du segment ST à sommet arrondi dans les dérivations précordiales droites associé à des troubles graves du rythme ventriculaire à l'origine de syncopes et de morts subites (Antzelevitch, Brugada et al. 2005).

Cette pathologie considérée comme exceptionnelle est retrouvée chez 4 % des patients qui font une mort subite récupérée et représenterait 20 % des morts subites sans cardiopathie sous jacente (Antzelevitch, Brugada et al. 2005). La mort subite surviendrait principalement au repos notamment la nuit.

La prévalence peut être estimée en France à 1/2000 mais il existe une grande variabilité géographique avec une prévalence plus élevée en Asie qu'en Europe de l'Ouest ou en Amérique du Nord (Hermida, Lemoine et al. 2000).

Habituellement retrouvé chez l'adulte âgé d'une quarantaine d'années (Antzelevitch, Brugada et al. 2005), le SBr a été décrit chez de très jeunes enfants (Probst, Evain et al. 2006). Cette pathologie reste cependant très rare chez les enfants avant la puberté.

Le SBr peut être de forme sporadique ou familiale. Dans les formes familiales, il se transmet sur le mode autosomique dominant à pénétrance faible.

Le gène majeur de cette pathologie est le gène SCN5A qui code pour un canal sodique cardiaque. Plus de 300 variants génétiques ont été identifiés actuellement sur ce gène (Kapplinger, Tester et al. 2010). Cependant, le taux de mutations détectées sur ce gène chez les patients atteints de SBr est relativement faible, de l'ordre de 20 à 30 %. D'autres gènes ont été identifiés ces dernières années mais ne permettent d'expliquer qu'un très faible pourcentage des cas (Tableau 4).

**Tableau 4 Principaux gènes impliqués dans le Syndrome de Brugada [Adapté de (Bastiaenen and Behr 2011)]**

Type	Gène	Protéine	Courant	Mécanisme	Fréquence des mutations (%)
SBr1	SCN5A	Na <sub>v</sub> 1.5	I <sub>Na</sub>	Perte de fonction	20-30
SBr2	GPD1L	G3PD1L	I <sub>Na</sub>	Perte de fonction	rare
SBr3	CACNA1C	Ca <sub>v</sub> 1.2	I <sub>Ca</sub>	Perte de fonction	?
SBr4	CACNB2	Ca <sub>v</sub> β2	I <sub>Ca</sub>	Perte de fonction	?
SBr5	SCN1B	Na <sub>v</sub> β	I <sub>Na</sub>	Perte de fonction	?
SBr6	KCNE3	MiRP2	I <sub>Ks</sub> I <sub>to</sub>	Gain de fonction	?
SBr7	SCN3B	Na <sub>v</sub> β3	I <sub>Na</sub>	Perte de fonction	?
SBr8	CACNA2D1	Ca <sub>v</sub> α2δ1	I <sub>Ca</sub>	Perte de fonction	?

I<sub>Na</sub> courant sodique entrant dépolarisant rapide; I<sub>Ca</sub> courant calcique entrant dépolarisant (lent); I<sub>Kr</sub> courant potassique sortant repolarisant rapide; I<sub>to</sub> courant potassique transitoire sortant

A ce jour, l'apport du diagnostic moléculaire dans la prise en charge des patients atteints de SBr demeure peu informatif. En effet, la détection d'une mutation sur le gène SCN5A n'est que peu prédictive d'un risque de développer un SB chez les apparentés d'un cas index et, de même, l'absence de la mutation ne peut pas garantir l'absence de la maladie (Probst, Allouis et al. 2006).

Concernant la prise en charge thérapeutique, si les patients qui ont déjà présenté une syncope ou une mort subite doivent pour la plupart être protégés par un DAI, la prise en charge des patients asymptomatiques est plus difficile et reste encore discutée.

## I.2.4 Syndrome du QT court congénital

Le syndrome du QT court (SQTC) congénital est un syndrome génétique récemment découvert, caractérisé par l'association d'un intervalle QT raccourci sur l'ECG et de la survenue de troubles du rythme auriculaire et/ou ventriculaire sur un cœur par ailleurs considéré comme sain (Gussak, Brugada et al. 2000). Les troubles du rythme peuvent survenir aussi bien chez le nourrisson que chez l'adulte. La survenue d'une fibrillation auriculaire peut précéder celle d'une syncope et d'une mort subite. Cependant, la mort subite peut également être le premier symptôme de la maladie (Extramiana 2005).

Le syndrome peut se présenter sous la forme de cas sporadiques mais la notion de formes familiales a été décrite très tôt orientant vers une cause génétiquement transmissible.

Les mutations actuellement connues pour être impliquées dans cette pathologie sont présentes sur trois gènes codant pour des canaux potassiques (connus pour être également impliqués dans le SQTl) : KCNH2 (Brugada, Hong et al. 2004) , KCNJ2 (Priori, Pandit et al. 2005) et KCNQ1 (Bellocq, van Ginneken et al. 2004). A la différence du SQTl, les mutations retrouvées dans le SQTC sont à l'origine d'un gain de fonction entraînant une augmentation des courants ioniques repolarisants (Tableau 5). Récemment deux gènes codant pour des canaux calciques ont également été associés à la pathologie : CACNA1 et CACNB2. Compte tenu du faible recul et du faible nombre de patients connus présentant ce syndrome (quelques dizaines), il est encore prématuré d'évaluer la fréquence des mutations chez les patients atteints de SQTC.

**Tableau 5 Gènes impliqués dans le syndrome du QT court (SQTC)** Adapté de (Morita, Wu et al. 2008)

Type	Gène	Protéine	Courant	Mécanisme	Circonstances de survenue	Fréquence des mutations (%)
SQTC1	KCNH2	K <sub>v</sub> 11.1 $\alpha$	I <sub>Kr</sub>	Gain de fonction	Exercice	?
SQTC2	KCNQ1	K <sub>v</sub> 7.1 $\alpha$	I <sub>Ks</sub>	Gain de fonction	/	?
SQTC3	KCNJ2	Kir2.1 $\alpha$	I <sub>K1</sub>	Gain de fonction	/	?
SQT4	CACNA1	Ca <sub>v</sub> 1.2	I <sub>Ca</sub>	Perte de fonction	Sommeil	?
SQT5	CACNB2	Ca <sub>v</sub> $\beta$ 2	I <sub>Ca</sub>	Perte de fonction	/	?

I<sub>Kr</sub> courant potassique sortant repolarisant rapide, I<sub>Ks</sub> courant potassique sortant repolarisant lent, I<sub>K1</sub> courant potassique à rectification entrante, I<sub>Ca</sub> courant calcique entrant dépolarisant (lent)

Concernant la prise en charge thérapeutique du SQTC, le seul traitement ayant fait la preuve de son efficacité à l'heure actuelle est la pose d'un DAI, indiquée chez les patients présentant des symptômes (syncopes, tachycardie, ou/et fibrillation ventriculaire) afin de prévenir les morts subites (Brugada, Hong et al. 2004, Schimpf, Bauersfeld et al. 2005).

## **I.3 Les investigations moléculaires des canalopathies cardiaques**

### **I.3.1 Stratégies utilisées en clinique auprès des patients**

Lorsque ce travail de thèse a débuté, la détection des variants génétiques sur les gènes connus pour être impliqués dans les canalopathies cardiaques au sein de cohortes de patients symptomatiques et de leurs apparentés était basée principalement sur le séquençage direct des gènes d'intérêts ou sur des techniques de criblage du gène par polymorphisme de conformation simple brin classiquement dénommée SSCP « *Single strand conformation polymorphism* » (Tester, Will et al. 2006, Wedekind, Bajanowski et al. 2006), ou par chromatographie liquide dénaturante haute performance classiquement dénommée DHPLC « *Denaturing High Pressure Liquid Chromatography* » (Ning, Moss et al. 2003, Lai, Su et al. 2005, Napolitano, Priori et al. 2005) afin de cibler le séquençage et de réduire ainsi le coût des analyses.

La méthode SSCP est basée sur le comportement électrophorétique des molécules d'ADN simple brin dans un gel d'acrylamide non dénaturant. Il s'agit d'une technique simple mais qui comporte deux inconvénients majeurs. Le comportement électrophorétique des fragments monocaténaire est imprévisible car il est dépendant de la température et des conditions d'électrophorèse d'où la nécessité de réaliser de manière empirique de nombreux essais d'optimisation. De plus, dans le cas de longs fragments (>200pb), la méthode devient insensible à certaine mutation.

Compte tenu de ces inconvénients, cette méthode a été progressivement abandonnée au profit de la méthode de screening par la DHPLC basée sur la séparation des fragments d'ADN selon leur taille et/ou la présence d'hétéroduplexes (brins d'ADN réassociés) pendant leur passage dans le gradient d'une colonne chromatographique. Cette méthode est largement

décrite comme une technologie simple, robuste, sensible avec une sensibilité proche de 100 % (Lai 2005). Cependant, cette technique nécessite également une importante optimisation des températures avec des répercussions en termes de coût et de temps d'analyse (Hedley 2009).

Par la suite une autre technique de criblage, la technologie d'analyses haute résolution des courbes de fusion classiquement appelée technique HRM « *high resolution melting* » a été optimisée par Millat et al. sur le gène SCN5A (Millat, Chanavat et al. 2009). Le principe de cette technique est développé dans la partie « Méthode ».

Enfin, parallèlement aux stratégies de détection des mutations connues ou non connues sur une séquence donnée, il s'est développé une nouvelle approche de génotypage des variations de séquence portant sur un nucléotide donné appelés SNP pour « *single base polymorphism* » par l'équipe du Professeur Angel Carracedo de Saint Jacques de Compostelle (Allegue, Gil et al. 2010) à l'aide de la spectrométrie de masse MALDI-TOF.

### **I.3.2 Stratégies utilisées en post-mortem dans les cas de mort subite inexplicée**

Les premières études génétiques post-mortem ont été réalisées sur des cas isolés de mort subite survenant chez le nourrisson ou l'adulte jeune (Ackerman, Tester et al. 1999, Ackerman, Siu et al. 2001, Ackerman, Tester et al. 2001, Schwartz, Priori et al. 2001).

La première série post-mortem est réalisée par Chugh et al. en 2004 et porte sur la détection de variants génétiques sur les principaux gènes impliqués dans le SQTl sur une cohorte de 12 cas de mort subite inexplicée à partir de prélèvements myocardiques FFIP (Chugh, Senashova et al. 2004).

D'autres études ont suivi et au commencement de ce travail de thèse, on comptait sept études présentées dans le tableau 6. Ces études portaient sur des séries de 12 à 59 cas de morts subites inexplicées avec des intervalles d'âges différents dont les extrêmes étaient compris entre 1 et 43 ans. La stratégie de détection était basée sur une sélection des gènes les plus fréquemment mutés dans le SQTl à savoir les gènes KCNQ1, KCNH2, KCNE1, KCNE2, SCN5A et dans la TVPC à savoir le gène RyR2. En raison de la taille du gène RyR2 (105 exons) l'exploration de ce gène dans les cohortes de patients (Postma, Denjoy et al. 2005, Medeiros-Domingo, Bhuiyan et al. 2009) a toujours été ciblée à des « régions chaudes »

correspondant à des régions à fort taux de mutation avec un nombre d'exons ciblés pouvant varier de 18 à 64 exons selon les études (Tableau 6). Les principales techniques utilisées étaient identiques à celles employées en clinique à savoir le séquençage direct et le criblage par SSCP et DHPLC couplé au séquençage ciblé. Les types de substrats employés étaient soit des prélèvements FFIP soit du sang soit des tissus congelés.

Une étude avait eu recours à l'une des premières plateformes d'analyse de courbe de fusion haute résolution et avait ciblé avec cette technique 24 des 105 exons du gène RyR2 en utilisant comme substrat du sang prélevé au cours de l'autopsie. Aucune précision sur l'optimisation de cette technique n'était apportée dans la publication (Nishio, Iwata et al. 2006).

Récemment les stratégies de typage des SNPs ont été appliquées à la recherche des variants génétiques connus sur les gènes impliqués dans le SQTl dans des cas de mort subite inexplicée (Allegue, Gil et al. 2011, Edelmann, Schumann et al. 2012). On distingue essentiellement le miniséquençage à l'aide du kit SNaPshot<sup>TM</sup> (Applied Biosystem) et la technologie iPLEX Gold sur la plateforme MassARRAY (Sequenom). Ces deux techniques sont basées sur un principe similaire associant une étape de discrimination allélique par extension d'amorce d'une seule base suivie d'une détection soit par réaction de miniséquençage en présence de ddNTPs (didésoxynucléotides triphosphates) marqués par un fluorochrome soit d'une détection par spectrométrie de masse MALDI-TOF.



**Tableau 6 Etudes post-mortem portant sur les gènes impliqués dans les canalopathies cardiaques chez les adultes jeunes et les enfants de plus d'un an**

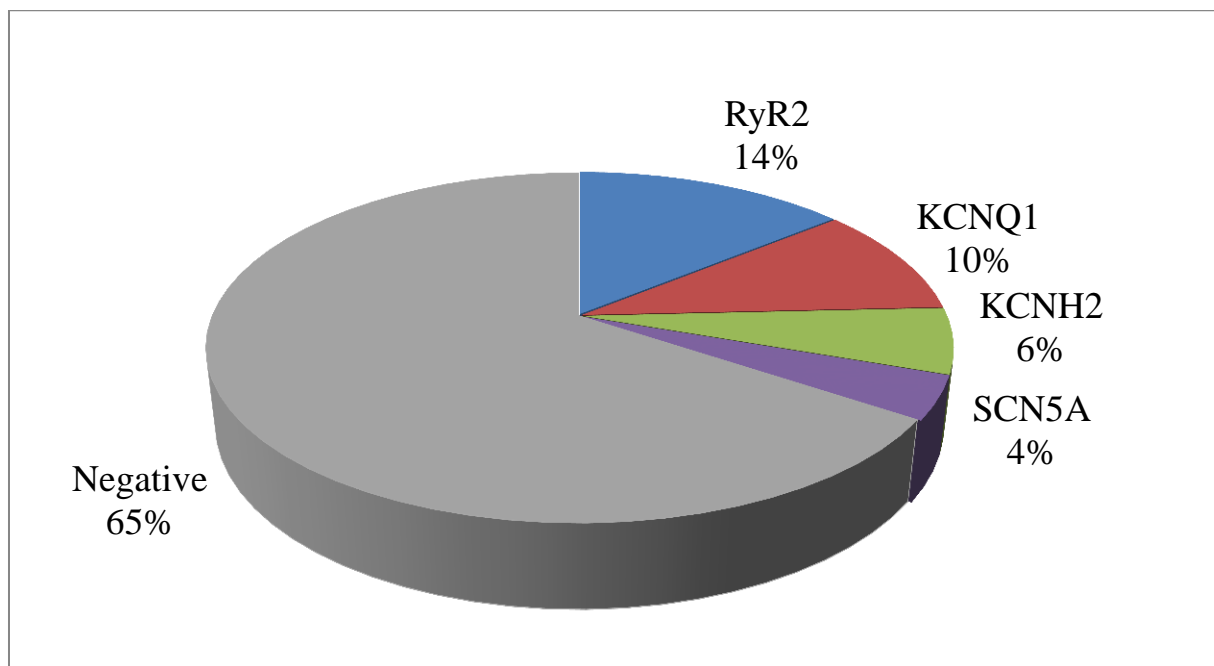
Références	Nbr	Intervalle de temps	Age (années)	Ratio M/F	Gènes étudiés	Méthode d'analyses génétiques	Type d'échantillons	Nbr variant sur le gène d'intérêt (%)
(Chugh, Senashova et al. 2004)	12	1984-1996	n.a.	n.a.	KCNQ1, KCNH2, KCNE1, KCNE2, SCN5A	SSCP	FFIP (myocarde)	2 KCNH2 (17)
(Di Paolo, Luchini et al. 2004)	10	1996-2004	13-29	1	Genes LQTS	SSCP	FFIP	2 KCNQ1 (20)
(Nishio, Iwata et al. 2006)	18	Durant 9 ans	2-42	2,6	RyR2 (analyse ciblée sur 24 exons)	HRM	Sang	2 RyR2 (11)
(Tester, Spoon et al. 2004, Tester and Ackerman 2007)	49	1998-2004	1-43	1,7	KCNQ1, KCNH2, SCN5, KCNE1, KCNE2, KCNJ2 RyR2 (analyse ciblée sur 18 exons)	DHPLC	Tissu congelé et sang	5 KCNQ1 (10) 3 KCNH2 (6) 2 SCN5A (4) 7 RyR2 (14)
(Creighton, Virmani et al. 2006)	14	n.a.	1-43	1,3	KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNE2, RyR2 (analyse ciblée sur 36 exons)	SD	Tissu congelé	3 RyR2 (21) 1 KCNQ1 (7)
(Carturan, Tester et al. 2008)	35	n.a.	n.a.	n.a.	RyR2 (analyse ciblée sur 25 exons)	DHPLC	FFIP (myocarde)	0 (0)
(Doolan, Langlois et al. 2008)	59	1994-2002	1-35	1,8	KCNQ1, SCN5A	DHPLC	FFIP (foie et rate)	0 (0)
(Wong, Koo et al. 2009)	28	n.a.	1-35	n.a.	RyR2 (analyse ciblée sur 54 exons) CASQ2	DHPLC SD	Sang ou myocarde congelés	2RyR2 (7) 3 CASQ2 (3)
(Gladding, Evans et al. 2010)	21	n.a.	0-34	1,3	KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNE2	DHPLC or SD	Carte Guthrie (goutte de sang)	4 KCNQ1 (21) 4 KCNH2 (21) 1 KCNE1 (4)
(Tester, Medeiros-Domingo et al. 2011)	35	1998-2010	4-69	1,9	KCNQ1, KCNH2, SCN5A, RyR2 (analyse ciblée sur 64 exons)	DHPLC	Sang ou myocarde congelés	3 KCNQ1 (8) 6 RyR2 (17)
(Skinner, Crawford et al. 2011)	33	2006-2008	1-40	2,6	KCNQ1, KCNH2, SCN5A, AnkB, KCNE1, KCNE2, KCNJ2	DHPLC or SD	Sang ou tissus	1 KCNQ1 (3) 1 KCNH2 (3) 1 SCN5A (3) 2 KCNE1 (6)
(Edelmann, Schumann et al. 2011)	35	n.a.	n.a.	n.a.	KCNQ1, KCNH2	Miniséquençage par SNaPshot	Sang	1 KCNQ1 (2,5)
(Allegue, Gil et al. 2011)	14	n.a.	1-43	n.a.	KCNQ1, KCNH2, SCN5A	Spectrométrie de masse sur plateforme Sequenom	Tissus congelés ou FFIP ou sang	1 KCNQ1 (7)
Larsen et al. 2012	74	1998-2007	0-40	1,5	RyR2 (analyse ciblée sur 29 exons)	SD	Sang congelé	7 RyR2 (9,5)
Tester et al. 2012	173	1998-2010	1-69	1,6	KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNE2, RyR2 (analyse ciblée)	DHPLC	Données non disponibles dans le « <i>preview article</i> »	

Nbr nombre ; SD Séquençage direct

### I.3.3 Résultats obtenus dans les études post-mortem

#### I.3.3.1 Chez l'adulte jeune et l'enfant de plus d'un an

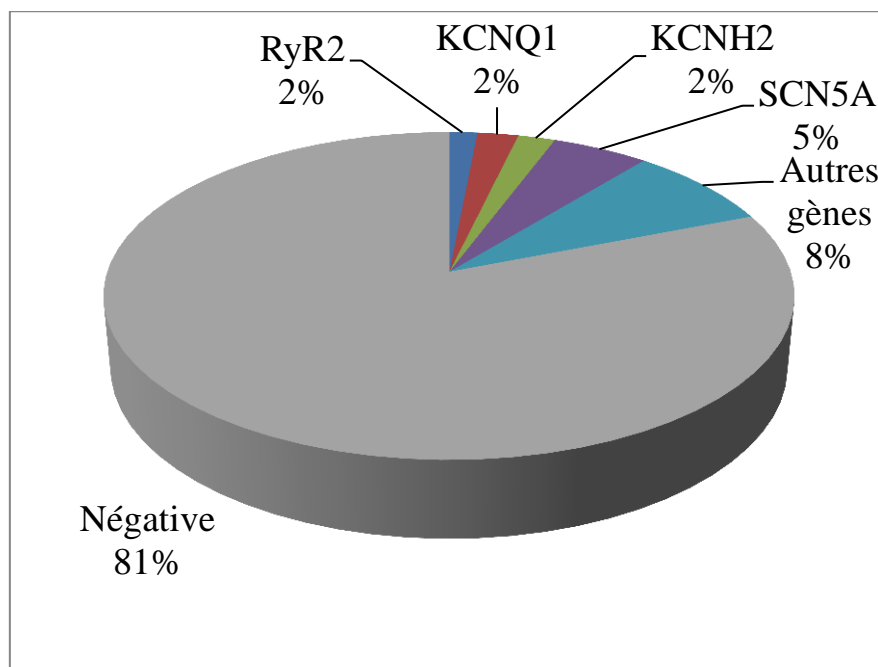
Dans les deux premières études post-mortem explorant les principaux gènes impliqués dans le SQTl (Chugh, Senashova et al. 2004, Di Paolo, Luchini et al. 2004) des mutations avaient été identifiées respectivement dans 17 % des cas (2/12) et 20 % des cas (2/10). L'étude de Nishio (Nishio, Iwata et al. 2006) portant uniquement sur 24 exons du gène RyR2 avait retrouvé 11 % de cas porteurs de mutations. L'une des plus grande série portant sur 49 cas de mort subite inexplicable survenant chez l'adulte jeune (1-43 ans) (Tester, Spoon et al. 2004, Tester and Ackerman 2007), retrouvait dans 35 % des cas une mutation sur l'un des quatre gènes explorés dont 14 % sur le gène RYR2, 10 % sur le gène KCNQ1, 6 % sur le gène KCNH2 et 4 % sur le gène SCN5A (figure ci-dessous).



**Figure 3** Fréquence des mutations détectées dans une étude américaine portant sur 49 cas de mort subite inexplicable lors d'investigations génétiques ciblées sur les quatre principaux gènes : KCNQ1 (SQTl1), KCNH2 (SQTl2), SCN5A (SQTl3 et SBr), et RyR2 (TVPC). Adapté de (Tester and Ackerman 2007)

### I.3.3.2 Chez le nourrisson

L'exploration post-mortem des mutations sur les gènes codant pour les canaux ioniques cardiaques dans les cas de syndrome de MSN ou « *sudden infant death syndrome* » a été réalisée jusqu'à ce jour au sein d'une dizaine de cohortes de nationalités différentes (Nord-américaine (Tester, Spoon et al. 2004, Tester and Ackerman 2005), Afro-américaine (Plant, Bowers et al. 2006), Allemande (Wedekind, Bajanowski et al. 2006), Norvégienne (Arnestad, Crotti et al. 2007), Japonaise (Otagiri, Kijima et al. 2008)) dont une seule série française comptant 32 cas de MSIN (Millat, Kugener et al. 2009). A partir de l'ensemble de ces études, il a été calculé (Klaver, Versluijs et al. 2011) que 19,5 % des cas de MSIN portaient une mutation au niveau de l'un des 16 gènes explorés (dont les principaux gènes impliqués dans le SQT, Sbr et TVPC) dont la fréquence au niveau des gènes est présentée dans la figure ci-dessous (Figure 4). Dans la majorité des cas (13,5 %) les mutations étaient considérées comme délétères et dans la minorité des cas (6,5 %) il n'était pas possible de se prononcer sur le caractère délétère des mutations en raison soit de l'absence de données disponibles sur le retentissement fonctionnel de la mutation en question au sein de la littérature soit car aucun retentissement fonctionnel n'était observé au décours d'études fonctionnelles.



**Figure 4** Fréquences des mutations retrouvées sur les gènes codant pour des canaux ioniques au sein de plusieurs cohortes de MSIN Adapté de (Klaver, Versluijs et al. 2011)

## **I.4 Problématique posée par l'exploitation des prélèvements FFIP prélevés en post-mortem comme source d'ADN pour les investigations moléculaires**

En France les prélèvements FFIP constituent la source principale de prélèvements post-mortem disponibles en vue de réaliser des investigations moléculaires portant sur les canalopathies cardiaques. On distingue deux raisons à ce constat. D'une part, les prélèvements FFIP, décrits il y a plus de 100 ans, constituent le mode de conservation des tissus le plus utilisé dans la pratique médico-légale en vue d'analyses anatomopathologiques complémentaires. D'autre part, la réalisation de prélèvements tissulaires ou de sang en vue d'une congélation comporte des contraintes matérielles avec la nécessité de disposer d'un équipement dédié (congélateur -20°C et idéalement conservation azote liquide à -80°C) dans un espace dédié. Compte tenu des contraintes imposées par ce mode de conservation, très peu d'équipes médico-légales y ont recours. A titre indicatif, l'enquête internationale réalisée par Michaud et al. (Michaud, Mangin et al. 2011) portant sur les procédures d'investigations mises en place en cas de mort subite cardiaque (protocole autopsique, type de prélèvements réalisés et mode de conservation de ces derniers, type d'examen complémentaires) a retrouvé que seuls 15 % des répondants réalisent de manière systématique des prélèvements de myocarde congelés et 49 % des prélèvements de sang sur tube EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique).

Si la fixation par immersion du matériel prélevé dans le formaldéhyde (fixateur le plus couramment employé) permet une conservation des structures tissulaires, ce mode de conservation est à l'origine d'une dégradation de l'ADN qui pose certains problèmes pour la réalisation des analyses moléculaires. Il s'ajoute à la dégradation induite par le formaldéhyde la dégradation post-mortem qui débute dès la mort de l'organisme et qui influe sur la qualité de l'ADN extrait selon le délai écoulé entre le décès et la réalisation des prélèvements lors de l'autopsie médico-légale.

### **I.4.1.1 Les mécanismes de dégradation de l'ADN en post-mortem**

Après la mort de l'organisme, deux mécanismes de dégradation post-mortem peuvent être observés : les processus enzymatiques et les processus chimiques qui ont largement été décrits dans les études d'ADN ancien (Lindahl 1993).

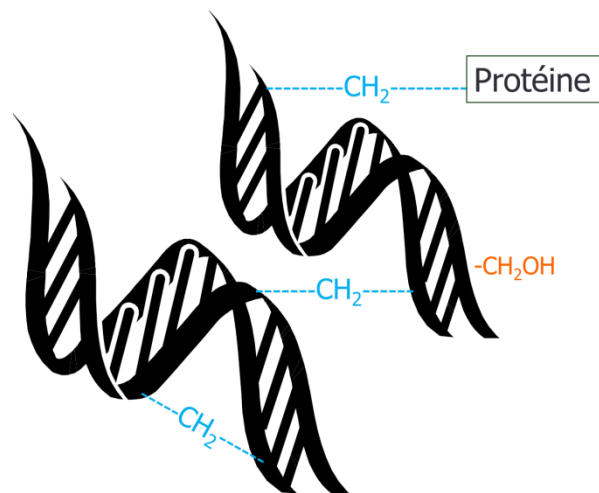
Les processus enzymatiques correspondent à la libération des nucléases endogènes issues de la rupture des compartiments cellulaires à la mort de l'organisme ou des nucléases produites par les organismes saprophytes responsables de la décomposition des tissus, qui vont être à l'origine d'un clivage des liaisons phosphodiester entre chaque nucléotide et entraîner une fragmentation de l'ADN .

Les processus de dégradation chimique sont des mécanismes beaucoup plus lents correspondant majoritairement à des phénomènes d'hydrolyse et d'oxydation. Ces phénomènes peuvent conduire à la formation de sites abasiques qui vont être à l'origine soit de la rupture simple ou double brin de l'ADN, soit du blocage de l'activité de la polymérase au cours de l'amplification accentuant la fragmentation de l'ADN. Les modifications chimiques de l'ADN peuvent également induire des désaminations ou des oxydations de certaines bases pouvant conduire à l'incorporation de bases incorrectes lors de l'amplification (Gilbert, Hansen et al. 2003). Enfin, d'autres types de réactions chimiques peuvent conduire à la formation de liaisons intra-moléculaires et inter-moléculaires qui peuvent bloquer l'élongation des produits PCR (*Polymérase Chain Reaction*) par la polymérase.

### **I.4.1.2 Les mécanismes de dégradation de l'ADN par le formaldéhyde**

De nombreux paramètres influent sur la cinétique de fixation des tissus par le formaldéhyde et par conséquent sur la dégradation de l'ADN par ce fixateur (Srinivasan, Sedmak et al. 2002, Miething, Hering et al. 2006, Ferrer, Armstrong et al. 2007). Parmi ces paramètres, on distingue notamment le temps de fixation et le volume du liquide fixateur dans lequel le prélèvement est placé, la vitesse de pénétration dans le tissu biologique qui est elle-même fonction du type de tissu (de sa densité, de sa richesse en protéines) et de la taille du fragment tissulaire (plus le fragment présente une faible épaisseur, idéalement 0,5cm, plus la vitesse de pénétration est rapide). Enfin, le pH de la solution de formaldéhyde joue également un rôle important sachant que différents types de solutions de formaldéhyde peuvent être utilisées avec un pH plus ou moins acide : non tamponnée (pH variant de 2,8 à 4 selon la teneur en méthanol), tamponnée à 4 % (pH 6,9) ou tamponnée à 10 % (pH 7,4).

Ainsi, dans le contexte le plus fréquent d'utilisation d'une solution tamponnée à 10 % de formol (pH 7,4), le formaldéhyde ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) n'entraîne pas d'hydrolyse des acides nucléiques (Plenat, Montagne et al. 2006). En revanche, il dénature l'ADN en déstabilisant les liaisons hydrogènes de la double hélice puis crée des liaisons partiellement réversibles avec les groupements  $\text{NH}_2$  terminaux situés au niveau des protéines et des acides nucléiques à l'origine d'adduits hydroxyméthyles et de ponts méthyléniques ( $\text{R-CH}_2\text{-R}'$ ) intra-moléculaires (entre deux acides nucléiques au sein de la même molécule d'ADN) et inter-moléculaires (soit entre deux molécules d'ADN soit entre une molécule d'ADN et une protéine) (Figure 5). Ces modifications structurales sont à l'origine d'encombrements stériques qui peuvent bloquer la disponibilité de l'ADN pour les réactions d'amplification ce qui conduit à une diminution de l'efficacité de la PCR (moindre affinité de la polymérase pour l'ADN) et à des arrêts de lecture par la polymérase expliquant la petite taille des produits PCR observée à partir de d'ADN extrait de tissus FFIP.



**Figure 5 Adduit hydroxyméthyle ( $-\text{CH}_2\text{OH}$ ) et ponts méthyléniques ( $\text{R-CH}_2\text{-R}'$ ) intra et intermoléculaires induit par le formaldéhyde**

Parallèlement à cette dégradation, il est également observé lors du séquençage de l'ADN extrait de prélèvements FFIP une fréquence élevée de mutations artéfactuelles non reproductibles avec une nette prédominance des substitutions de base de type transitions (modification d'une base pyrimidique C ou T par une base pyrimidique ou d'une base purique A ou G par une base purique,  $\text{C:G} > \text{T:A}$ ) (Williams, Ponten et al. 1999, Quach, Goodman et al. 2004, Do and Dobrovic 2009, Do and Dobrovic 2012). Si les mécanismes exacts à l'origine de ces modifications de séquences restent encore peu compris, certains auteurs ayant constatés une diminution des artéfacts de séquence en utilisant l'uracile-ADN-Glycosylase

identifie la désamination de la cytosine en uracile (un analogue de la thymine) comme un des mécanismes potentiels à l'origine des modifications de séquence de l'ADN extrait de prélèvements FFIP (Do and Dobrovic 2012).

**Au final, l'ADN extrait de prélèvements FFIP présente des caractéristiques très similaires à l'ADN extrait de spécimens anciens.** En effet dans les deux cas les produits PCR obtenus sont de petites tailles, ces produits peuvent être le siège de mutations artéfactuelles en raison de l'incorporation par la polymérase de bases erronées et compte tenu des modifications structurales de la double hélice d'ADN, un ADN contaminant non dégradé est susceptible d'être préférentiellement amplifié et donc d'être retrouvé dans l'analyse.

Cette corrélation justifie la mise en place lors de l'exploitation de prélèvements FFIP des mêmes procédures d'analyses que dans les études d'ADN ancien à savoir l'utilisation de paires d'amorces permettant d'amplifier de courts fragments d'ADN, la répétition des réactions d'amplification indépendantes les unes des autres ou réalisées à partir d'un tissu différent, la détection de substances co-extraites qui peuvent diminuer l'efficacité de la réaction d'amplification (tel que l'hème de l'hémoglobine (Akane, Matsubara et al. 1994)) et la mise en place des mêmes précautions pour éviter toute contamination des échantillons avec de l'ADN exogène non dégradé (cf II.4) .

## **II Matériel et Méthodes**





## II.1 Matériel biologique

Etant donné que les échantillons FFIP et congelés des cas de mort subite inclus dans notre population d'étude représentent une source limitée et non renouvelable d'ADN endogène, nous avons utilisé des « échantillons tests » afin d'effectuer l'étape de validation d'une méthode d'extraction-purification d'ADN adaptée aux prélèvements FFIP.

### II.1.1 Echantillons tests

Nous avons constitué une série de 11 échantillons FFIP de cœur et 11 échantillons FFIP de foie provenant de 11 individus dont l'autopsie avait été réalisée à l'Institut de Médecine Légale de Strasbourg. Ces échantillons tests devaient répondre à des critères d'inclusion bien précis afin de limiter les paramètres impliqués dans la dégradation de l'ADN (délai post-mortem, temps de fixation dans le formaldéhyde, pH de la solution de formaldéhyde, taille du fragment tissulaire) et afin de retrouver les conditions habituelles de recueil et de conservation des prélèvements tissulaires effectués au cours des investigations médico-légales.

Ces critères d'inclusion étaient les suivants :

- le délai entre le décès et la réalisation du prélèvement tissulaire au cours de l'autopsie devait être égal ou inférieur à 72 heures afin de limiter le processus de dégradation post-mortem de l'ADN et afin de respecter le délai moyen qui peut s'écouler entre la constatation d'un décès et la programmation d'une autopsie médico-légale ;
- l'échantillon de tissu frais prélevé devait avoir la forme approximative d'un carré de 1,5 cm de côté et de 0,3 cm d'épaisseur afin de permettre une fixation uniforme de la pièce tissulaire par le formaldéhyde ;
- la fixation devait se faire dans une solution de formaldéhyde tamponnée de 10 % correspondant au fixateur le plus fréquemment utilisé en France pour la conservation des tissus prélevés au cours des autopsies médico-légales en vue d'éventuelles analyses anatomopathologiques ;
- le temps de fixation de la pièce tissulaire dans le formaldéhyde avant inclusion en paraffine devait être d'environ trente jours. Ce délai de trente jours correspond au temps moyen d'immersion de la pièce tissulaire dans le formaldéhyde avant l'émission de la réquisition par le Parquet ordonnant la brisée des scellés qui avaient été constitués au moment du temps autopsique. Ce n'est qu'à la réception de cette

réquisition que le médecin désigné peut briser les scellés et procéder aux analyses anatomopathologiques.

## II.1.2 Population d'étude

### II.1.2.1 Critères d'inclusion

En se basant sur les recommandations de *l'Association for European Cardiovascular Pathology* (Basso, Burke et al. 2008), nous avons mis au point un protocole de prélèvements à appliquer de manière systématique pour chaque individu âgé entre 0 et 35 ans dont la cause de la mort restait inexplicée au terme de l'autopsie réalisée à l'Institut de Médecine légale de Strasbourg.

Ce protocole comportait les éléments suivants :

- les prélèvements réalisés de manière systématique dans toute autopsie médico-légale en vue d'analyses toxicologiques (sang cardiaque, sang périphérique, urine, bile, contenu gastrique), en vue d'analyses anatomopathologiques (fragments de divers organes) et en vue d'analyses virologiques et bactériologiques en suivant notamment pour les cas de mort subite chez l'enfant de moins de 2 ans le protocole de prélèvements du Dr Caroline Rambaud (Rambaud and Imbert 1993) repris dans les recommandations de la Haute Autorité de Santé en 2007 (HAS 2007) ;
- le recueil d'informations concernant :
  - les circonstances du décès : décès survenu au repos, durant le sommeil, durant un exercice physique, lors d'un stress émotionnel ;
  - les antécédents familiaux : mort subite inexplicée, trouble du rythme ;
  - les antécédents personnels : syncope, palpitations, arythmie cardiaque, épilepsie ;
  - le traitement médicamenteux ;
  - pour les nourrissons et les enfants : le déroulement et le suivi de la grossesse et de l'accouchement, les modalités de garde, les modalités d'allaitement et d'alimentation, les habitudes de sommeil, les pathologies survenues dans la période néonatale et durant les premiers mois, la notion de contagie infectieux ;
- la réalisation de prélèvements en vue d'analyses génétiques à savoir : des fragments (5g) de tissus frais cardiaque prélevés au niveau du ventricule gauche, du ventricule

droit et du septum et un fragment de tissu hépatique. Ces fragments tissulaires devaient être placés dans des cryotubes et conservés dans l'azote liquide à - 196°C. Les prélèvements cardiaques ont été réalisés au niveau des ventricules et du septum en vue d'éventuelles investigations virologiques ciblées en cas de découverte microscopique d'une myocardite. Le prélèvement de foie a été réalisé afin de pouvoir dupliquer les extractions à partir d'un tissu différent provenant d'un même individu et de contrôler ainsi la fiabilité de nos résultats. Les prélèvements tissulaires ont été privilégiés au recueil de sang à partir duquel l'extraction d'ADN est pourtant plus aisée, afin de disposer d'un matériel à partir duquel l'extraction d'ARN messager tissu spécifique pouvait être envisagée dans des travaux futurs ;

- après avoir réalisé l'examen externe du cœur au cours de l'autopsie (ouverture des quatre cavités, dissection transversale des coronaires, mensurations) et après avoir prélevé les fragments cardiaques destinés aux éventuelles analyses génétiques, le cœur en entier devait être placé dans une solution de formaldéhyde tamponnée. L'examen anatomopathologique du cœur était réalisé par un médecin anatomopathologiste expérimenté selon les recommandations de *l'Association for European Cardiovascular Pathology* (Basso, Burke et al. 2008).

Au terme de ces prélèvements, nous attendions les résultats des analyses toxicologiques et anatomopathologiques voire virologiques et bactériologiques, avant d'entreprendre toutes investigations génétiques. Ces dernières étaient uniquement effectuées chez les individus répondant aux critères d'inclusion suivants :

- un âge compris entre 0 et 35 ans ;
- l'absence de malformation organique et de cause évidente de décès observées au cours de l'autopsie ;
- l'absence d'anomalie macroscopique et microscopique au niveau du cœur ;
- des investigations virologiques et bactériologiques négatives ;
- des analyses toxicologiques dont les résultats ne retrouvaient pas d'intoxication aigue médicamenteuse et/ou par stupéfiants pouvant expliquer le décès.

Au sein de la population d'étude, les investigations génétiques ont été réalisées dans le cadre de notre mission définie par le Parquet à savoir « *Procéder à tous prélèvements utiles à la*

*manifestation de la vérité et à l'enquête en vue d'expertise ultérieure ; Etablir les circonstances et les causes de la mort de l'intéressé ».*

Afin d'élargir notre recrutement, le protocole de prélèvements et les critères d'inclusion ont été diffusés auprès du Service Médico-légal allemand de Bonn dirigé par le Professeur Bernhardt Madea et auprès de l'Institut Médico-légal de Reims dirigé par le Professeur Paul Fornès.

### **II.1.2.2 Caractéristiques de la population d'étude**

Au total, entre les années 2008 et 2010, 8 cas de mort subite inexpliquée ont été inclus dans notre population d'étude initiale à partir de laquelle a été réalisée l'optimisation de la technique HRM sur le gène KCNQ1. Puis l'inclusion de 4 nouveaux cas en 2011 a permis d'atteindre un nombre final de 12 cas de mort subite inexpliquée au niveau desquels nous avons évalué une nouvelle approche de génotypage par la technologie iPLEX Gold de Sequenom sur le gène RyR2. Les caractéristiques des 12 cas inclus dans la population d'étude ainsi que les circonstances du décès sont présentées dans le tableau 7. La durée de fixation des organes dans le formaldéhyde a également été renseignée car il s'agit d'un facteur pouvant influencer la qualité de l'ADN extrait et devant par conséquent être pris en compte lors de l'interprétation des résultats.

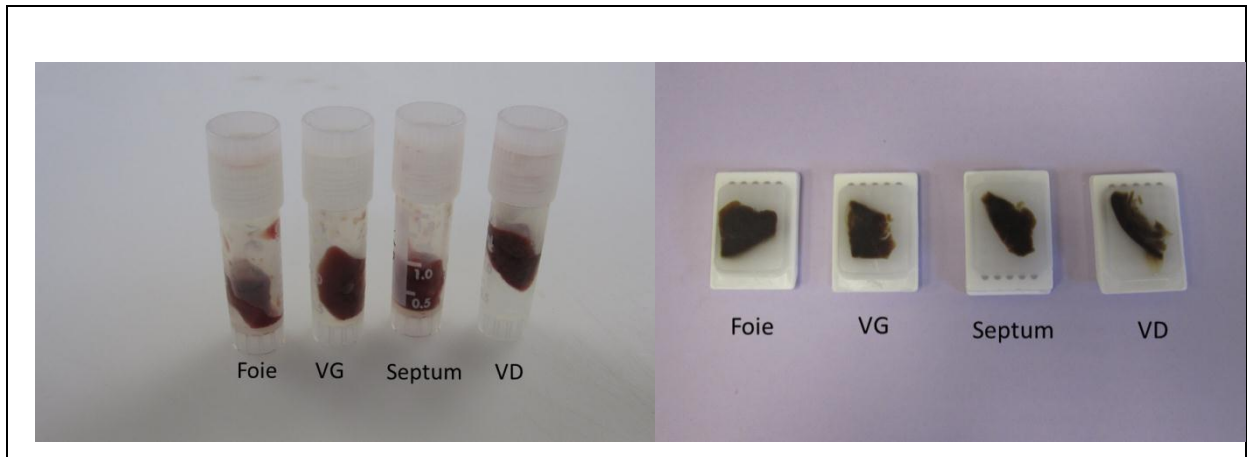
**Tableau 7 Caractéristiques des cas de mort subite inexpliquée inclus de 2008 à 2011**

	Cas	sexe	age	Temps de fixation dans le formaldéhyde (jours)	Circonstances du décès
<b>2008-2010</b>	1	F	4 m	17	Découvert en décubitus dorsal dans son lit
	2	M	20 a	7	Découvert dans sa salle de bain
	3	M	2 m	11	Découvert en décubitus ventral dans son lit
	4	F	3 a	16	Durant son sommeil. s'était endormi dans les bras de sa mère au cours de la tété
	5	M	20 a	4	Durant une activité physique (salle de sport)
	6	F	16 a	11	Sensation de palpitations suivie d'une syncope
	7	F	8 j	16	Au cours du sommeil
	8	M	3 m	6	Au cours du sommeil
<b>2011</b>	9	F	3a	20	Au cours du sommeil
	10	M	2a	22	Au cours d'une hospitalisation suite à des vomissements évoluant depuis 48h sans signe de déshydratation. ni fièvre. ni syndrome méningé
	11	F	6m	10	Au cours du sommeil
	12	M	7 m	7	Découvert en décubitus ventral dans son lit

a ans; m mois; j jours

La population d'étude présente un sexe ratio égal à 1 (6 individus de sexe masculin et 6 individus de sexe féminin). La moyenne d'âge est de 5,48 ans avec des extrêmes de 8 jours à 20 ans.

Ainsi, pour chaque cas inclu dans la population d'étude nous disposions d'échantillons cardiaques (ventricule gauche, septum, ventricule droit) et hépatiques conservés soit par congélation dans l'azote liquide soit sous forme FFIP (Figure 6).



**Figure 6 Cryotubes et blocs de paraffine contenant les prélèvements tissulaires (cardiaques et hépatiques) d'un cas inclus dans la population d'étude**

Aucun cas provenant des instituts médico-légaux de Bonn ou de Reims n'a été inclus dans la population d'étude.

### II.1.2.3 Cas contrôles

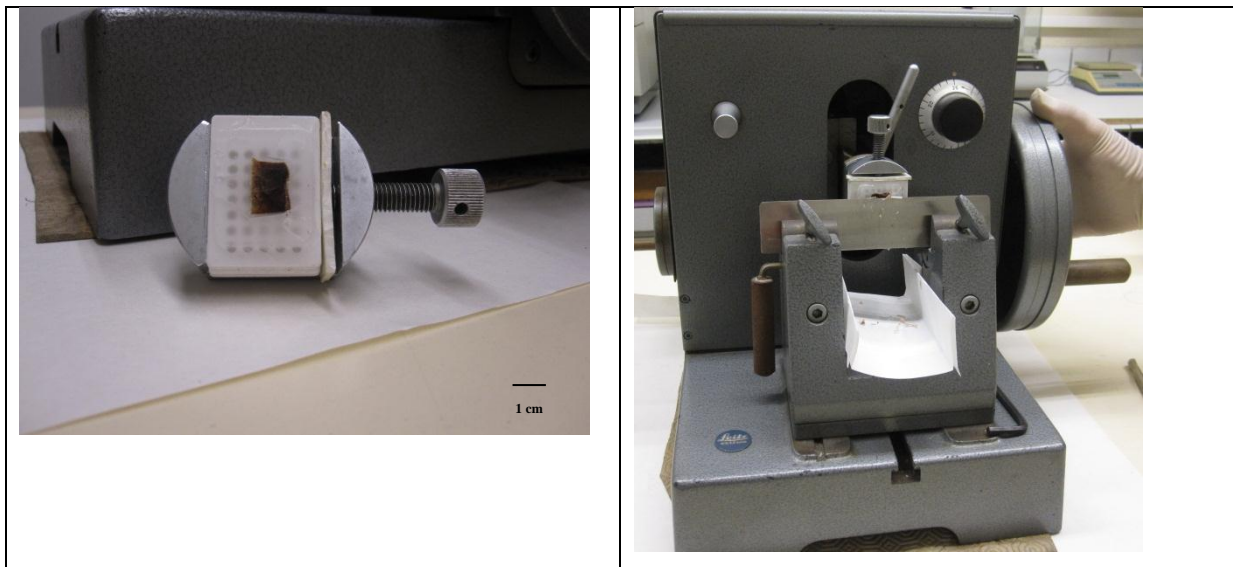
Nous avons également inclus dans la population d'étude quatre témoins négatifs européens chez lesquels nous avons effectué des prélèvements de cellules buccales sur cytobrosses, et un témoin positif porteur de la mutation V4299M (NC\_000001.9) sur le gène RyR2 présentant un phénotype de SQTl dont l'extrait d'ADN nous a été adressé par Silke Kaufenstein de l'Institut de Médecine légale de Frankfurt, en Allemagne (Kaufenstein, Kiehne et al. 2011). Conformément à la législation française, le consentement éclairé de ces 5 individus a été recueilli par écrit préalablement à la réalisation des prélèvements.

## II.2 Extraction et quantification de l'ADN

### II.2.1 Etape préliminaire à l'extraction des prélèvements FFIP

L'étape d'extraction à partir de prélèvements FFIP est précédée d'une étape de coupe puis de déparaffinage et de réhydratation.

A partir des blocs de paraffine contenant la pièce tissulaire prélevée (cœur ou foie), des coupes épaisses (environ 50 micron) ont été réalisées au microtome (Figure 7).



**Figure 7 Présentation d'une pièce cardiaque inclus au sein d'un bloc de paraffine et découpe de ce bloc au microtome.**

Afin de s'assurer qu'une quantité quasi équivalente de tissu était prélevée pour chaque échantillon, les coupes ont été pesées à l'aide d'une balance de précision puis conservées dans un tube eppendorf de 1,5ml. Le poids des coupes variaient de 31 à 67 mg.

Cette étape de coupe était suivie de l'étape de déparaffinage et de réhydratation qui est basée sur des bains successifs de solvant tel que le xylène (Goelz, Hamilton et al. 1985) et des bains d'alcool de concentration décroissante (Goelz, Hamilton et al. 1985, Carturan, Tester et al. 2008).



Le protocole que nous avons appliqué associait deux incubations dans 1ml de xylène pendant 10 minutes à température ambiante suivis de bains successifs de 5 minutes chacun dans des solutions d'alcool de titre décroissant (100 %, 95 %, 70 %) puis deux lavages à l'eau bidistillée stérile. L'étape de réhydratation finale a été effectuée selon le protocole décrit par Coura et al. (Coura, Prolla et al. 2005) à savoir une incubation dans un tampon Tris/EDTA (Tris 100mM, pH7,5, EDTA 5mM) pendant 5 minutes à température ambiante puis dans un tampon Tris (100mM, ph 7,5) à 55°C avec un changement de bain toutes les 5 heures. Afin de limiter la perte de matériel, une centrifugation était réalisée (5 minutes, 13 500 rpm) avant chaque changement de solution.

L'étape de déparaffinage figurait dans les protocoles des principaux kits commerciaux d'extraction dédiés aux prélèvements FFIP. Pourtant, son intérêt était controversé selon les études. Si certains auteurs (Stanta and Schneider 1991) considéraient cette étape comme nécessaire afin d'éliminer un inhibiteur potentiel de la PCR, Gilbert et al. (Gilbert, Haselkorn et al. 2007) ont décrit que le déparaffinage n'apportait aucun bénéfice quant à la quantité totale d'ADN extrait et quant au rendement de l'amplification. Nous avons donc évalué pour deux échantillons une extraction sans étape de déparaffinage et nous sommes arrivés aux mêmes conclusions que Gilbert et al (Gilbert, Haselkorn et al. 2007). Par conséquent, nous avons éliminé l'étape de déparaffinage par le xylène pour le traitement des échantillons FFIP recueillis à partir de l'année 2010. Cela permettait certes de simplifier la procédure d'extraction, mais également de réduire les risques inhérents à l'inhalation de ce solvant considéré selon la fiche toxicologique de l'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS) comme potentiellement irritatif pour la peau, les yeux et les voies respiratoires avec une toxicité rapportée au niveau du système nerveux central à type notamment d'asthénie et de céphalées (INRS 2009).

## **II.2.2 Extraction à partir des prélèvements FFIP**

### **II.2.2.1 Approche méthodologique**

Au cours de ce travail, différentes techniques d'extraction ont été testées à partir des « échantillons tests » puis la technique présentant le meilleur rendement a été conservée pour le traitement des cas de mort subite inexplicée inclus dans notre population d'étude.

La première méthode (protocole A) était basée sur un protocole publié en 2005 (Keyser-Tracqui and Ludes 2005) développé initialement pour extraire de l'ADN à partir de poudre

d'ossements anciens en émettant l'hypothèse qu'un protocole adapté à l'ADN ancien pouvait également l'être à l'ADN extrait de prélèvements FFIP compte tenu de leurs caractéristiques communes quant aux processus de dégradation de l'ADN. Ce protocole consistait en l'association d'une extraction organique classique au phénol/chloroforme/acide isoamylique (25/24/1;v/v/v) suivi d'une purification basée sur la capacité des molécules d'ADN à se lier à une résine de silice du kit commercial Clean-Mix<sup>TM</sup> (Talent) en présence de certains sels et d'un pH adapté.

La seconde méthode d'extraction (protocole B) consistait en l'utilisation unique du kit commercial QIAamp DNA mini® (Qiagen). Ce kit avait retenu notre attention car il avait été utilisé avec succès lors des premières études post-mortem menées à partir de prélèvements FFIP (Ackerman, Tester et al. 2001). De plus, le kit QIAamp DNA mini® (Qiagen) avait été décrit, comparativement à d'autres kits commerciaux, comme un kit performant adapté aux prélèvements FFIP (Carturan, Tester et al. 2008). Ce kit est fondé sur l'association d'une étape de déprotéinisation par la protéinase K (une endopeptidase capable de digérer les protéines) et d'une purification sur une matrice de silice (membrane de silicagel, QIamp Spin Colum®). De façon concrète, après la phase de digestion par la protéinase K (toute la nuit à 55°C), la solution d'ADN est mélangée à un tampon de liaison contenant les agents chaotropiques nécessaires et le tout est déposé sur une colonne comprenant un filtre de silice. Seules les molécules d'ADN se fixent alors sur la colonne et tous les autres éléments du lysat de départ sont éliminés par des lavages successifs. L'ADN est ensuite élué dans 100 µL d'eau bi-distillée stérile.

Le troisième protocole (protocole C) consistait en l'association d'une extraction organique classique au phénol/chloroforme/alcool isoamylique et du kit commercial QIAamp DNA mini® (Qiagen). Comparativement au deuxième protocole, après la phase de digestion par la protéinase K, une extraction organique par l'addition volume à volume d'un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique a été ajoutée. La phase aqueuse a été récupérée après centrifugation puis l'ADN a été purifié sur les colonnes de silice du kit QIAamp DNA mini® (Qiagen) selon les recommandations du fabricant.

### **II.2.2.2 Protocoles**

Les trois protocoles testés comportent tous trois grandes étapes successives : la destruction des tissus et des membranes cellulaires, l'élimination des protéines et des peptides et la purification de l'ADN. Les particularités de chaque protocole sont détaillées sur la figure 8.

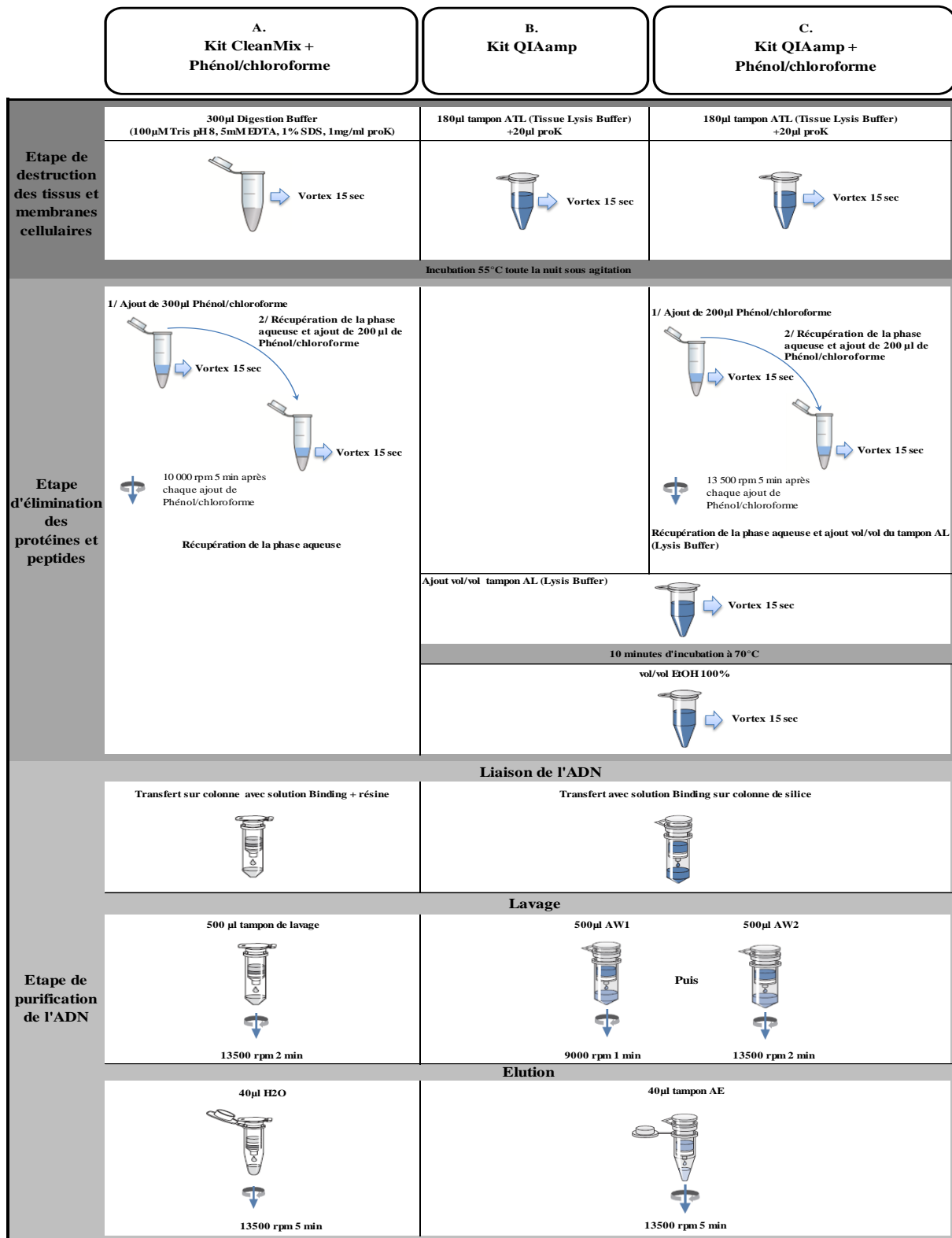


Figure 8 Présentation des différentes étapes des trois protocoles d'extraction-purification testées au cours de ce travail

### **II.2.3 Extraction à partir des prélèvements congelés**

A partir des pièces tissulaires prélevées lors de l'autopsie et conservées dans l'azote liquide, des fragments tissulaires de ventricule gauche et de foie d'environ 25 mg ont été découpés à l'aide d'une lame de scalpel stérile pour chaque individu inclus dans la population d'étude. L'extraction d'ADN à partir de ces prélèvements a été effectuée au moyen du kit QIAamp DNA Mini® (Qiagen) en suivant les instructions du fabricant.

### **II.2.4 Extraction à partir des cytobrosses**

L'ADN des témoins négatifs a été extrait à partir de cellules buccales recueillies sur des cytobrosses à l'aide du kit QIAamp DNA Mini® (Qiagen) en suivant les instructions du fabricant.

Tous les extraits d'ADN provenant de prélèvements FFIP, congelés ou des cytobrosses ont été conservés à -20°C pour une meilleure conservation de l'ADN au cours du temps.

### **II.2.5 Quantification de l'ADN extrait**

La quantité d'ADN pouvant varier considérablement d'une méthode d'extraction à une autre, d'un échantillon à un autre et d'un substrat à l'autre, nous avons quantifié l'ADN dans tous les extraits d'ADN provenant des échantillons tests, des échantillons provenant des cas de mort subite inexplicée inclus dans notre population d'étude et des cas témoins. La quantification réalisée sur les échantillons tests à l'aide de la quantification par PCR en temps réel avait pour objectif de valider une méthode d'extraction. Pour les échantillons provenant des cas de mort subite inexplicée et les cas témoins, le but de la quantification, réalisée par spectrophotométrie, était de pouvoir adapter les réactions.

#### **II.2.5.1 Quantification de l'ADN par PCR en temps réel**

Les extraits d'ADN provenant des échantillons tests ont été quantifiés grâce à une méthode de PCR en temps réel utilisant le kit Quantifiler™ Human DNA Quantification (Applied Biosystems) avec le système de détection ABI prism 7000 (Applied Biosystem) selon les

recommandations du fabricant. Ce kit permet d'estimer la concentration d'ADN extraite en monitorant l'amplification *in vitro* d'un petit fragment d'ADN cible (62pb) localisé sur le génome nucléaire et en le comparant à des profils d'amplification d'une gamme de dilutions de concentration en ADN connue. L'intérêt de cette technique d'amplification était certes d'estimer la quantité d'ADN humain présent dans un extrait d'ADN donné mais également de détecter la présence d'inhibiteurs de la réaction d'amplification. En effet, la réaction d'amplification par PCR est une réaction multiplexe qui permet d'amplifier la séquence cible humaine mais également une séquence d'ADN cible synthétique qui sert de contrôle interne de réaction (IPC pour *Internal Positive Control*). La cinétique d'amplification de l'IPC est connue dans un milieu exempt d'inhibiteurs et par conséquent une variation de cette cinétique peut être imputée à la présence d'inhibiteurs.

### **II.2.5.2 Quantification de l'ADN par spectrophotométrie**

La quantification des échantillons congelés et formolés des cas de mort subite inexplicée a été réalisée par le spectrophotomètre NanoDrop<sup>TM</sup> 8000 (Thermo Scientific). Cet appareil permet à partir d'un volume de 1 µl de mesurer la concentration en ADN génomique double brin en réalisant une mesure de l'absorbance à la longueur d'onde 260 nm (zone d'absorbance maximale des acides nucléiques). La gamme de mesure de cet appareil s'étendant de 2 à 3700 ng/µl, cet outil était adapté à la quantification des échantillons des cas de mort subite, quel que soit le mode de conservation des échantillons, compte tenu des concentrations d'ADN quantifiées à partir des échantillons tests (présentés dans la section Résultats). Le spectrophotomètre NanoDrop<sup>TM</sup> 8000 présentait comme principaux intérêts d'être plus rapide (moins de 20s pour un échantillon donné), plus simple d'utilisation et plus économique que la PCR en temps réel utilisant le kit Quantifiler<sup>TM</sup> Human DNA Quantification (Applied Biosystems). Le spectromètre permettait à la fois de quantifier l'ADN afin d'optimiser les réactions d'analyses génétiques mais également de contrôler la pureté de l'extraction en réalisant une seconde mesure à 280 nm (zone d'absorbance maximale des protéines). Ainsi, une solution d'ADN est considérée comme purifiée lorsque le rapport des absorbances à 260 nm et à 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) se situe aux environs de 1,8. Un ratio nettement inférieur à 1,8 indique la présence résiduelle probable de protéines, de phénol ou d'autres contaminants dont la zone d'absorbance maximale se situe aux environs de 280 nm. Une troisième mesure de l'absorbance à 230 nm fournit également une indication sur le degré de pureté de l'extraction. Pour une solution d'ADN purifiée la valeur du ratio  $A_{260}/A_{230}$  est comprise entre 1,8 et 2,2. Un ratio inférieur à 1,8 indique la présence probable de contaminants co-purifiés tels que des

composés aromatiques (Thermo scientific-NanoDrop 8000. Spectrophotometer v2.1 User's manual).

Grâce à cette étape de quantification, les échantillons d'ADN obtenus à partir des prélèvements de ventricule gauche et de foie, congelés et FFIP, ont pu être dilués à 15ng/μL et 10ng/ μL afin d'utiliser la même quantité d'ADN de départ pour tous les échantillons lors des étapes de développement et d'optimisation respectivement des réactions HRM sur le gène KCNQ1 et de génotypage des SNPs d'intérêts sur le gène RyR2.

## **II.2.6 Analyses statistiques**

A partir des résultats de la quantification par PCR en temps réel effectuée à partir de l'ADN extrait des échantillons tests par les trois protocoles différents, nous avons calculé les quantités d'ADN extrait à partir de 100mg de tissu (μg/100mg de tissu) et avons soumis ces données quantitatives à une analyse statistique. Compte tenu du plan de l'expérience à savoir la réalisation de mesures répétées (quantité d'ADN) avec deux facteurs répétées (substrat cardiaque ou hépatique) une analyse de variance à données répétées avec deux facteurs intra-sujet (correspondant aux deux types de substrats) et sans aucun facteur inter-sujet a été réalisée avec le logiciel de traitement des données épidémiologiques SPSS pour Windows. Une différence était considérée comme statistiquement significative lorsque la probabilité (p) était inférieure à 0,05.

## II.3 Analyses génétiques menées

### II.3.1 Choix des gènes d'intérêt

Lorsque ce travail de thèse a débuté en 2008, 14 gènes (contre une vingtaine actuellement) étaient connus pour être impliqués dans les canalopathies cardiaques congénitales.

Les études menées sur des grandes cohortes de patients symptomatiques et les membres de leurs familles retrouvaient que 70-75 % des patients atteints de SQTl étaient porteurs de mutation sur l'un des trois gènes KCNQ1 (30 à 45 %), KCNH2 (25 à 30 %) et SCN5A (5 à 10 %) alors qu'approximativement 60 % des patients atteints de TVPC étaient porteurs de mutation sur le gène RyR2 et approximativement 25 % des cas atteints de SBr étaient porteurs de mutations sur le gène SCN5A. Il est également important de souligner que plus de 95% des mutations impliquées dans les canalopathies cardiaques étaient transmises selon un mode autosomique dominant.

L'une des plus grandes séries post mortem publiée en 2008 portant sur 49 cas de mort subite inexplicée survenant chez l'adulte jeune (1-43 ans) (Tester, Spoon et al. 2004, Tester and Ackerman 2007), retrouvait dans 35 % des cas une mutation sur l'un des quatre gènes explorés dont 14 % sur le gène RYR2, 10 % sur le gène KCNQ1, 6 % sur le gène KCNH2 et 4 % sur le gène SCN5A.

Au vu de ces données, nous avons décidé d'axer nos premières investigations sur les deux gènes étant les plus fréquemment le siège de mutations à la fois au sein des cohortes de patients et apparentés et au sein des cohortes de mort subite inexplicée à savoir les gènes KCNQ1 et RyR2.

#### II.3.1.1 Le gène KCNQ1

Le gène KCNQ1 couvrant 404kb sur le locus 11p15.5 est fortement exprimé dans le cœur. Il code pour une protéine de 676 acides aminés qui en s'associant avec la protéine codée par le gène KCNE1 forment un canal potassique cardiaque contrôlant le courant  $I_{Ks}$  (protéine composée). En 2008, plus de 250 mutations avaient été répertoriées sur le gène KCNQ1 (Morita, Wu et al. 2008). La majorité d'entre elles étaient des substitutions d'une seule base (80 %) et les 20 % restant étaient essentiellement des insertions et des délétions de petite taille avec décalage du cadre de lecture.

### **II.3.1.2 Le gène RyR2**

Le gène RyR2 est l'un des gènes les plus grands parmi l'ensemble des gènes cardiaques. Situé sur le locus 1q42.1-q43, il couvre 14901 kb et se compose de 105 exons dont la taille varie de 36pb à 1298pb. Il s'exprime exclusivement au niveau du cœur et code pour une protéine-canal, le récepteur à la ryanodine, situé dans le réticulum endoplasmique responsable du relargage du calcium intra-cellulaire. Lorsque nous avons entrepris nos investigations sur ce gène, Medeiros et al. (Medeiros-Domingo, Bhuiyan et al. 2009) avaient répertorié plus de 140 variants alléliques pathologiques et non pathologiques (polymorphismes) qui étaient pour la majorité d'entre eux des substitutions simple base.

## **II.3.2 Détection de variants génétiques sur le gène KCNQ1 par la technologie HRM**

### **II.3.2.1 Approche méthodologique**

Compte tenu du nombre de gènes potentiellement impliqués dans les canalopathies et du nombre de variants (mutations et polymorphismes) répertoriés sur ces gènes, nous avons cherché à mettre en place une stratégie expérimentale permettant de cribler les variants connus ou non connus sur les gènes d'intérêt, en débutant nos investigations sur le gène KCNQ1, afin de cibler le séquençage et de réduire ainsi le coût et le temps des analyses. Parmi les différentes techniques de criblage décrites dans la littérature (polymorphisme de conformation simple brin, SSCP, ou chromatographie liquide dénaturante haute performance, DHPLC), nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la technique d'analyse des courbes de fusion haute résolution ou technique HRM. Cette technique permet, après une PCR réalisée en présence d'un fluorochrome intercalant, de discriminer lors d'une montée progressive en température des variations d'une seule base selon le profil de dénaturation de l'ADN (courbe de fusion). La technique HRM était décrite dans la littérature comme une technique sensible, fiable, rapide. Lorsque nous avons débuté ce travail de thèse, cette technique était essentiellement utilisée dans le domaine de la cancérologie et avait été développée dans certaines études à partir de substrats FFIP (Krypuy, Ahmed et al. 2007, Do, Krypuy et al. 2008, Do, Solomon et al. 2008). Par la suite, une seule étude décrivait son application sur un des gènes impliqués dans les canalopathies, le gène SCN5A, chez des patients et chez 4 cas de mort subite inattendue du nourrisson (Millat, Chanavat et al. 2009).



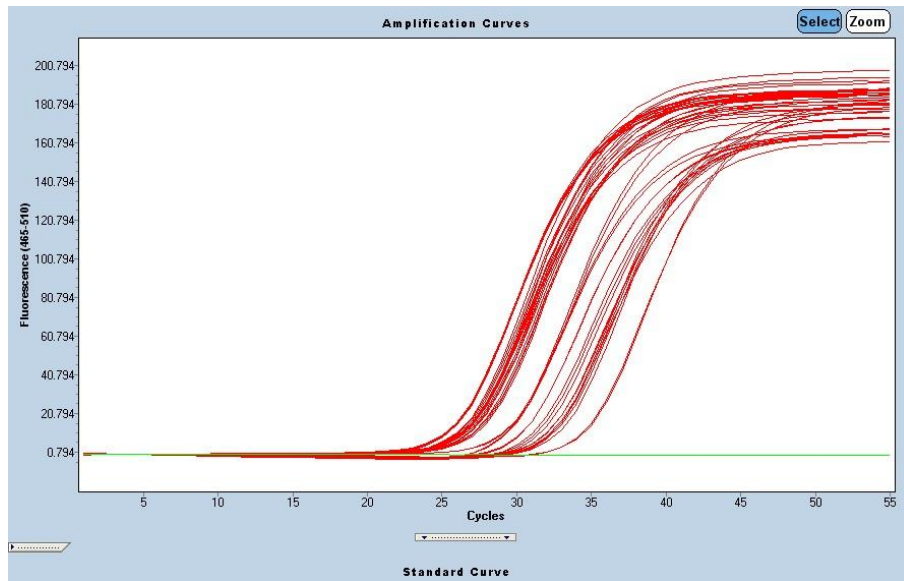
Enfin, grâce à une collaboration étroite de notre équipe d'accueil avec le laboratoire de diagnostic génétique des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS) dirigé par le Professeur Jean Louis Mandel, nous avons pu avoir accès à la technique HRM sur une plateforme de PCR en temps réel (Light cycler 480, Roche).

### II.3.2.2 Principe général

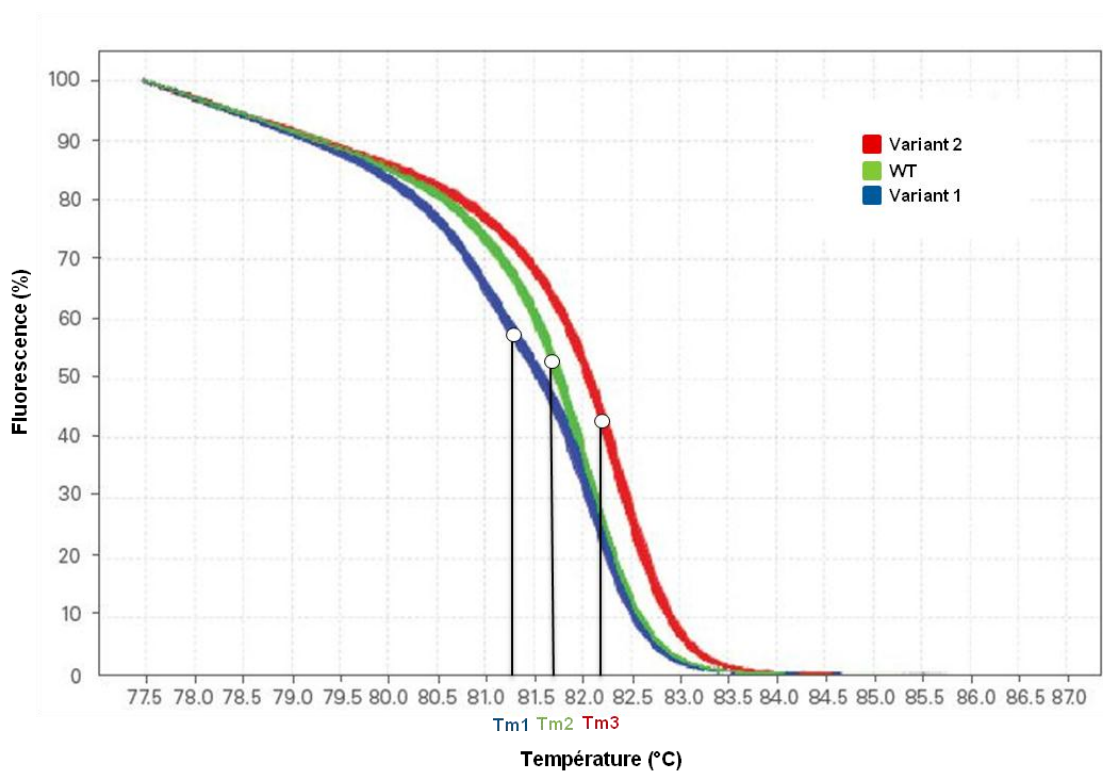
La technique HRM réalisée sur une plateforme de PCR en temps réel se compose de trois étapes : (i) une PCR en temps réel en présence d'un fluorochrome intercalant, (ii) une dénaturation des produits amplifiés avec un enregistrement de la cinétique de décroissance de la fluorescence et enfin (iii) l'analyse des courbes de fusion obtenues.

**La PCR en temps réel** est réalisée avec une polymérase « *hot start* » (qui agit à une certaine gamme de température) en présence d'un fluorochrome intercalant dont la fluorescence est émise lorsqu'il est fixé entre les paires de bases de l'ADN double brin. L'agent intercalant utilisé doit répondre à plusieurs critères à savoir émettre de forts signaux de fluorescence lorsqu'il est fixé à l'ADN double brin, ne pas inhiber l'activité enzymatique de la polymérase et pouvoir être utilisé en condition saturante afin d'éviter le phénomène de redistribution à l'origine d'une fluorescence non linéaire à la courbe de dénaturation des brins d'ADN. La PCR est considérée comme efficace lorsque l'ensemble des courbes d'amplification atteignent la phase plateau correspondant à une fluorescence proche de 100 % et lorsque le cycle seuil ou *crossing point* (Cp) est inférieur à 30 (Figure 9). Le cycle seuil correspond au nombre de cycles à partir duquel la phase exponentielle de la PCR débute. Le Cp est inversement proportionnel à la quantité initiale d'ADN dans le milieu soumis à l'amplification.

La PCR est suivie d'**une étape de dénaturation** comportant trois phases : une dénaturation à 95°C afin de séparer les amplicons bicaténaires suivie d'une phase d'hybridation à 40°C pour permettre leur appariements aléatoires et enfin la phase de fusion analytique correspondant à une montée très progressive de la température qui va dénaturer peu à peu l'ADN double brin des produits PCR amplifiés ce qui provoque le relargage du fluorochrome et par conséquent une baisse de la fluorescence émise jusqu'à son extinction lors de la dénaturation complète tel que cela est présenté dans la figure 10.



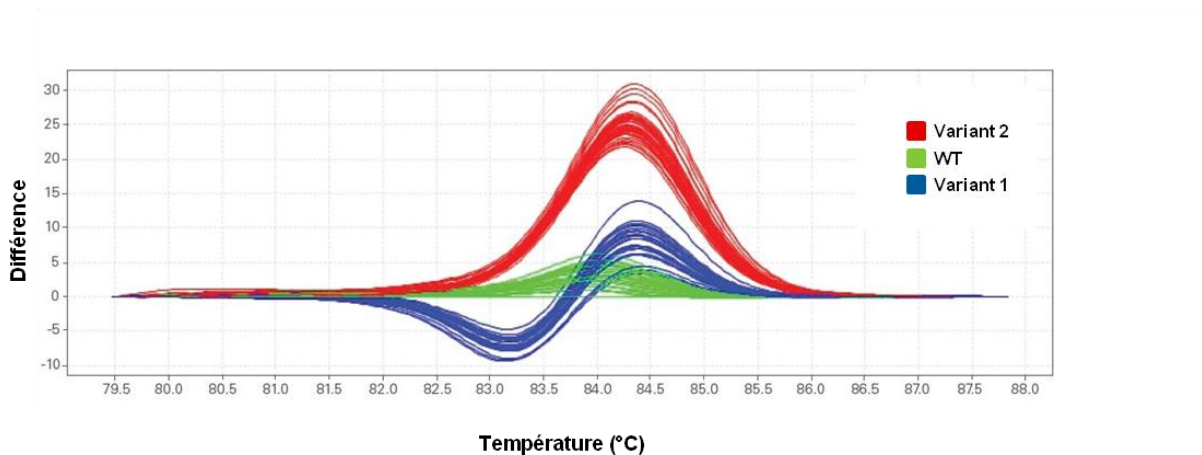
**Figure 9** Cinétique d'amplification : Augmentation progressive de la fluorescence jusqu'à une phase plateau en fonction du nombre de cycles



**Figure 10** Décroissance de la fluorescence en pourcentage en fonction de l'augmentation progressive de la température. D'après Roche Applied Science (<https://www.roche-applied-science.com>).

La cinétique de décroissance de la fluorescence correspond aux courbes de fusion. Les trois courbes de la figure 10 présentent une forme différente avec un point d'inflexion qui se situe à des températures différentes ( $T_{m1}$ ,  $T_{m2}$  et  $T_{m3}$ ). La température de fusion ( $T_m$  ou *melting temperature*) correspond au point d'inflexion de la courbe de fusion et représente la température à laquelle 50 % de l'ADN est passé sous forme simple brin. Le  $T_m$  d'un produit PCR dépend de la concentration en sels du milieu, de la concentration du produit PCR et surtout de la taille et de la composition en bases azotées du produit PCR. Par conséquent, pour un couple d'amorces donné, avec une montée en température donnée et des conditions PCR uniformes entre les différents échantillons (concentration en sels, concentration en ADN initiale ajustée) une variation d'une seule base entrainera une modification du  $T_m$  et de la forme de la courbe de fusion.

**L'analyse des courbes de fusion** est réalisée grâce à un logiciel dédié. Une analyse des courbes d'amplification permet d'attester de l'efficacité de la PCR. Après une étape de normalisation des courbes afin de réduire la dispersion entre les échantillons d'un même groupe, le logiciel calcule et analyse le différentiel de fluorescence des courbes normalisées par rapport à une courbe de référence (typiquement celle d'un échantillon sauvage) permettant un regroupement des échantillons en clusters tel que cela est présenté dans la figure ci-dessous.



**Figure 11 Différence des fluorescences en fonction d'une courbe de référence correspondant à la courbe d'un échantillon sauvage**

Identification de trois clusters : sauvage (wt), variant 1, variant 2. *D'après Roche Applied Science (<https://www.rocke-applied-science.com>)*

### II.3.2.3 Protocole

#### II.3.2.3.1 Conception et validation des amorces

Le choix des amorces conditionne l'efficacité de la PCR et la sensibilité de la détection de variant par la technique HRM. En effet, la présence de produits d'amplification aspécifiques ou de dimères d'amorces peut entraîner des interférences dans l'émission de fluorescence.

Nous avons conçu chaque couple d'amorces en suivant 6 étapes différentes.

1. Les séquences nucléiques comprenant les 16 exons d'intérêt du gène KCNQ1 ainsi que 100pb en amont et en aval ont été retranscrites à partir de la base de données des séquences nucléiques, Genbank, en utilisant le logiciel d'alignement des séquences nucléiques nBLAST. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
2. A partir de ces séquences, les régions qui correspondent à des répétitions connues et les régions de faible complexité ont été masquées grâce au logiciel RepeatMasker pour éviter que des amorces soient dessinées dans ces régions (<http://www.repeatmasker.org/>).
3. Puis, les couples d'amorces permettant d'amplifier les séquences d'intérêt ont été conçus grâce au logiciel Primer3. Seuls les couples d'amorces générant des amplicons de taille comprise entre 100 et 300 pb ont été conservés afin que les produits d'amplification ne contiennent qu'un seul domaine de fusion et que même les fragments d'ADN très dégradés puissent être amplifiés. Compte tenu de la taille de l'exon 1 (384 pb), ce dernier a été amplifié à l'aide de trois couples d'amorces se chevauchant.
4. La spécificité des amorces choisies a été testée en comparant la séquence de chaque amorce à la base de données GenBank grâce au logiciel nBLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).
5. Le programme AutoDimer a finalement été utilisé pour vérifier que les amorces choisies ne formaient pas de structures secondaires telles que des dimères d'amorces ou des épingles à cheveux.
6. Le fabricant recommandant l'utilisation d'amorces purifiées par HPLC, nous avons comparé, pour deux exons donnés, le retentissement sur la sensibilité de détection selon l'utilisation d'amorces purifiées ou non purifiées. Aucune différence n'ayant été observée, seules des amorces non purifiées ont été utilisées afin de réduire le coût des analyses.

La validation des couples d'amorces a consisté en l'amplification de l'ADN extrait des témoins négatifs avec migration électrophorétique sur gel d'agarose puis séquençage des amplicons pour vérifier leur spécificité.

Au total, 18 couples d'amorces (soit trois couples d'amorces pour l'exon 1 et un couple d'amorces pour chacun des 15 autres exons) ont été conservés et sont présentés dans le tableau joint en annexe 1.

#### **II.3.2.3.2 Optimisation des conditions de la PCR**

L'optimisation des conditions de la PCR en temps réel a été réalisée à partir de l'ADN extrait des 4 témoins négatifs. Pour chaque couple d'amorces une titration de la concentration optimale de MgCl<sub>2</sub> (de 1,2 à 4mM) et deux programmes différents de PCR par essais ou *PCR touchdown* ont été évalués (température d'hybridation de 65°C à 53°C et de 68°C à 59°C). L'utilisation d'une *PCR touchdown* avait pour objectif d'améliorer la spécificité de l'amplification : la température d'hybridation très haute lors des premiers cycles permet une forte stringence et donc une amplification spécifique avec un faible rendement puis une fois que la séquence d'intérêt devient majoritaire, la température d'hybridation est progressivement abaissée (1°C par cycle) afin d'assurer une meilleure efficacité de PCR.

La concentration d'ADN initial a également été adaptée en fonction de la valeur du Cp ou *Crossing point*.

#### **II.3.2.3.3 Protocole de la PCR et de l'étape de dénaturation**

Les étapes de PCR et de dénaturation ont été réalisées sur microplaque 96 puits (HRM Light Cycler 480 Multiwell Plate 96). Les réactifs utilisés provenaient de la trousse *Light cycler Resolution Melting Master* de Roche Applied system contenant un fluorochrome saturant. Chaque région d'intérêt du gène KCNQ1 a été amplifiée à partir de l'ADN extrait des quatre types d'échantillons (ventricule gauche congelé, ventricule gauche FFIP, foie congelé et foie FFIP) chez les 8 individus inclus initialement dans notre population d'étude. Pour chaque région d'intérêt l'ensemble des échantillons ont été testés en duplicat avec 4 témoins négatifs afin de réduire le nombre de faux négatifs.

La PCR a été réalisée dans un volume réactionnel final de 20µL contenant 10µL du Master mix, 0,25µM de chaque amorce, l'ADN et du MgCl<sub>2</sub> aux concentrations indiquées dans le tableau présenté en annexe 1. Les conditions d'amplification comprenaient une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 10 min suivie de 35 cycles composés d'une étape de

dénaturation à 95°C pendant 10 sec, d'une étape d'hybridation en *touchdown* selon l'un des deux programmes validés lors de l'étape d'optimisation, et finalement une étape d'extension à 72°C pendant 20 sec. Après une étape de dénaturation à 95°C pendant 1min puis un refroidissement à 40°C, les produits PCR sont soumis à l'étape finale de dénaturation progressive avec une augmentation de la température de 60°C à 95°C à raison d'1°C par seconde avec 25 acquisitions de la fluorescence tous les degrés.

#### **II.3.2.3.4 Analyses des courbes de fusion**

Les courbes de fusion ont été analysées à l'aide du logiciel Light Cycler 480 Gene Scanning Software, Version 1.5 (Roche). L'efficacité et la sensibilité de l'amplification sont évaluées selon la cinétique de croissance de la fluorescence lors de l'étape d'amplification. A l'aide du logiciel, les courbes de fusion ont été normalisées et un différentiel de fluorescence (*difference plot*) a été généré. Un des quatre témoins négatifs a été sélectionné comme courbe de référence. Nous avons défini des valeurs maximales supérieures et inférieures de différence relative de fluorescence en deçà et au-delà desquelles les cas pouvaient être considérés comme négatifs (seuil de négativité de la technique).

#### **II.3.2.3.5 Séquençage**

Les produits PCR à l'origine d'un décalage du pic de fusion, identifié par conséquent comme des « variants potentiels », ont été purifiés à l'aide du kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Germany) et directement analysés par électrophorèse capillaire sur un séquenceur automatique ABI Prism 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems) en utilisant le kit BigDye<sup>®</sup> Terminator Cycle Sequencing v 3.1 (Applied Biosystems) basé sur la méthode appelée « *dye terminator sequencing* » (Smith, Sanders et al. 1986) selon les recommandations du fournisseur. Les données brutes de séquençage ont été analysées grâce au logiciel Sequencer (Genes Codes Corporation) (v4.7).

L'ensemble des 16 exons du gène KCNQ1 ont été séquencés chez les 4 témoins négatifs. Enfin pour certains exons, nous avons également mis en place une stratégie de séquençage aléatoire d'un échantillon parmi les quatre échantillons analysés par individu afin de détecter d'éventuels faux négatifs.

L'ensemble des variants détectés ont été nommés selon la nomenclature officielle (Antonarakis 1998) avec pour séquence de référence NM\_000218.2.

## II.3.3 Détection de variants génétiques sur le gène RYR2 par spectrométrie de masse

### II.3.3.1 Approche méthodologique

Compte tenu des résultats obtenus avec la technique HRM pour l'exploitation des prélèvements FFIP et compte tenu de la taille du gène RyR2 dont le séquençage direct s'avérait coûteux et laborieux, nous nous sommes orientés vers les techniques de génotypages de SNPs afin de détecter les variants décrits sur le gène RyR2.

Ces méthodes sont fondées sur deux étapes successives : (i) la discrimination allélique qui permet de générer des produits spécifiques à chaque allèle et (ii) la détection des allèles. La plupart de ces méthodes sont basées sur une étape préalable d'amplification par PCR du ou des fragments d'ADN de petite taille (50 à 150pb) sur lesquels sont localisés les SNP ce qui apparaissait particulièrement adapté à l'étude d'ADN dégradé tel que l'ADN extrait de FFIP. De plus, la majorité des variants répertoriés sur le gène RyR2 sont des substitutions simple base et correspondent par conséquent à des SNPs (variations de la séquence d'ADN portant sur un nucléotide).

Parmi les différentes méthodes de typages des SNPs décrites dans la littérature, la technique iPLEX® Gold développée pour la plateforme MassArray® et commercialisée par Sequenom a retenu notre attention et ce pour plusieurs raisons :

- cette plateforme de spectrométrie de masse est la seule spécialement conçue pour des analyses d'acides nucléiques.
- la spectrométrie de masse est la méthode de détection directe d'une propriété intrinsèque des produits alléliques qui est leur rapport masse/charge. En effet contrairement aux autres méthodes, elle ne nécessite pas l'utilisation de fluorochrome ou de tout autre marquage qui peut induire des variations d'une analyse à l'autre et augmente le coût de celles-ci.
- la technologie iPLEX® Gold est présentée dans la littérature comme une méthode fiable, sensible, rapide et qui présente une capacité de multiplexage des SNPs élevée (en théorie jusqu'à 36 SNPs au sein d'une même réaction) (Bray, Boerwinkle et al. 2001, Gabriel, Ziaugra et al. 2009).
- cette méthode avait déjà fait l'objet de développements sur les trois principaux gènes impliqués dans le syndrome du QT long (KCNQ1, KCNH2, SCN5A) (Allegue, Gil et

al. 2010, Allegue, Gil et al. 2011) mais n'avait encore jamais été utilisée sur le gène RyR2.

- enfin il s'agissait d'une plateforme présente au laboratoire dont l'application sur les prélèvements FFIP n'avait pas encore été décrite lors de l'initiation de ce projet.

### II.3.3.2 Principe général

Le principe de la technique iPLEX® Gold développée pour la plateforme MassArray® est fondée sur l'extension d'une seule base (Single Base Extension, SBE) de la région d'intérêt puis sur une discrimination des produits alléliques par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Comme illustré sur la figure 12, la première étape consiste à amplifier par PCR de courts fragments d'ADN contenant les SNPs d'intérêt. Suite à la PCR, les dNTPs non incorporés sont neutralisés par l'ajout de phosphatase alcaline de crevette ou SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) (Etape 2). Le mélange réactionnel iPLEX Gold contenant des ddNTPs de masses modifiées et les amorces SBE sont ajoutés aux produits amplifiés. Les amorces SBE viennent s'hybrider à un nucléotide en amont du SNP d'intérêt. Un ddNTP de masse modifiée vient alors étendre l'amorce en fonction de l'allèle présent (Etape 3). Suite à la réaction SBE, les produits sont purifiés à l'aide d'une résine fournie qui élimine toutes traces de sels et autres contaminants dans le milieu. Les échantillons sont ensuite déposés sur une SpectroCHIP® à l'aide d'un robot dédié (Nanodispenser) (Etape 4). La dernière étape correspond à la détection de la masse des produits SBE purifiés par spectrométrie de masse MALDI TOF (étape 5). Les résultats sont ensuite analysés par le logiciel d'analyse de la plateforme (Typer analyser v.4.0.20) qui permet de visualiser les résultats des différents spectres sous forme de graphe et de tableau récapitulatif de l'ensemble des données pour chaque échantillon. Le taux d'assignement ou « *call rate* » correspond au nombre d'allèles assignés sur le nombre total d'allèles attendus. Les allèles sont assignés automatiquement par le logiciel selon les trois degrés de confiance suivants (soit du degré le plus élevé au plus bas) : « *conservative* », « *moderate* » et « *aggressive* », Lorsqu'aucun spectre n'est détecté (défaut d'amplification ou d'extension simple base) ou lorsque le degré de confiance est insuffisant, le logiciel n'assigne aucun allèle et spécifie l'item « *no call* ». Lorsqu'un allèle est assigné manuellement le logiciel spécifie l'item « *user call* ».



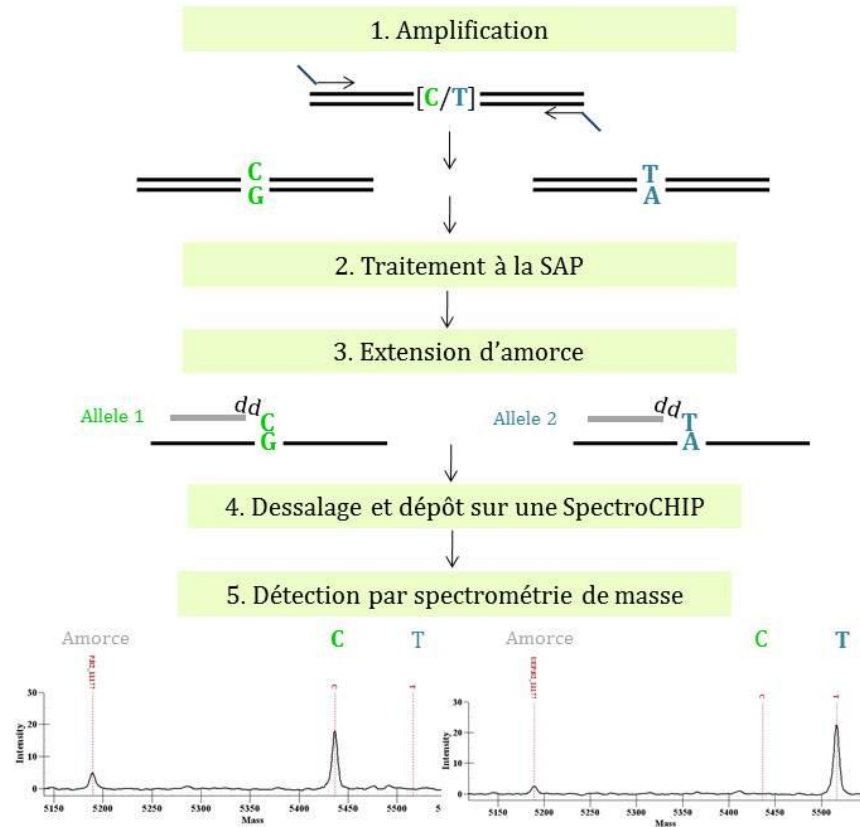


Figure 12 Principe de la méthode iPLEX Gold de Sequenom

### II.3.3.3 Protocole

#### II.3.3.3.1 Choix des SNPs d'intérêt

Le choix des SNPs d'intérêt s'est basé sur une revue de la littérature réalisée par Medeiros et al. (Medeiros-Domingo, Bhuiyan et al. 2009) dans laquelle l'auteur avait répertorié l'ensemble des variants connus sur le gène RyR2 pour être soit des mutations, des polymorphismes ou encore des variants dont la pathogénicité n'était pas établie (absence d'étude fonctionnelle). Le nombre de SNPs rapportés dans l'article de Medeiros et al. s'élevait au total à 139 SNPs auxquels nous avons ajouté le SNP V4299M (NC\_000001.9) décrit par Kaufenstein et al. (Kaufenstein, Kiehne et al. 2011).

#### II.3.3.3.2 Conception des amorces PCR et SBE

La conception des amorces PCR et SBE a été réalisée grâce au logiciel MassArray® design software v 4.0 (Sequenom). Une optimisation manuelle a également été réalisée afin de

réduire le nombre de multiplexes et d'augmenter par conséquent le nombre de SNPs par multiplexes. Le détail des amorces PCR et SBE utilisées est disponible en annexe 3.

#### **II.3.3.3 Protocole iPLEX Gold**

Toutes les étapes réactionnelles se sont déroulées sur une même microplaque de 96 puits selon les recommandations du fabricant.

Afin d'évaluer la reproductibilité de la technologie iPLEX Gold sur les prélèvements FFIP, nous avons réalisé les analyses à partir des prélèvements cardiaques congelés et FFIP des 12 cas de mort subite inclus dans notre cohorte en répliquant les analyses.

Afin de détecter d'éventuels faux positifs ou faux négatifs, un témoin positif (porteur du SNP V4299M. NC\_000001.9) et quatre témoins négatifs ont également été génotypés.

#### **II.3.3.4 Séquençage**

L'ensemble des variants identifiés par la plateforme MassArray® ainsi que les exons sur lesquels étaient situés les SNPs pour lesquels la technologie n'a pu être optimisée ont été séquencés selon la méthode de Sanger. Les amorces PCR utilisées pour le séquençage direct ont été dessinées par le logiciel Primer 3 et sont présentées en annexe 4. Le séquençage direct a été réalisé par le kit BigDye® Terminator Cycle Sequencing v 3.1 (Applied Biosystems) selon les recommandations du fournisseur. Les données brutes de séquençage obtenues après électrophorèse capillaire sur un séquenceur automatique 3500 Genetic analyzer (Applied Biosystems) ont été analysées grâce au logiciel Sequencer (Genes Codes Corporation) (v4.7).

## **II.4 Précautions prises lors de l'analyse des échantillons FFIP**

Lors des différentes étapes de traitement des échantillons FFIP, de nombreuses précautions ont été prises pour ne pas contaminer ces échantillons avec de l'ADN exogène et pour éviter toute contamination entre les échantillons.

1. Lors de l'étape de coupes des blocs de paraffine au microtome, il était effectué entre chaque échantillon traité un changement de gants, un changement de support de coupe et un nettoyage de la lame du microtome au moyen de lingettes imprégnées d'une solution de décontamination DNA Away® (Molecular bioproducts).
2. Les étapes d'extraction et de préparation des mélanges PCR étaient effectuées sous hotte à flux laminaire par des personnes ayant toujours porté une double paire de gants et une blouse.
3. Des blancs (utilisation d'eau ultra pure à la place de l'ADN) ont été utilisés pour les étapes d'extraction, d'amplification par PCR lors des analyses HRM et pour les réactions d'amplification et d'extension simple base sur la plateforme MassArray® afin de dépister une éventuelle contamination.
4. Pour chaque cas de mort subite inexplicée inclus dans la population d'étude, les analyses HRM et les analyses sur la plateforme MassArray® ont été répliquées à partir du même extrait d'ADN provenant de l'échantillon cardiaque ou hépatique étudié.

## **III Résultats**



## **III.1 Comparaisons des protocoles d'extraction et des substrats utilisés**

Trois protocoles d'extraction-purification ont été testés sur une série de 11 échantillons FFIP de cœur et 11 échantillons FFIP de foie provenant de 11 individus dont l'autopsie avait été réalisée à l'Institut de Médecine Légale de Strasbourg. Les quantités d'ADN extrait ont été comparées et soumises à une analyse statistique afin de valider une méthode adaptée aux prélèvements FFIP.

### **III.1.1 Comparaison des trois types de protocoles**

Les résultats de la quantification par la PCR en temps réel des ADN extraits avec les trois protocoles, à savoir le protocole A (extraction organique couplée au kit Clean-Mix™, Talent), le protocole B (kit QIAamp DNA mini®, Qiagen), et le protocole C (extraction organique couplé au kit QIAamp DNA mini®, Qiagen) à partir des 22 échantillons FFIP sont présentés en annexe 5. Les concentrations d'ADN varient de 2 à 243 µg/µL avec une cinétique de l'IPC ne révélant pas la présence d'inhibiteurs. Afin de tenir compte du poids initial de tissus prélevés à l'aide du microtome à partir des blocs de paraffine (poids des coupes variant de 31 à 67 mg), nous avons calculé pour chaque échantillon la quantité moyenne d'ADN extrait exprimée en µg pour 100 mg de tissu prélevé en fonction de la concentration d'ADN quantifiée (ng/µl) et du poids de la coupe (mg). Compte tenu de la faible densité de la paraffine (inférieure à la densité de l'eau) nous avons considéré que le poids de la coupe était équivalent au poids de tissu prélevé.

Les quantités moyennes d'ADN extrait (µg/100 mg de tissu) selon l'un des trois protocoles (A, B, C) à partir des 22 échantillons tests tous types de substrats confondus sont présentées dans le tableau 8 ainsi que l'erreur standard et l'intervalle de confiance à 95 %. On constate que la quantité moyenne d'ADN la plus élevée est obtenue avec le protocole C.

La comparaison des différences des moyennes d'ADN extrait par la réalisation d'une analyse de variance montre qu'il existe des différences significatives entre les méthodes d'extraction ( $p=0,001$ ) et que les trois méthodes diffèrent les unes des autres (Tableau 9). Le protocole A (extraction organique+ kit Clean-Mix™) diffère du protocole B (kit QIAamp DNA mini®)

( $p=0,001$ ) et du protocole C (extraction organique+ kit QIAamp DNA mini®) ( $p =0,014$ ) et le protocole B diffère du protocole C ( $p =0,001$ ) (Tableau 9).

**Tableau 8 Quantité moyenne d'ADN extrait ( $\mu\text{g}/100$  mg tissu) selon le type de protocole**

Protocole	Moyenne	Erreur standard	Intervalle de confiance à 95 %	
			minimum	maximum
A	13,997	1,405	11,075	16,919
B	5,894	1,675	2,411	9,377
C	30,104	6,676	16,221	43,987

Protocole A : extraction organique+ kit Clean-Mix™

Protocole B : Kit QIAamp DNA mini®

Protocole C : extraction organique+kit QIAamp DNA mini®

**Tableau 9 Comparaison des différences des moyennes d'extraction selon le type de protocole utilisé**

Protocole (I)	Protocole (J)	Différence de moyenne (I-J)	Erreur standard	Signification <sup>a</sup>	Intervalle de Confiance de la différence à 95 % <sup>a</sup>	
					minimum	maximum
A	B	8,103*	2,189	0,001*	3,551	12,655
	C	-16,107*	6,043	0,014*	-28,673	-3,540
B	A	-8,103*	2,189	0,001*	-12,655	-3,551
	C	-24,210*	6,242	0,001*	-37,191	-11,228
C	A	16,107*	6,043	0,014*	3,540	28,673
	B	24,210*	6,242	0,001*	11,228	37,191

\*la différence de moyenne est significative pour  $p = 0,05$

<sup>a</sup> Ajustement des comparaisons multiples: différence la moins significative (équivalent à aucun ajustement)

Protocole A : extraction organique+ CleanMix™

Protocole B : Kit QIAamp DNA mini®

Protocole C : extraction organique+kit QIAamp DNA mini®

Au total, la quantité moyenne d'ADN extraite avec le protocole C combinant une extraction organique et le kit QIAamp DNA mini® est supérieure à la quantité moyenne d'ADN extraite par les deux autres protocoles avec une différence statistiquement significative ( $p<0,05$ ).

### III.1.2 Comparaison des deux types de substrats

Parallèlement à la comparaison de trois protocoles, nous avons également comparé la quantité d'ADN extrait en fonction du type de substrat. Nous avons calculé les quantités moyennes d'ADN extrait ( $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$  de tissu) à partir soit du cœur soit du foie pour les 22 échantillons tests tous types de protocoles confondus. Les résultats de ce calcul ainsi que l'erreur standard et l'intervalle de confiance à 95 % sont présentés dans le tableau 10. On constate que la quantité moyenne d'ADN la plus élevée est obtenue à partir du substrat hépatique.

**Tableau 10** Quantité moyenne d'ADN extrait ( $\mu\text{g}/100\text{mg}$  tissu) selon le type de substrat quel que soit le protocole utilisé

Tissu	Moyenne	Erreur Standard	Intervalle de confiance à 95 %	
			minimum	maximum
coeur	13,645	2,401	8,652	18,638
foie	19,685	3,502	12,402	26,969

L'analyse de variance comparant les différences de moyenne d'ADN extrait montre qu'il existe une différence significative entre les organes ( $p = 0,022$ ) (Tableau 11).

**Tableau 11** Comparaison des différences des moyennes d'extraction entre les deux types de substrats

Tissu (I)	Tissu (J)	Différence de moyenne (I-J)	Erreur Standard	Signification <sup>a</sup>	Intervalle de confiance de la différence à 95% <sup>a</sup>	
					minimum	maximum
coeur	foie	-6,041	2,438	0,022*	-11,111	-0,971
foie	coeur	6,041	2,438	0,022*	0,971	11,111

\* la différence de moyenne est significative pour  $p = 0,05$

<sup>a</sup>. Ajustement des comparaisons multiples : différence la moins significative (équivalent à aucun ajustement)

Au total, la quantité moyenne d'ADN extrait à partir du substrat hépatique est supérieure à la quantité moyenne d'ADN extrait à partir du substrat cardiaque avec une différence statistiquement significative ( $p < 0,05$ ).



Par conséquent au vu de ces résultats le protocole C associant une extraction organique au kit QIAamp DNA mini<sup>®</sup> a été validé et appliqué aux échantillons FFIP des cas inclus dans notre population d'étude.

La quantification des extractions à partir des échantillons FFIP et congelés de la population d'étude réalisée par la spectrophotométrie retrouve un rapport A260/A280 aux environs de 1,8 sans différence significative entre les deux modes de conservation.

## **III.2 Criblage des variants sur le gène KCNQ1 par la technique HRM**

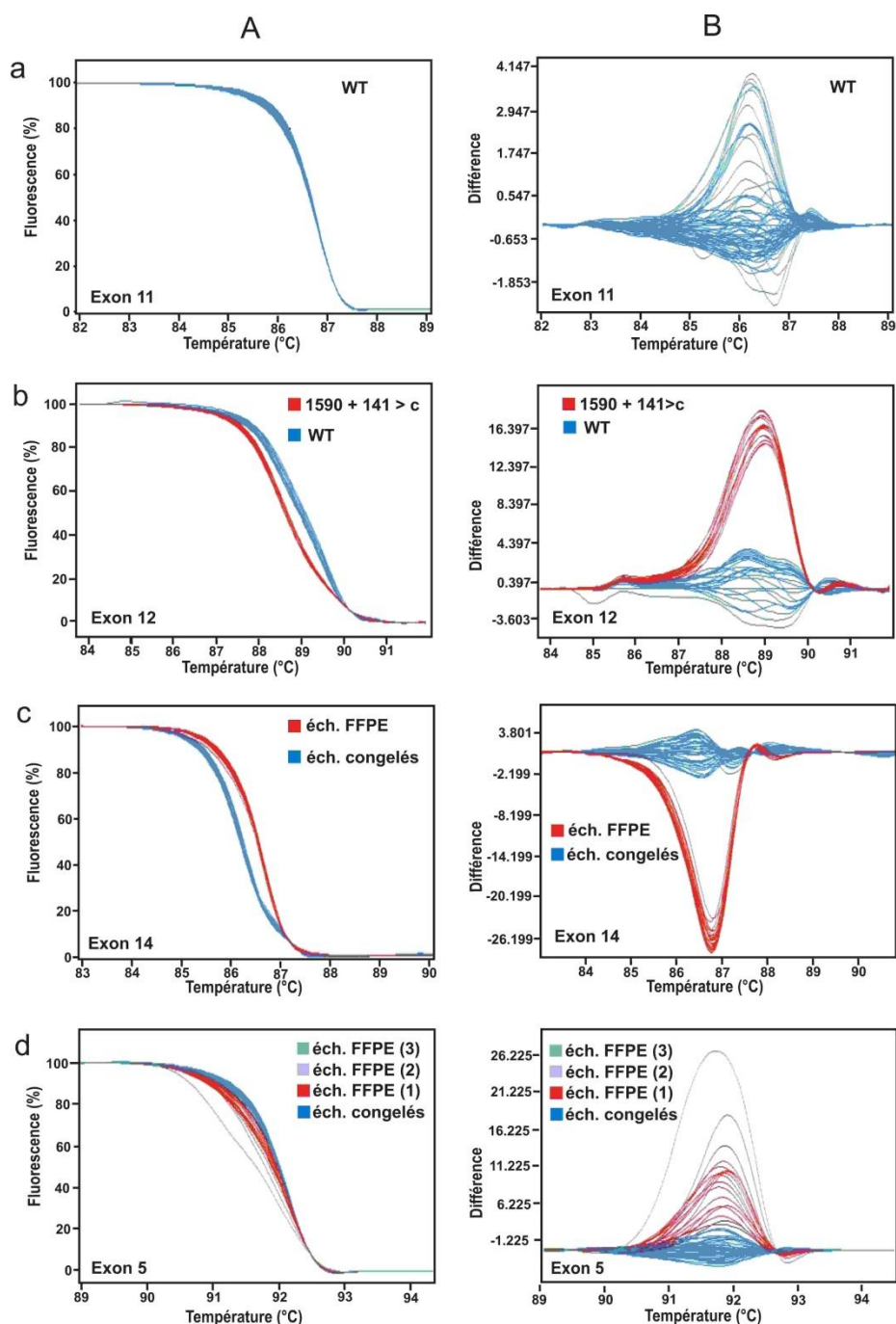
Nous avons évalué l'application de la technique HRM à des prélèvements post-mortem FFIP et congelés en ciblant dans une première approche le gène KCNQ1 au niveau des 8 cas de mort subite inexpliquée inclus initialement dans notre population d'étude.

### **III.2.1 Résultats de l'optimisation des conditions PCR**

Malgré la conception de différentes paires d'amorce et l'utilisation de différents protocoles d'amplification (modification de la concentration initiale d'ADN soumise à amplification, de la concentration de MgCl<sub>2</sub> et des températures d'hybridation de la PCR *touchdown*) nous n'avons pu optimiser les conditions PCR que pour 13 des 16 exons du gène KCNQ1. En effet pour trois exons, à savoir les exons 1, 13 et 16, la présence de produits PCR non spécifiques et/ou une valeur du C<sub>p</sub> trop élevée traduisant une mauvaise efficacité de l'amplification ne permettaient pas une analyse HRM discriminante. Par conséquent, ces trois exons ont été analysés par séquençage direct.

### **III.2.2 Comparaison des résultats de la technique HRM et du séquençage entre échantillons congelés et FFIP**

Nous avons comparé à la fois les courbes de fusion et les résultats du séquençage (soit ciblé sur les « variants potentiels » détectés par la technique HRM soit le séquençage aléatoire afin de détecter des faux négatifs) entre échantillons congelés et FFIP appariés pour chaque exon optimisé. Nous avons observé que selon les exons explorés les résultats de la technique HRM n'étaient pas reproductibles entre échantillons congelés et FFIP. On distinguait quatre types de situations résumées dans la figure ci-contre (Figure 13).



**Figure 13** Courbes de fusion normalisées (A) et différences de fluorescence (B) pour chaque type de situations observées :

(a) une seule population observée quel que soit le type d'échantillons (congelés ou FFIP) et le type de substrat indiquant qu'aucun variant n'a été détecté

(b) deux populations quel que soit le type d'échantillons (congelés ou FFIP) et le type de substrat correspondant à une population sauvage (wild type) et une population de « variants potentiels »

(c) deux populations distinctes correspondant aux échantillons congelés et aux échantillons FFIP

(d) l'absence de variants observés dans la population des échantillons congelés et différentes populations observées parmi les échantillons FFIP

Pour huit exons (à savoir les exons 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11 et 15) les courbes de fusion se regroupent en une seule population quel que soit le type de conservation et le type de substrat indiquant qu'aucun variant n'a été détecté. Pour chacun de ces huit exons la stratégie de séquençage aléatoire n'a mis en évidence aucune mutation parmi les échantillons testés (situations 1a de la Figure 13). Aucun faux négatif n'a donc été identifié.

Pour trois exons (à savoir les exons 2, 6 et 12), cinq cas ont été identifiés par la technique HRM comme porteurs potentiels de variants à la fois pour les échantillons congelés et FFIP. Le profil de la courbe de fusion pour l'exon 12 pour les échantillons congelés et FFIP est présenté dans la situation 1b de la Figure 13. Le résultat HRM a été confirmé par le séquençage direct qui a identifié trois variants génomique : c.858C>T dans l'exon 6 pour le cas n°5, c.1590+14T>C dans l'intron 12 pour les cas n° 6 et 8 et c.477+96del GG dans l'intron 2 pour les cas n°1 et 4.

Pour l'exon 14, les courbes de fusion montrent deux populations distinctes correspondant aux échantillons congelés d'une part et FFIP d'autre part (situation 1c de la Figure 13). Pour cet exon, la stratégie de séquençage aléatoire n'a mis en évidence aucune mutation parmi les échantillons testés.

Pour l'exon 5, nous avons observés des résultats discordants entre les échantillons congelés et FFIP appariés. En effet, aucun variant n'a été identifié parmi les échantillons congelés alors qu'on observait trois populations distinctes parmi les échantillons FFIP (situation 1d de la Figure 13). L'ensemble des échantillons identifiés comme « variants potentiels » par la technique HRM ont été séquencés et aucune mutation n'a été identifiée.

Par conséquent, il n'a été identifié aucun faux négatif lors du séquençage aléatoire. En revanche, les résultats observés pour l'exon 14 et l'exon 5 correspondent à des faux positifs uniquement présents au sein des échantillons FFIP en rapport avec les modifications induites par le formaldéhyde. Ces résultats traduisent une irrégularité des artefacts secondaire à la fixation par le formaldéhyde selon les séquences nucléotidiques des exons.

Enfin, le séquençage direct des exons 1, 13 et 16, pour lesquels la technique HRM n'avait pas pu être optimisée, a détecté une substitution G-A en position 1638 sur l'exon 13 chez deux cas (cas°1 et 5).

### III.2.3 Variants détectés dans la population d'étude

Au sein des 8 individus initialement inclus dans la population d'étude, l'ensemble des variants détectés soit par séquençage ciblé soit par séquençage direct sont présentés dans le tableau 12, ainsi que leur numéro d'identification (rs) lorsqu'il est répertorié, la fréquence de l'allèle mineur et les publications dans lesquelles ils ont déjà été décrits.

**Tableau 12 Variants criblés par la technique HRM et identifiés par le séquençage direct sur le gène KCNQ1**

Nt modifié (NM_000218.2)	AA modifié (NP_000209.2)	Localisation sur le gène	Domaine de la protéine	Fréq. de l'allèle mineur*	Cas n°	Références
c.477+96 del GG		Intron 2	/	/	1, 4	/
c.858C>T	p.D286D	Exon 6	S5	/	5	/
c.1590+14T>C (rs11024034)		Intron 12	/	0,08	6, 8	(Jongbloed, Marcelis et al. 2002, Gouas, Nicaud et al. 2005)
c.1638G>A (rs 1057128)	p.S546S	Exon 13	C ter	0,21	1, 5	(Lee MP 1997, Iwasa H 2000, Jongbloed, Marcelis et al. 2002, Aydin, Bahring et al. 2005, Gouas, Nicaud et al. 2005)

AA acide aminé, Nt. Nucléotide, Fréq. Fréquence

\*selon NCBI SNP databank [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?)

Compte tenu des données disponibles sur le site de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) et sur le site des données sur les arythmies héréditaires « *inherited arrhythmias databases* » (<http://www.fsm.it/cardmoc/>), deux des quatre variants génétiques identifiés dans notre population d'étude avaient déjà été décrits. Il s'agit de la substitution G-A en position 1638 sur l'exon 13 n'entraînant pas de modification de l'acide aminé (substitution synonyme) correspondant à un polymorphisme fréquent (>0,1) et à un variant intronique avec une substitution T-C à la position 1590+14 sur l'intron 12 correspondant à un polymorphisme plus rare (<0,1).

Par ailleurs, nous avons identifié deux variants génétiques non précédemment décrits correspondant à une substitution C-T en position 858 sur l'exon 6 n'entraînant pas de modification de l'acide aminé et à un variant intronique avec une délétion GG en position 477+96 sur l'intron 2.

Au total, au sein des 8 cas inclus initialement dans notre population d'étude aucun variant induisant une modification d'un acide aminé n'a été identifié.

### **III.3 Génotypage des SNPs d'intérêt sur le gène RyR2 par spectrométrie de masse**

L'analyse des SNPs sur le gène RyR2 a été réalisée par la technologie iPLEX® Gold sur la plateforme MassArray® chez les 12 individus inclus au sein de la population d'étude à partir d'ADN extrait de prélèvements cardiaques congelés et FFIP.

#### **III.3.1 Résultats du design des multiplexes**

Parmi les 140 SNPs d'intérêt, nous sommes parvenus grâce au logiciel MassArray® design et à une optimisation manuelle à créer 6 multiplexes permettant l'analyse de 105 SNPs à partir de 48 amplicons. La liste des 105 SNPs analysés par spectrométrie de masse est disponible en Annexe 2. Les six multiplexes se distribuaient de la manière suivante : (A1) 29 plexes, (A2) 21 plexes (A3) 13 plexes (A4) 9 plexes et (A8) 8 plexes.

Les 35 SNPs qui n'ont pu être intégrés dans l'une des six multiplexes correspondaient à des SNPs dont la position trop rapprochée sur la séquence d'ADN n'a pas permis de dessiner les amorces SBE. Les exons au niveau desquels étaient positionnés ces SNPs à savoir les exons 14, 47, 90a, 90b du gène RyR2 ont par conséquent été entièrement séquencés.

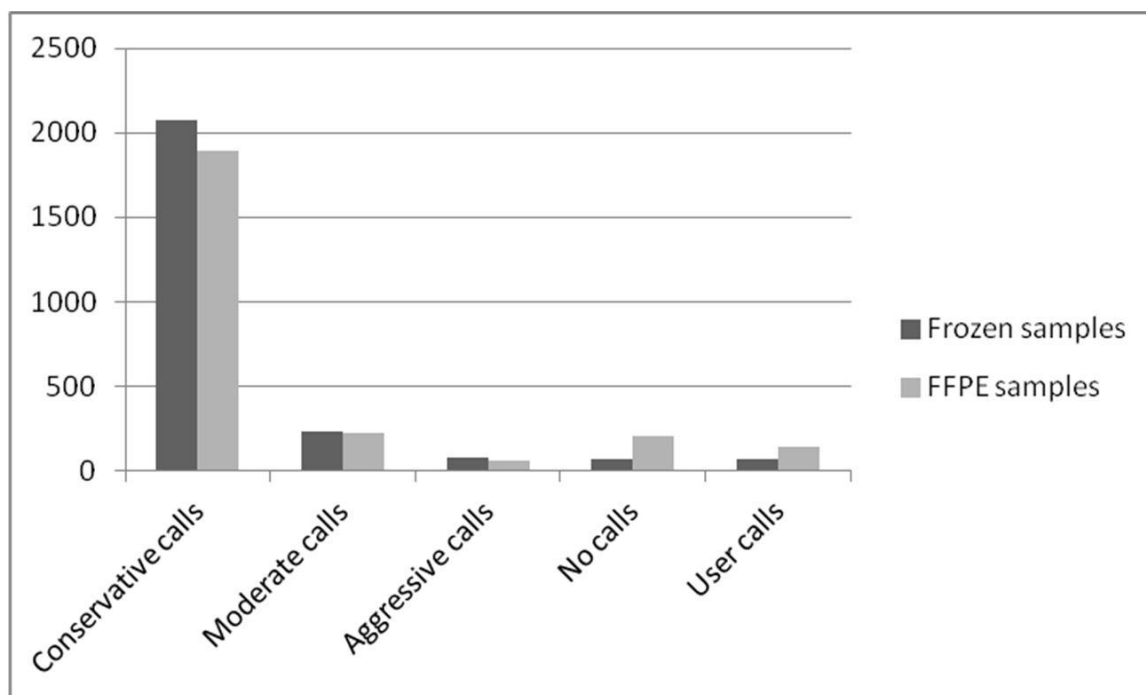
### **III.3.2 Comparaisons des résultats entre les expériences réalisées en duplicat**

Concernant les résultats observés pour les deux expériences réalisées en duplicat à partir des échantillons congelés, 1224 allèles ont été assignés sur un total attendu de 1260 allèles dans chacune des deux expériences correspondant à un taux d'assignement (*call rate*) élevé de 97,1 %. Une concordance de 100 % entre les deux expériences a pu être constatée.

Pour les deux expériences réalisées en duplicat à partir des échantillons FFIP, le taux d'assignement était différent entre les deux expériences et s'élevait respectivement à 91,9 % (1158/1260) et 91,5 % (1153/1260). Une discordance de 6,2 % était observée entre les deux expériences. Cette discordance correspondait soit à des allèles non désignés dans une des deux expériences (suite à un défaut d'amplification ou un défaut d'extension simple base) soit à des allèles dont l'assignement n'était pas identique d'une expérience à l'autre. La combinaison des résultats obtenus dans les deux expériences permettait au final d'assigner 1188 allèles sur 1260 allèles attendus permettant d'atteindre un taux d'assignement final de 94,3 %.

### **III.3.3 Comparaisons des résultats entre échantillons congelés et FFIP**

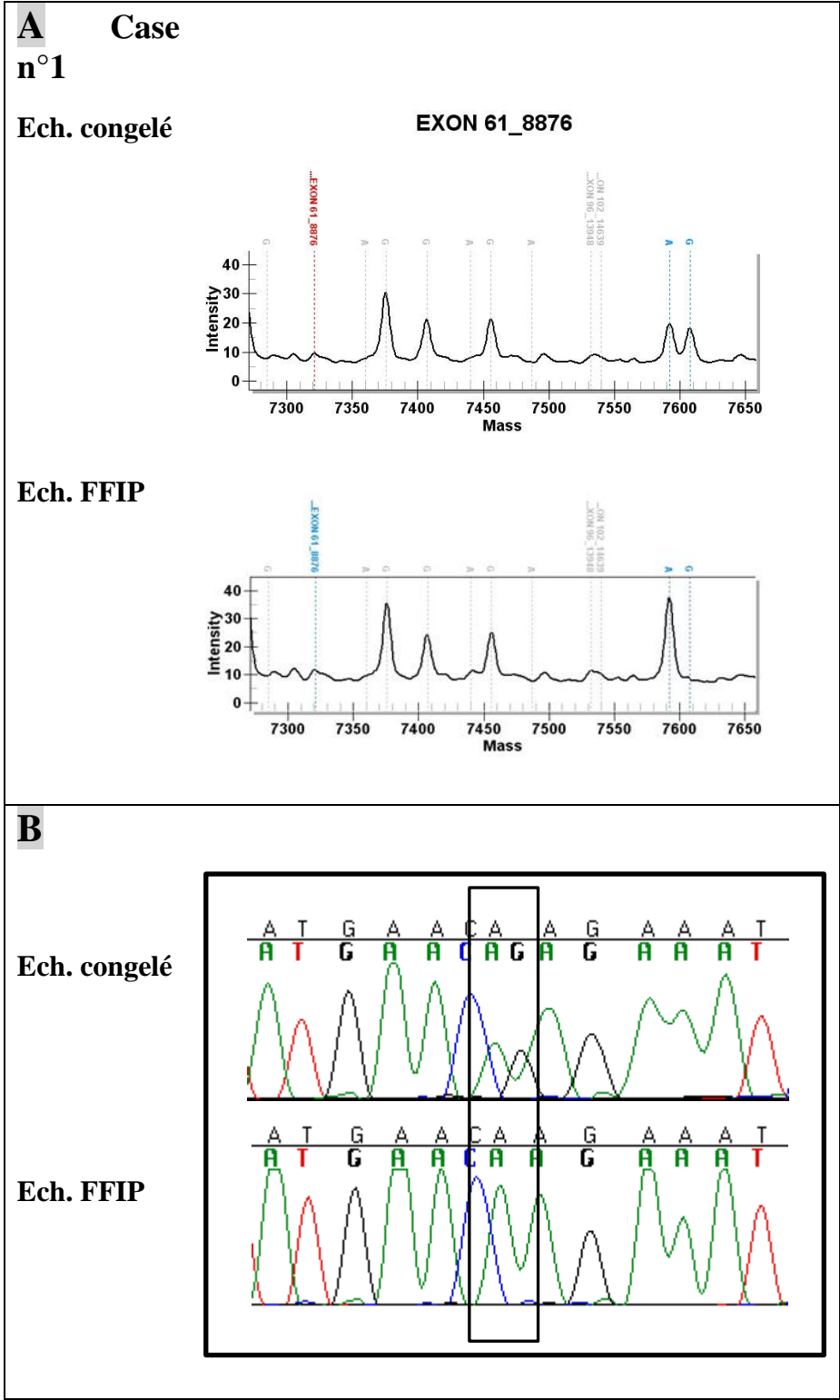
La comparaison du degré de confiance encore appelé « label qualité » des allèles assignés à partir des prélèvements congelés et FFIP indique que le nombre d'allèles avec un label qualité réduit à savoir de type « *agressive* », « *no call* » ou « *user call* » était plus élevé pour les extraits d'ADN provenant de prélèvements FFIP (400/2520, 15,8 %) comparativement aux échantillons congelés (217/2520), 8,6 %) tel que cela est représenté dans l'histogramme ci-dessous (Figure 14).



**Figure 14 Comparaison des degrés de confiance des allèles assignés selon le type de prélèvement**

Le degré de confiance ou « label qualité » représenté en axis est défini par le logiciel MassArray® Typer et se décline du label « *conservative* » (le plus haut degré de confiance) au label « *aggressive* » le plus bas degré de confiance. L’item « *no call* » traduit le défaut d’assignement par le logiciel. L’item « *user call* » indique que l’allèle a été désigné manuellement.

La comparaison des résultats obtenus entre les expériences réalisées à partir des échantillons appariés congelés et FFIP a mis en évidence pour 24 allèles une discordance d’assignement (résultats présentés en Annexe 6). A titre d’exemple, pour le SNP 61\_8876 présenté dans la figure 15, le cas n°1 est hétérozygote AG pour l’échantillon congelé et homozygote AA sur l’échantillon FFIP. Le séquençage direct de l’exon 61 du gène RyR2 du cas n°1, retrouve l’hétérozygotie AG sur le prélèvement congelé et l’homozygotie AA sur l’échantillon FFIP attestant de l’apparition d’un artefact de séquence secondaire à la fixation du tissu par le formaldéhyde. Les artefacts que nous avons le plus fréquemment observés étaient les transitions C>T et G>A.



**Figure 15 Détection d'un artefact de séquence sur un échantillon FFIP**  
a. Présentation des spectres obtenus à partir de l'échantillon congelé et FFIP du cas n°1. Pour le SNP 61\_8876 (correspondant à un polymorphisme précédemment décrit dans la littérature. P.Q2958R), le cas n°1 est hétérozygote AG pour l'échantillon congelé et homozygote AA sur l'échantillon FFIP.  
b. Résultat du séquençage (seules les séquences sens sont montrées). Le séquençage confirme la transition G>A dans l'échantillon FFIP correspondant à un artefact de séquence.



### III.3.4 Variants détectés dans la population d'étude

Le séquençage direct des exons (14, 47, 90a et 90b) qui n'avaient pas pu être intégré dans les multiplexes n'a révélé aucun variant génétique parmi les 12 cas inclus dans la population d'étude.

Les résultats de l'analyse des 105 SNPs par la spectrométrie de masse MALDI-TOF sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 13). Il apparaît que 8 cas étaient porteurs de la substitution A-G en position 8876 sur l'exon 61 correspondant à un polymorphisme (variant non pathogène) non synonyme fréquent ( $>0,1$ ) au vu de la base de données dbSNP du site NCBI. Trois cas (cas n°10, 9 et 1) étaient porteurs respectivement d'une substitution G-A en position 1519, 5654 et 5656. Ces trois variants non synonymes étaient tous décrits soit dans la base de données soit dans la littérature (Medeiros-Domingo, Bhuiyan et al. 2009) comme des polymorphismes peu fréquents ( $<0,1$ ).

**Tableau 13 Variants génétiques identifiés sur le gène RyR2 au sein de notre population d'étude (12 cas)**

AA modifié (dbSNP rs) NP_001026,2	Nt. modifié NM_001035,2	Localisation sur le gène	Domaine de la protéine	Fréq. allèle mineur*	Cas n°	Références
V507I	c.1519 G>A	Exon 16	N ter	np	10	(Medeiros-Domingo, Bhuiyan et al. 2009)
G1885E (rs 41315858)	c.5654 G>A	Exon 37	Boucle cytoplasmique	0,018	9	(Tiso, Stephan et al. 2001, Milting, Lukas et al. 2006, Koop, Goldmann et al. 2008, Wong, Koo et al. 2009)
G1886S (rs 3766871)	c.5656 G>A	Exon 37	Boucle cytoplasmique	0,071	1	(Milting, Lukas et al. 2006, Koop, Goldmann et al. 2008)
Q2958R (rs 34967813)	c.8876 A>G	Exon 61	Cytosol	0,143	1, 2, 4-9	(Laitinen, Brown et al. 2001, Tiso, Stephan et al. 2001, Medeiros-Domingo, Bhuiyan et al. 2009)

AA acide aminé ; Nt, Nucléotide ; Fréq fréquence ; np non précisé

\*selon NCBI SNP databank [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?)

Au total, au sein de la population d'étude aucun variant génétique potentiellement pathologique n'a été identifié sur le gène RyR2.



## IV Discussion



Dans les pays développés, la mort subite d'origine cardiaque constitue l'une des principales causes de décès, représentant ainsi un problème majeur de santé publique. Après 35 ans, la première cause de mort subite cardiaque est la maladie coronaire d'origine athéroscléreuse, tandis qu'avant 35 ans les cardiomyopathies génétiques sont les plus fréquentes.

Dans un contexte de mort subite survenant chez un adulte jeune ou un enfant, l'autopsie médico-légale et les investigations complémentaires, notamment anatomo-pathologiques, permettent le plus souvent d'identifier une cause évidente de décès, telle qu'une anomalie structurale cardiaque (cardiomyopathie, myocardite, dysplasie arythmogène du ventricule droit) ou une anomalie extra-cardiaque telle qu'une rupture d'anévrisme. Il s'avère que la cause du décès demeure indéterminée dans 3 à 30 % des cas de mort subite, appelée par conséquent mort subite inexplicée. Les canalopathies cardiaques secondaires à un dysfonctionnement des canaux ioniques d'origine génétique constituent alors la principale hypothèse diagnostique. Les récents progrès de la génétique ont permis des avancées très importantes dans la connaissance des gènes impliqués dans les canalopathies cardiaques tels que le syndrome du QT long ou la tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique (TVPC).

Les investigations génétiques effectuées sur du matériel biologique prélevé en post mortem, visant à détecter les mutations potentiellement impliquées dans les canalopathies cardiaques, suscitent un grand intérêt tant dans le domaine médico-légal que dans le domaine clinique. En effet, la détection post-mortem d'une mutation impliquée dans les canalopathies cardiaques permet non seulement d'identifier la cause éventuelle du décès mais également de mettre en place avec une équipe multidisciplinaire un dépistage chez les apparentés du défunt afin de prévenir la survenue de nouveaux décès.

L'objectif majeur de notre travail de thèse a été d'élaborer une approche diagnostique post-mortem des mutations, applicable en routine, au niveau des gènes impliqués dans les canalopathies cardiaques et d'évaluer leur pathogénicité afin de pouvoir mettre en place les mesures de prévention adéquates chez les apparentés du défunt.

Compte tenu du fait qu'en France les prélèvements FFIP constituaient la source principale de prélèvements post-mortem, il a été nécessaire de valider dans une première étape une technique d'extraction-purification adaptée aux prélèvements FFIP. Eu égard à la diversité des protocoles d'extraction et de purification décrits dans la littérature à partir de prélèvements FFIP et compte tenu des difficultés techniques similaires rencontrées pour

l'exploitation d'ADN ancien et d'ADN extrait de substrats FFIP, nous avons évalué l'efficacité sur des prélèvements FFIP d'un protocole décrit jusque-là uniquement pour l'extraction et la purification d'ADN dégradé obtenu à partir de prélèvements biologiques anciens.

Le second objectif de notre travail de thèse a été d'évaluer l'application à des prélèvements post-mortem congelés et FFIP d'une nouvelle technologie de screening des variants génétiques par l'analyse des courbes de fusion haute résolution (HRM) sur les gènes impliqués dans les canalopathies cardiaques. L'évaluation a porté dans une première approche sur le gène *KCNQ1*, décrit dans la littérature comme l'un des gènes le plus fréquemment le siège de mutation avec le gène *RyR2* et impliqué dans le syndrome du QT long responsable de mort subite chez l'adulte jeune, l'enfant et le nourrisson.

Grâce à l'acquisition au laboratoire d'une plateforme de génotypage MassArray® de Sequenom, comprenant un robot de transfert des échantillons sur une micropuce d'analyse et un spectromètre de masse MALDI-TOF, la dernière partie de ce travail de thèse a consisté à évaluer l'application à des prélèvements post-mortem congelés et FFIP d'une nouvelle approche de génotypage par la technologie iPLEX Gold de Sequenom sur le gène *RyR2* dont la grande taille constituait une limite à son séquençage complet.

## **IV.1 Exploitation des prélèvements FFIP**

Malgré les difficultés techniques incontournables liées au caractère dégradé de l'ADN extrait de substrats FFIP, ces derniers constituent une source d'ADN génomique largement utilisée dans de nombreux domaines de recherche tels que l'oncologie, la neuropathologie ou l'étude des maladies rares. Par conséquent, la course au développement de techniques d'extraction et de purification permettant d'améliorer la qualité et la quantité d'ADN extrait à partir de prélèvement FFIP a donné lieu à de nombreuses publications internationales et études comparatives (Cao, Hashibe et al. 2003, Gilbert, Haselkorn et al. 2007, Carturan, Tester et al. 2008). En raison d'un grand nombre de paramètres impliqués dans la dégradation de l'ADN, tels que le délai de prélèvement post-mortem du tissu, la taille de l'échantillon tissulaire prélevé, le pH du formaldéhyde, le temps de fixation ou le degré d'autolyse du tissu, la comparaison entre les différentes études était complexe et soulignait parfois des conclusions

contradictoires. Il nous a donc semblé primordial avant de débiter toutes analyses génétiques de valider une méthode d'extraction-purification adaptée aux prélèvements FFIP via une stratégie expérimentale permettant d'attester de la fiabilité de nos résultats.

#### **IV.1.1 Validation d'un protocole adapté aux prélèvements FFIP**

Les résultats obtenus dans ce travail ont montré que comparativement à l'utilisation unique du kit commercial QIAamp DNA mini® de Qiagen, les deux protocoles associant une extraction organique et un kit commercial dédié à l'ADN dégradé (CleanMix, Talent et QIAamp DNA mini®, Qiagen) basés sur une purification sur billes ou colonnes à membrane de silice ont permis d'augmenter la quantité moyenne d'ADN extrait d'un facteur respectivement de 2,4 et 5,8 de manière statistiquement significative ( $p < 0,05$ ). Alors que l'on aurait pu logiquement penser que la multiplication des étapes de purification majorerait la perte d'ADN lors des phases d'élution, il s'avère qu'à l'inverse la quantité moyenne d'ADN extrait, déterminée par PCR quantitative, s'en voit augmentée et nous voyons deux explications complémentaires possibles à ce résultat. D'une part, le phénol-chloroforme a pu améliorer l'élimination au niveau de la phase aqueuse des produits potentiels pouvant interférer avec l'affinité de la molécule d'ADN pour la matrice de silice. D'autre part, sachant que la quantification de l'ADN par PCR en temps réel permet non seulement d'estimer la quantité d'ADN humain présent dans un extrait donné mais également de détecter la présence d'inhibiteurs de réactions, l'association du phénol-chloroforme et de la purification sur la matrice de silice a également pu améliorer l'élimination des inhibiteurs de la PCR favorisant ainsi la cinétique d'amplification (Jackson, Lewis et al. 1990).

L'efficacité d'extraction par le protocole phénol-chloroforme couplé au kit QIAamp DNA mini® (Qiagen) s'est révélée supérieure au protocole précédemment décrit sur des échantillons anciens associant le phénol-chloroforme au kit CleanMix™ (Talent) (Keyser-Tracqui and Ludes 2005). Seule une différence dans la composition des tampons entre les deux kits permet d'apporter une explication à ce résultat. Les tampons du kit Qiagen semblent donc plus performants pour améliorer la réversibilité des ponts méthyléniques intra et intermoléculaires secondaires aux réactions chimiques induites par le formaldéhyde au niveau des groupements amines, entraînant un meilleur rendement à l'amplification.

Comme nous l'avons expliqué dans la partie méthode, le foie a été prélevé initialement en parallèle du cœur afin de pouvoir dupliquer les extractions à partir d'un tissu différent provenant d'un même individu et de contrôler ainsi la fiabilité de nos résultats. La



quantification comparative de l'ADN extrait par les trois protocoles a révélé de manière fortuite que le substrat hépatique s'est avéré être une source plus importante de matériel génétique que le cœur avec une différence statistiquement significative. Le caractère cellulaire particulier de polyploïdisation des hépatocytes constitue une explication probable à ce constat. En effet si 100 % des hépatocytes chez le nouveau-né sont diploïdes, chez l'adulte le nombre d'hépatocytes polyploïdes (tétra voire octaploïdes) est évalué à 30-40 % (Kudryavtsev, Kudryavtseva et al. 1993). Au vu de ce résultat, le tissu hépatique constituait par conséquent un substrat tissulaire de choix pour la poursuite des investigations moléculaires et nous en avons tenu compte dans le protocole « mort subite inexplicée » mis en place à l'Institut de Médecine légale de Strasbourg.

Quoiqu'il en soit, étant donné les résultats obtenus, **nos travaux ont permis de valider un protocole d'extraction-purification d'ADN associant le phénol-chloroforme au kit QIAamp DNA mini® (Qiagen) qui n'avait encore jamais été décrit dans la littérature pour l'extraction d'ADN à partir de prélèvement FFIP (Farrugia, Keyser et al. 2010).** Cette première étape validée, ce protocole pouvait alors être intégré à l'approche diagnostique des canalopathies cardiaques.

## **IV.2 Apport de la technique HRM couplé au séquençage ciblé pour la détection de variants sur le gène KCNQ1**

Au commencement de ce travail de thèse, les techniques d'analyses moléculaires utilisées en clinique et dans les études post-mortem pour la détection des mutations potentiellement impliquées dans les canalopathies cardiaques étaient basées soit sur le séquençage direct des gènes d'intérêt (Creighton, Virmani et al. 2006) soit sur le séquençage ciblé par polymorphisme de conformation simple brin (SSCP) (Chugh, Senashova et al. 2004, Di Paolo, Luchini et al. 2004) ou par chromatographie liquide dénaturante haute performance (DHPLC) (Lai, Su et al. 2005, Napolitano, Priori et al. 2005, Tester and Ackerman 2005).

Le séquençage direct présente le niveau de résolution le plus élevé pour rechercher la présence de mutations ponctuelles dans un gène, il reste néanmoins coûteux et souvent réservé à des gènes constitués d'exons en nombre limités et de petites tailles. Les méthodologies de criblage par SSCP ou DHPLC ont comme principal avantage de rationaliser la détection des variants en ciblant le séquençage et en réduisant par là même le coût des investigations moléculaires tout en permettant, tout comme le séquençage direct, d'identifier des variants connus ou non connus (Krypuy, Ahmed et al. 2007). La technique HRM présente le même avantage que ces deux techniques avec, au vu de la littérature, plusieurs atouts supplémentaires. En effet, cette nouvelle technologie en pleine émergence, principalement utilisée en oncologie lorsque nous avons débuté notre travail, était décrite comme une technologie simple, rapide, présentant une excellente sensibilité et reproductibilité permettant la détection de substitution de base et de délétions/insertions de petite taille correspondant aux variations génétiques les plus fréquemment décrites dans les canalopathies. Par conséquent, la technique HRM nous a semblé être une réelle alternative aux méthodes précédemment utilisées pour la détection de variants sur les gènes impliqués dans les canalopathies cardiaques.

Afin d'évaluer l'efficacité de cette technologie, il nous a fallu choisir un premier gène d'investigation parmi les 14 gènes décrits dans la littérature comme étant impliqués dans les canalopathies cardiaques lorsque ce travail de thèse a été débuté. Cette sélection s'est basée sur plusieurs critères : i) le gène KCNQ1 et le gène RyR2 étaient les gènes les plus fréquemment décrits comme étant le siège de mutations; ii) ces deux gènes jouent un rôle

important respectivement dans le syndrome du QT long et dans la TVPC qui ont été impliqués dans la survenue de mort subite chez l'adulte jeune, l'enfant et le nourrisson iii) le nombre d'exons du gène KCNQ1, à savoir 16 exons versus 105 exons pour le gène RyR2, facilitait nos investigations ; iiiii) les mutations répertoriées dans la littérature sur le gène KCNQ1 étant pour la majorité d'entre elles des substitutions (80 %) et des insertions/délétions (20 %) (<http://www.fsm.it/cardmoc/>), la technique HRM permettait en théorie de détecter la plupart d'entre elles.

#### **IV.2.1 Optimisation de la technique HRM au niveau du gène KCNQ1**

Les résultats obtenus dans ce travail ont montré que la technique HRM, appliquée à des prélèvements tissulaires FFIP et congelés prélevés simultanément chez le même individu, a pu être optimisée pour 13 des 16 exons du gène KCNQ1, les trois exons restants (exons 1,13 et 16) devant être explorés par séquençage direct. En effet, pour ces trois exons la qualité des amplicons était insuffisante pour permettre une interprétation optimale des courbes de fusion malgré plusieurs tentatives d'optimisation des réactions d'amplification en utilisant différents couples d'amorces et différentes conditions d'amplification (modification de la concentration d'ADN et de MgCL<sub>2</sub>, variation du nombre de cycles de PCR).

Millat et al. (Millat, Chanavat et al. 2011) ont rencontré sensiblement les mêmes difficultés dans leur étude portant sur un panel de 34 patients chez lesquels un syndrome de QT long était suspecté. En effet, il a été décrit que malgré l'utilisation de différents kits (lightCycler 480 High Melting Master kit, le kit Light cycler 480 Probes Master associé au SYTO 9 et enfin le SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix) comportant notamment différents types d'agents intercalants, il n'a pas été possible d'optimiser la technique HRM pour les exons 1 et 16 du gène KCNQ1. Une des hypothèses qui pourrait être retenue afin d'expliquer la différence de résultats concernant l'exon 13 entre nos deux études serait l'utilisation par Millat et al. à la fois d'une plateforme et d'un logiciel différents (à savoir la plateforme Rotor-Gene 6000 de Qiagen) ainsi que d'un kit PCR différent (à savoir le kit LightCycler® 480 Probes Master associé à l'intercalant SYTO-9).

Par ailleurs, l'étude de Millat et al. a également mis en évidence que les conditions d'optimisation de la technique HRM sont extrêmement variables d'un gène à l'autre. Si l'optimisation de la technique a été possible pour l'ensemble des exons du gène SCN5A (soit 28 exons) (Millat, Chanavat et al. 2009), seuls 3 des 15 exons du gène KCNH2 ont pu être

explorés par le HRM (Millat, Chanavat et al. 2011). Par conséquent, l'exploration de ces trois principaux gènes impliqués dans le syndrome du QT nécessite le couplage de la technique HRM au séquençage direct de certaines portions codantes des gènes d'intérêt.

#### **IV.2.2 Evaluation de la reproductibilité de la technique HRM sur les échantillons FFIP par comparaison aux échantillons congelés**

Dans notre étude, la comparaison des courbes de fusion entre prélèvements FFIP et congelés retrouve une concordance pour la majorité des exons pour lesquels la technique HRM a été optimisée (soit 11 exons). En revanche, pour deux exons (exons 5 et 14) les résultats ne sont pas reproductibles entre échantillons FFIP et congelés en raison de la détection de faux positifs parmi les prélèvements FFIP correspondant à l'incorporation lors de l'amplification d'une base erronée par la polymérase en raison de modifications chimiques induites par le formaldéhyde au niveau des acides aminés. Le phénomène de détection de faux positifs par la technique HRM lors de l'exploitation de prélèvements FFIP, a également été rapporté dans des études portant sur des gènes impliqués dans le cancer colorectal (EGFR, KRAS) ou (AKT1) (Do, Krypuy et al. 2008, Do, Solomon et al. 2008, Heideman, Thunnissen et al. 2009, Ma, Wong et al. 2009). Alors que ce phénomène est décrit par certains (Do and Dobrovic 2012) comme étant échantillon dépendant, dans notre étude les faux positifs ne s'observent que pour ces deux exons et ce pour l'ensemble des échantillons FFIP quel que soit la durée de fixation dans le formol. En principe, certains amplicons sont plus enclins à être le siège d'artefacts de séquence en raison de leur plus grande taille et de leur plus grande richesse en bases CG, correspondant à des sites potentiels de désamination (Do and Dobrovic 2012). Or dans notre étude, les exons 5 et 14 font partie des amplicons de plus petite taille (respectivement 171 et 107 bp) et ne présentent pas une séquence plus riche en bases GC que les autres amplicons. Ainsi, aucune explication ne peut être donnée à ce phénomène dans ce cas précis.

### **IV.2.3 Apport de la technique HRM comparativement à la méthode de choix par séquençage direct pour l'exploration du gène KCNQ1**

La technique HRM s'est révélé être une méthode présentant un protocole simple et dont les différentes étapes sont réalisées dans un même tube ce qui évite les problèmes de contamination. La préparation d'une plaque de 96 puits et l'analyse sont réalisées en moins de 4 heures. Le faible coût des réactifs, la possibilité de réaliser le séquençage directement à partir du produit d'amplification obtenu sans être perturbé par les réactifs de la réaction HRM et la diminution du nombre de réactions de séquençage grâce à un séquençage plus ciblé rendent également cette technique très attractive.

Compte tenu de la nécessité de séquencer les trois exons du gène KCNQ1 qui n'ont pas pu être optimisés avec la technique HRM et ce quel que soit le mode de conservation des échantillons et compte tenu de la nécessité de séquencer également les faux positifs lorsque les prélèvements FFIP constituent la seule source d'ADN disponible, nous pouvons nous interroger sur le réel intérêt de la technique HRM couplée au séquençage ciblé par rapport au séquençage direct. L'étude comparative en termes de temps de travail et d'investissement financier réalisée au sein de notre cohorte présentée en Annexe 7, permet d'apporter une réponse clairement positive à cette interrogation et ce quel que soit le type de prélèvements. **En effet, pour les prélèvements congelés, le couplage HRM-séquençage ciblé complété du séquençage direct des exons non optimisés versus le séquençage direct de l'ensemble des exons permet une réduction du coût des analyses de plus de 40 %. Pour les prélèvements FFIP, nous constatons une réduction de plus de 70 % du nombre de réactions de séquençage et par la même une réduction financière de plus de 30 %. Ce résultat atteste que la technique HRM couplée au séquençage ciblé et complétée du séquençage direct des exons non optimisés et/ou des faux positifs détectés constitue une stratégie à privilégier et ce quel que soit le type de prélèvement. (Farrugia, Keyser et al. 2012).**

#### IV.2.4 Prévalence des variants sur le gène **KCNQ1** au sein de la population d'étude

Au sein des 8 cas de mort subite inexplicée initialement inclus dans notre population d'étude, aucune mutation induisant une modification d'un acide aminé sur le gène **KCNQ1** n'a été détectée. En effet, parmi les quatre variants identifiés, ont été détectées des substitutions exoniques synonymes (p.D286D sur l'exon 6 et p.S546S sur l'exon 13), soit des substitutions ou délétions introniques (c.1590+14T>C sur l'intron 12 et c477+96delGG sur l'intron 2). Deux des quatre variants, à savoir p.S546S sur l'exon 13 et c.1590+14T>C sur l'intron 12, avaient déjà été décrits dans la littérature (Lee MP 1997, Iwasa H 2000, Jongbloed, Marcelis et al. 2002, Aydin, Bahring et al. 2005, Gouas, Nicaud et al. 2005). L'étude de Gouas et al. (Gouas, Nicaud et al. 2005) portant sur la recherche d'une association entre certains SNPs décrits sur les gènes codant pour les canaux ioniques cardiaques et la longueur du QT au sein d'une population saine par une méthode d'analyse de liaisons génétiques n'ont pas mis en évidence d'association entre les deux SNPs p.S546S et c.1590+14T>C et la longueur de l'intervalle QT. Ces conclusions confirmaient en partie celle émise dans une étude (Aydin, Bahring et al. 2005) qui portait sur une population saine de jumeaux monozygotes et dizygotes au sein de laquelle aucune association entre la longueur de l'intervalle QT et divers SNPs décrits sur des régions introniques et exoniques du gène **KCNQ1** dont le SNP p.S546S n'avait été mise en évidence.

Si l'on compare la faible prévalence de variant pathologique détecté dans notre cohorte comparativement aux études portant sur les investigations moléculaires post-mortem de la mort subite chez les sujets jeunes publiées ces dix dernières années, on constate un taux de détection de mutations sur le gène **KCNQ1** extrêmement variable. A titre d'exemple, le taux de mutations sur ce gène est de 0 % au sein d'une cohorte respectivement de 12 et 59 individus (Chugh, Senashova et al. 2004, Doolan, Langlois et al. 2004), 2 à 3 % au sein d'une cohorte respectivement de 33 cas, 35 cas et 44 cas (Edelmann, Schumann et al. 2011, Skinner, Crawford et al. 2011, Winkel, Larsen et al. 2012), 7 % dans deux cohortes de 14 cas (Creighton, Virmani et al. 2006, Allegue, Gil et al. 2011), 10 % dans une cohorte de 49 cas (Tester and Ackerman 2007) et 20 % dans une cohorte de 10 individus (Di Paolo, Luchini et al. 2004).

De même parmi les cohortes de syndrome de MSN ou « *sudden infant death syndrome* » la prévalence de mutation sur le gène **KCNQ1** varie de 1 % (Tester and Ackerman 2005,

Wedekind, Bajanowski et al. 2006, Otagiri, Kijima et al. 2008, Millat, Kugener et al. 2009) à 5 % (Arnestad, Crotti et al. 2007) selon les études pour atteindre un taux global de 2,2 % dont seulement 1 % peuvent être considérées comme délétères.

Par conséquent au vu de la petite taille de notre cohorte et de la variabilité du taux de détection post-mortem de mutations sur le gène *KCNQ1*, la prévalence retrouvée dans notre étude n'est pas contradictoire avec les données de la littérature.

Pour expliquer une telle variabilité on peut s'interroger sur l'existence de biais dans la sélection des individus inclus dans les différentes cohortes. Une étude récemment publiée par Winkel et al (Winkel, Larsen et al. 2012), souligne notamment que la prévalence des variants pathologiques sur les trois principaux gènes impliqués dans le syndrome du QT long (*KCNQ1*, *KCNH2* et *SCN5A*) varie de 9 à 11 % versus 20 à 21 % selon que la population de référence soit « non sélectionnée » ou sélectionnée en fonction des antécédents familiaux.

### **IV.3 Apport du génotypage par spectrométrie de masse MALDI-TOF pour la détection de variant sur le gène RyR2**

En parallèle des gènes impliqués dans le syndrome du QT long, nous nous sommes également intéressés au gène *RyR2* impliqué dans la tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique qui peut conduire à la survenue d'une mort subite principalement chez l'adulte jeune et l'enfant ainsi que chez le nourrisson selon certains auteurs. Le diagnostic post-mortem et le dépistage familial de cette canalopathie sont d'autant plus justifiés par le fait que l'ECG de repos enregistré en dehors des épisodes de tachycardie ventriculaire est souvent normal et qu'en absence de traitement la mortalité des TVPC est très élevée.

Compte tenu de la grande taille du gène *RyR2* (105 exons) rendant son séquençage complet extrêmement laborieux, les stratégies développées jusqu'alors en clinique et en post-mortem étaient basées principalement sur le séquençage ciblé d'un nombre variable d'exons (de 18 à 64 selon les études) situés dans trois « régions chaudes » ou « *hot spot* » au niveau desquelles

se distribuait la majorité des mutations (Postma, Denjoy et al. 2005, Medeiros-Domingo, Bhuiyan et al. 2009).

Compte tenu des difficultés rencontrées lors de la seconde étape de ce travail de thèse pour optimiser la technique HRM à l'ensemble des exons du gène *KCNQ1* à partir de prélèvements FFIP, de l'étude de Millat et al. (2009) qui était confrontée également à une optimisation aléatoire de la technique en fonction des gènes explorés, nous nous sommes orientés vers une autre stratégie de détection de variants génétiques.

Notre attention s'est donc portée sur le génotypage à l'aide de la plateforme MassArray® 96 de Sequenom pour plusieurs raisons. Premièrement, l'efficacité de cette méthode pour la détection en clinique et en post-mortem des SNPs connus sur les gènes impliqués dans le syndrome du QT long avait déjà été démontrée par Allegue et al. (Allegue, Gil et al. 2010, Allegue, Gil et al. 2011). Deuxièmement, le génotypage de SNP par la technologie iPLEX® Gold, basée sur la discrimination allélique par extension d'amorces simple base, semblait adapté à l'analyse d'ADN dégradé provenant de prélèvements FFIP (Mendisco, Keyser et al. 2011). Enfin nous disposons de cette plateforme au laboratoire.

### **IV.3.1 Optimisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour la détection des SNPs d'intérêt sur le gène *RyR2***

La stratégie de détection des SNPs par la spectrométrie de masse sur la plateforme de Sequenom s'est avérée être une méthode extrêmement intéressante pour son application sur le gène *RyR2*. Par comparaison avec la méthode HRM, la spectrométrie de masse MALDI-TOF nécessite beaucoup moins de temps et de manipulations pour optimiser les réactions. En effet la plateforme MassArray® bénéficie d'un logiciel intégré qui crée à la fois les amorces PCR et SBE et qui définit le multiplexage des réactions. Il s'agit en effet d'une méthode qui présente un taux de multiplexage élevé allant jusqu'à 36 SNPs selon certains auteurs (Gabriel, Ziaugra et al. 2009) et qui nous a permis d'analyser simultanément jusqu'à 29 positions ce qui est très intéressant en comparaison avec les autres techniques de génotypage tel que le SNaPshot permettant à titre d'exemple un multiplexage maximal de 15 SNPs dans une étude portant sur le gène *KCNQ1* et *KCNH2* (Edelmann, Schumann et al. 2012). De plus le logiciel intégré permet de réajuster assez facilement les réactions multiplexes créées en enlevant ou en rajoutant un SNP. Cette flexibilité permet d'intégrer au fur et à mesure de leur découverte de nouveaux SNPs. Or compte tenu du nombre croissant de nouveaux variants décrits sur le gène *RyR2* (soit 44 % des variants détectés au sein d'une population de 155 patients dans l'étude



de Medeiros et al. 2009, ou 71 % des variants détectés au sein d'une population de 74 cas dans l'étude de Larsen et al. 2012) cette particularité constitue un atout majeur pour l'investigation de ce gène. Enfin, le protocole est extrêmement simple et rapide. Les résultats pour 96 réactions peuvent être obtenus après une seule journée de manipulations et l'ensemble des étapes étant réalisées du début à la fin dans le même tube cela évite également les problèmes de contamination, de perte de produits ou d'erreurs lors des manipulations.

Malgré tous ses avantages nous avons souligné une limite importante à prendre en compte dans l'approche diagnostique des canalopathies. En effet, sur les 140 SNPs d'intérêt, nous ne sommes pas parvenus à créer les amorces SBE pour 35 SNPs et ce malgré la combinaison d'un design manuel et automatique. La raison de cet échec est liée à la proximité de la position des SNPs sur la séquence. Ainsi, une étape de séquençage des régions sur lesquelles se trouvaient les 35 SNPs non optimisés a été nécessaire pour compléter l'analyse. Par conséquent malgré la performance du logiciel de design intégré à la plateforme et malgré les adaptations que l'on peut parfois apporter lors du design manuel, seuls les SNPs ayant une position suffisamment éloignée sur la séquence peuvent être explorés par la technologie iPLEX Gold associé au système MassArray®.

Une fois cette limite franchie cette technologie s'avère être très performante pour la détection des SNPs d'intérêt sur le gène RyR2 avec une reproductibilité variable selon la qualité des prélèvements.

### **IV.3.2 Evaluation de la reproductibilité de la spectrométrie de masse MALDI-TOF sur les échantillons congelés et FFIP**

Si l'application de la technologie iPLEX® Gold de Sequenom avait déjà été décrite sur des prélèvements dégradés (Mendisco, Keyser et al. 2011) et FFIP (Horn, Pott et al. 2010), aucune étude antérieure n'avait comparé la reproductibilité de cette technique à partir de prélèvements appariés FFIP et congelés.

Les résultats que nous avons obtenus sur les prélèvements congelés sont fiables et reproductibles. En effet, pour les deux expériences réalisées en duplicat nous avons obtenu un taux d'assignement (*call rate*) élevé de 97,1 % avec une concordance de 100 % entre les deux expériences attestant d'une très bonne reproductibilité.

En revanche, nous observons à la fois une discordance entre les données du génotypage obtenus entre les deux expériences réalisées en duplicat à partir des prélèvements FFIP (moins de 6,4 %) et entre les expériences réalisées à partir des prélèvements congelés et FFIP (moins de 6 %). De plus, parallèlement à la diminution du taux d'assignement pour les prélèvements FFIP comparativement aux prélèvements congelés, on note une augmentation des génotypes de « faible qualité » d'environ 7 % pour les prélèvements FFIP. Une étude de Horn et al. (Horn, Pott et al. 2010) portant sur l'évaluation de la reproductibilité et la faisabilité de la spectrométrie de masse MALDI-TOF sur des prélèvements FFIP retrouve des résultats similaires. En effet dans son étude, la comparaison des résultats du génotypage de 31 SNPs entre échantillons FFIP et prélèvements sanguins appariés révèle un taux d'assignement de 93 % pour les échantillons FFIP versus 99,8 % pour les échantillons congelés avec une légère augmentation des génotypes de « faible qualité » pour l'ADN extrait de prélèvements FFIP.

Ce phénomène de non reproductibilité des analyses et de moindre qualité des génotypes assignés par le logiciel est secondaire à l'état de dégradation de l'ADN extrait de prélèvements FFIP. D'une part, cette dégradation peut conduire de manière aléatoire à un défaut d'amplification ou un défaut d'ancrage de l'amorce SBE aboutissant à un défaut d'assignement par le logiciel. D'autre part, les modifications chimiques induites par le formaldéhyde au niveau de l'ADN vont conduire à l'incorporation d'une base erronée par la polymérase conduisant à la détection de faux positifs. Parmi les principaux artéfacts de séquence détectés dans notre étude, les transitions C>T et G>A se sont avérées être les plus fréquentes ce qui rejoint les données de la littérature. En effet, ces modifications de base, principalement secondaires à la désamination de la cytosine en uracile, sont les plus fréquemment décrites lors d'analyses moléculaires réalisées à partir d'ADN extrait de prélèvements FFIP (Hansen, Willerslev et al. 2001, Hofreiter, Jaenicke et al. 2001, Do and Dobrovic 2012) mais également à partir d'ADN ancien (Gilbert, Hansen et al. 2003, Willerslev and Cooper 2005).

Compte tenu de ces résultats, la validation des génotypes obtenus avec la plateforme MassArray® à partir d'ADN extrait de prélèvements FFIP, dans l'hypothèse qu'il s'agisse de la seule source d'ADN disponible, nécessite certaines précautions. Nous proposons que les analyses soient systématiquement répliquées à partir d'un nouveau produit d'amplification et que les résultats ne soient validés que si le degré de confiance de l'assignement fourni par le logiciel est élevé (« *conservative* » ou « *moderate* ») avec une concordance de l'assignement

au niveau des deux analyses. Tout autre résultat nécessite à notre avis un séquençage direct de la séquence d'intérêt (article soumis).

### **IV.3.3 Prévalence des variants sur le gène RyR2 au sein de la population d'étude**

Au sein de notre population d'étude composée de 12 cas de mort subite inexplicée, nous avons identifié trois variants non-synonymes à savoir p.Q2958R chez 8 individus soit 66 % de notre cohorte, p.G1886S chez un individu (8 %) et p.G1885E chez un autre individu (8 %). Ces trois variants avaient été précédemment décrits dans la base de données dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>) et dans la littérature comme des polymorphismes fréquents ( $p > 0,1$ ) (p.Q2958R) et peu fréquents ( $p < 0,1$ ) (p.G1886S, p.G1885E). Dans son étude Medeiros et al. retrouvaient ces polymorphismes au sein d'une population témoin composée de 100 caucasiens à une fréquence respectivement de 34 % (p.Q2958R), 9 % (p.G1886E) et 6 % (p.G1885S). Aucun individu de notre cohorte n'était porteur des deux variants p.G1886E et p.G1885S dont l'expression combinée au sein d'un système d'expression hétérologue (cellules rénales embryonnaires humaines *HEK293*) a été associée à une augmentation des oscillations du calcium intracellulaire comparativement aux canaux RyR2 de type sauvage (Milting, Lukas et al. 2006, Koop, Goldmann et al. 2008). Le quatrième variant non synonyme que nous avons détecté, p.V501I, n'était pas rapporté dans la base de données dbSNP mais avait été considéré par Medeiros comme étant un polymorphisme compte tenu de sa fréquence quasi-identique au sein de la cohorte de malades (4%) et de la cohorte de cas contrôles (5 %) (Medeiros-Domingo, Bhuiyan et al. 2009). Au total, aucun variant potentiellement pathologique n'a été identifié au sein de la cohorte sur le gène RyR2.

La comparaison du taux de variants pathologiques détectés dans notre cohorte sur le gène RyR2 comparativement aux études portant sur les investigations moléculaires post-mortem de la mort subite chez les sujets jeunes publiées ces dix dernières années souligne comme pour le gène *KCNQ1*, la très grande variabilité de ce taux. Selon les travaux précédemment publiés, le taux de détection de variants pathologiques varie de 0 % pour une cohorte de 35 individus (Carturan, Tester et al. 2008) jusqu'à 21 % pour une cohorte de 14 individus (Creighton, Virmani et al. 2006). Dans la principale cohorte de syndrome de MSN au sein de laquelle les

mutations sur le gène RyR2 ont été recherchées, le taux de mutations délétères s'élève à 1,5 % (Tester, Dura et al. 2007).

Une telle variabilité peut être expliquée par le nombre différent d'exons ciblés par le séquençage direct dans chacune de ces études. Cependant, les critères d'inclusion des individus au sein de la population d'étude constituent également un biais potentiel de sélection à ne pas négliger (Winkel, Larsen et al. 2012).

## **IV.4 Limites et perspectives**

### **IV.4.1 Du point de vue du recrutement**

La principale limite de notre travail de thèse réside dans le recrutement très restreint de cas au sein de notre population d'étude. Ce faible recrutement peut s'expliquer à la fois par la faible incidence de mort subite cardiaque sans anomalie structurale du cœur parmi les cas autopsiés à l'Institut de Médecine légale de Strasbourg depuis 2008 et par le faible nombre d'autopsies médico-légales requises par le magistrat dans un contexte de mort subite de l'adulte jeune. En France, la grande difficulté est que l'autopsie ainsi que les investigations complémentaires peuvent être proposées par le médecin légiste mais seul le magistrat peut ordonner la réalisation ou non de ces investigations. Les dépenses induites par la réalisation de ces examens étant non négligeables, le magistrat refuse parfois des autopsies ou un complément d'investigations sur la foi de l'enquête initiale concluant rapidement à une mort naturelle ou un suicide (Quatrehomme and Rouge 2003). Ainsi, en France le taux d'autopsie médico-légale est encore très bas, compris entre 1 et 2 % de l'ensemble des décès annuels (soit environ 7000 autopsies par an sur le territoire français) contre 15 % en Finlande (Lorin de la Grandmaison, Sibille et al. 2001).

Par ailleurs les collaborations nationales et internationales initialement projetées se sont révélées peu suivies très certainement en raison de contraintes matérielles et financières.

Enfin, on constate que non seulement notre recrutement de cas est faible mais il existe également un biais de recrutement avec un taux de nourrissons inclus dans notre population d'étude qui s'élève à 50 %. Ce biais de recrutement est probablement lié au nombre plus

fréquent d'autopsies médico-légales demandées par les magistrats dans un contexte de mort inattendue du nourrisson en raison certes de la nécessité d'éliminer une maltraitance mais également d'une sensibilité exacerbée des magistrats dans ce contexte tragique.

Ce travail souligne la nécessité d'améliorer la prise en charge des morts subites de l'adulte jeune au niveau du territoire nationale en agissant à différents niveaux.

1. Au niveau du parquet, il apparaît nécessaire de convaincre les magistrats qu'au-delà de leur mission judiciaire ils ont également une mission de santé publique et jouent un rôle clé dans la démarche diagnostique des canalopathies cardiaques et des autres maladies cardiaques héréditaires et par la même dans la prévention de survenue de nouvelle mort subite chez les apparentés. Cependant la question du financement des investigations moléculaires reste pour le moment sans réponse et constitue probablement le principal frein à toute cette problématique ;
2. Auprès des médecins généralistes et médecins du SAMU amenés à constater les décès, une action de sensibilisation et d'information sur la nécessité de cocher « obstacle médico-légale » lors d'un mort subite survenant chez un adulte jeune permettrait d'augmenter le nombre d'enquêtes ouvertes par la parquet en sachant cependant qu'en fonction des données de l'enquête le magistrat peut tout à fait décider de ne pas ordonner d'autopsie ;
3. Auprès des médecins légistes, la définition de recommandations officielles par la Société française de médecine légale en se basant sur les protocoles déjà établis permettrait d'harmoniser les protocoles de prélèvements en cas de mort subite inexplicée. Il s'agirait d'une démarche dans le sillage de celle déjà établit pour la prise en charge de la mort subite des nourrissons de moins de 2 ans établit par la Haute Autorité de Santé en 2007 (Bloch, Denis et al. 2011).

#### **IV.4.2 Du point de vue méthodologique**

Notre travail a permis d'évaluer la faisabilité de deux techniques visant à détecter des variants génétiques sur des gènes connus à savoir une technique de criblage par HRM et une technique de génotypage par spectrométrie de masse à partir de prélèvements FFIP en utilisant comme contrôle des prélèvements congelés sur un nombre de gènes très restreint. Au vu des résultats

obtenus et de la comparaison de ces derniers avec la littérature nous pouvons confronter les avantages et les limites de chacune de ces méthodes et dégager de nouvelles perspectives.

La technique de génotypage sur la plateforme MassARRAY est une technique pour laquelle l'optimisation et les analyses sont extrêmement simples et rapides qui est adaptée aux prélèvements dégradés tels que les prélèvements FFIP sous réserve que les expériences soient répliquées afin d'augmenter le taux d'assignement et le taux de détection de faux positifs. Cependant, cette méthode ne permet pas de s'affranchir du séquençage direct en raison de l'impossibilité d'intégrer certains SNPs au sein des multiplexes du fait de leur position trop proche sur la séquence. De plus, malgré la grande flexibilité du logiciel de design des multiplexes permettant d'intégrer de nouvelles mutations, cette stratégie de détection « avec à priori » (par opposition aux méthodes sans à priori qui permettent de détecter des mutations non connues) nécessite une réévaluation régulière des nouveaux variants décrits avec une répétition des analyses autant de fois que de nouvelles mutations sont détectées ce qui alourdit le temps et le coût des investigations. Par conséquent et malgré son application adaptée aux prélèvements FFIP, cette méthodologie ne nous semble pas la plus pertinente pour détecter les variants génétiques potentiellement impliqués dans les canalopathies cardiaques congénitales.

La méthode HRM considérée comme une méthode « sans a priori » permettant de détecter des variants génétiques connus ou non connus offre des perspectives intéressantes. Cependant son application sur les prélèvements FFIP reste longue à optimiser avec des résultats ne pouvant parfois être interprétés, nécessitant le recours au séquençage direct. De plus, l'optimisation de la technique n'est pas uniforme selon les gènes si bien que le séquençage direct des exons non optimisés voir de la quasi-totalité de certains gènes (KCNH2) s'avère nécessaire. Malgré ces limites l'utilisation de la technique HRM-séquençage ciblé complété d'un séquençage direct des exons non optimisés reste une alternative de choix au séquençage direct des principaux gènes impliqués dans les canalopathies cardiaques.

Le « saut technologique » que connaît la biologie moléculaire avec l'arrivée des séquenceurs de nouvelles générations haut débit « *next generation sequencing* » (NGS) ouvre de nouvelles perspectives. Le développement très récent des séquenceurs de 2<sup>ème</sup> générations de paillasse (Ion Torrent PGM de Life technology, MiSeq de Illumina, GS Junior de Roche) dont la vocation est de séquencer un grand nombre d'échantillons sur de petites régions ou des petits génomes avec un débit compris entre quelques mégabases (3 Mb) et des unités de gigabase (7 Gb) permettent d'envisager l'application en routine de cette nouvelle technologie.

La firme Life technologie propose d'ailleurs un kit de détection des pathologies héréditaires (*Ion ampliSeq<sup>TM</sup> Inherited Disease Panel*) adapté au séquenceur Ion torrent PGM, permettant le séquençage d'un panel de 325 gènes impliqués dans diverses pathologies héréditaires cardio-vasculaires, neuromusculaires et métaboliques grâce à 10500 couples d'amorces ([http://tools.invitrogen.com/content/sfs/brochures/CO25400\\_Ion\\_InheritDisease\\_Flyer\\_17July2012.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/brochures/CO25400_Ion_InheritDisease_Flyer_17July2012.pdf)). On compte notamment au sein de ce panel 19 gènes des 21 gènes connus actuellement pour être impliqués dans les canalopathies cardiaques. Malgré l'attrait évident de ce kit, son application dans le domaine médico-légal ne peut être envisagée pour deux raisons principales. L'utilisation de ce kit générerait des quantités très importantes de données dont 96 % n'aurait aucun intérêt dans le cadre de notre problématique et dont la gestion ne serait pas totalement maîtrisée et encore moins automatisée avec un coût d'analyse et d'interprétation important. De plus, cela soulèverait un véritable problème éthique puisque le médecin légiste ne peut pas avoir accès à des informations autres que celles lui permettant de connaître les causes du décès.

Le projet de développement d'un « kit à façon » ciblant l'ensemble des gènes connus actuellement pour être impliqués dans les canalopathies cardiaques nous semble par conséquent judicieux. L'estimation du coût d'un tel projet s'élève aux environs de 4000 euros pour explorer 21 gènes chez 8 individus sur une puce de 316 puits, auxquels s'ajoutent le coût des couples d'amorces (environ 10 000 euros pour 3000 réactions). Avec un tel kit il ne serait cependant pas possible d'explorer l'intégralité des régions ciblées, le taux de couverture total du séquençage s'élevant à 90 %. Cependant il s'agit encore d'une technologie très récente dont le développement et l'optimisation vont continuer à progresser et l'on peut envisager que le taux de couverture maximum sera probablement atteint dans un avenir proche.

#### **IV.4.3 Corrélation entre le diagnostic moléculaire et la cause de la mort**

Les canalopathies cardiaques sont des maladies génétiques dont la complexité conduit le plus souvent à des conclusions hypothétiques quant au lien éventuel entre une variation génétique donnée et la cause du décès. Plusieurs cas de figure existent.

Premièrement, lorsqu'aucune mutation n'est détectée parmi les régions codantes des gènes d'intérêt cela ne permet pas d'exclure l'existence de variants génétiques au niveau de ces gènes sur des zones non codantes jouant un rôle soit dans l'expression du gène (région

promotrice) soit dans le bon déroulement de l'épissage ou au niveau des gènes encore non connus pour être impliqués dans cette pathologie.

Deuxièmement, lorsqu'une mutation est identifiée, l'enjeu primordial est de comprendre et prédire les effets de ces variations génétiques sur le phénotype de l'individu. Lorsqu'aucune donnée de la littérature n'est disponible, l'impact fonctionnel d'une mutation peut être évalué par différentes stratégies :

- les outils bio-informatique de prédiction des effets délétères des mutations tel que Polyphen (*Polymorphism Phenotyping*) ou SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*) qui ont l'avantage d'être rapide à mettre en œuvre et très peu onéreux mais qui constituent uniquement des outils d'orientation (Giudicessi, Kapplinger et al. 2012);
- les systèmes d'expression hétérologue tels que les lignées murines (Nishio, Kuwahara et al. 2009), les ovocytes de xénopes (Keller, Grenier et al. 2009), les lignées cellulaires CHO « *Chinese Hamster Ovary* » (Yang, Chung et al. 2009) ou encore les cellules embryonnaires HEK293 (Berecki, Zegers et al. 2006), qui ne sont pas toujours transposables à la physiologie humaine *in vivo* ;
- les cellules pluripotentes induites (IPS pour *induced pluripotent stem cells*) issues de cellules adultes différenciées redevenues pluripotentes par des modifications génétiques qui sont une réelle alternative aux systèmes hétérologues (Moretti, Bellin et al. 2010) mais qui reste encore peu applicable en routine et notamment pas à partir de tissu recueillis en post-mortem ;

Sachant qu'à l'heure actuelle très peu de mutations identifiées sur les gènes impliquées dans les canalopathies cardiaques ont bénéficié d'explorations fonctionnelles permettant de prédire leur pathogénicité (seuls 15 % des mutations sur le gène RyR2 ont été exploré *in vitro* (Medeiros-Domingo, Bhuiyan et al. 2009) le véritable enjeu reste la compréhension de l'association génotypique-phénotypique.





## Conclusion générale

La cause de décès demeure inexplicée dans 3 à 30 % des cas de mort subite survenant chez le sujet de moins de 35 ans et les canalopathies cardiaques constituent la principale hypothèse étiologique. Dans ces conditions, les investigations génétiques effectuées sur du matériel biologique prélevé en post-mortem visant à détecter des variants potentiellement délétères sur les gènes connus pour être impliqués dans les canalopathies cardiaques suscitent un grand intérêt tant dans le domaine médico-légal, pour établir la cause éventuelle du décès, que dans le domaine clinique, pour mettre en place les mesures de dépistage et de prévention chez les apparentés du défunt.

Sur le territoire national, la prise en charge des cas de mort subite inexplicée au cœur structurellement sain est extrêmement disparate selon les services médico-légaux. La réalisation de prélèvements tissulaires ou sanguins congelés est une pratique peu fréquente lors de l'autopsie, en raison des contraintes matérielles qu'elle impose, si bien que la principale source d'ADN disponible en vue d'investigations moléculaires post-mortem s'avère être issue des prélèvements FFIP.

La principale difficulté rencontrée lors de l'exploitation d'ADN humain à partir de prélèvements FFIP s'avère être la nature fragmentée et dégradée de l'ADN induite par le formaldéhyde. Au vu de la diversité des protocoles d'extraction décrits dans la littérature à partir de prélèvements FFIP et des conclusions parfois contradictoires entre les études, nous avons dans un premier temps comparé trois protocoles d'extraction en émettant l'hypothèse qu'un protocole adapté à l'ADN ancien associant une extraction organique à une extraction-purification basée sur l'affinité de l'ADN pour la silice pouvait également l'être à l'ADN extrait de prélèvements FFIP compte tenu de leurs caractéristiques communes quant aux processus de dégradation de l'ADN. Les résultats obtenus dans ce travail ont montré que comparativement à l'utilisation unique du kit commercial QIAamp DNA mini® de Qiagen, les deux protocoles associant une extraction organique et un kit commercial dédié à l'ADN dégradé (CleanMix, Talent et QIAamp DNA mini®, Qiagen) basés sur une purification respectivement sur billes et colonnes à membrane de silice ont permis d'augmenter la quantité moyenne d'ADN extrait d'un facteur respectivement de 2,4 et 5,8 de manière statistiquement significative ( $p < 0,05$ ). L'étape du phénol-chloroforme semble par conséquent améliorer l'élimination à la fois des produits potentiels pouvant interférer avec l'affinité de la molécule

d'ADN pour la matrice de silice et des inhibiteurs de la PCR. L'efficacité supérieure du kit QIAamp DNA mini® comparativement au kit CleanMix apparaît liée à la composition de son tampon.

La première étape de nos travaux a donc permis de valider un protocole d'extraction purification d'ADN associant le phénol-chloroforme au kit QIAamp DNA mini® qui n'avait encore jamais été décrit dans la littérature pour l'extraction d'ADN à partir de prélèvements FFIP (Farrugia, Keyser et al. 2010) et que nous avons appliqué à l'ensemble des échantillons FFIP des cas inclus dans notre population d'étude.

Le recrutement de ces derniers s'est fait de manière prospective durant quatre années (de 2008 à 2011 inclus) après l'élaboration d'un protocole définissant les critères d'inclusion et les prélèvements à réaliser auprès des cas de mort subite inexplicée autopsiés à l'Institut de Médecine légale de Strasbourg. La diffusion de ce protocole à deux autres services de Médecine légale (Reims et Bonn, Allemagne) a également été réalisée afin d'élargir le recrutement, malheureusement ces collaborations n'ont pas été suivies très probablement en raison de contraintes financières et matérielles. Au total, 12 cas ont été inclus dont 50 % correspondaient à des nourrissons de moins d'un an.

A partir de cette cohorte, nous avons deux objectifs principaux. D'une part, nous souhaitions évaluer l'efficacité et l'application en routine de deux techniques de détection de variants : l'une de criblage par la technique HRM et l'autre de génotypage par spectrométrie de masse MALDI-TOF respectivement sur le gène KCNQ1 et le gène RyR2 à partir d'ADN extraits de prélèvements FFIP en utilisant les prélèvements congelés comme prélèvements de références. D'autre part nous envisageons d'évaluer la pathogénicité des éventuelles mutations identifiées afin de pouvoir mettre en place les mesures de prévention adéquates chez les apparentés du défunt.

L'application de la technologie par spectrométrie de masse MALDI-TOF avait déjà été rapportée dans la littérature sur différents gènes impliqués dans le syndrome du QT long (KCNQ1, KCNH2, SCN5A), mais aucune étude ayant recours à cette technologie n'avait porté jusqu'alors sur le gène RyR2 dont la grande taille constituait une limite à son séquençage complet. Nos résultats ont démontré que la technologie de génotypage iPLEX Gold développée pour la plateforme MassARRAY de Sequenom est adaptée pour la détection de SNPs à partir d'ADN extrait de prélèvements FFIP à condition de répéter l'expérience et avec comme principale limite la possibilité de détecter uniquement des mutations connues

sous réserve que leur position sur la séquence soit suffisamment éloignée afin de ne pas limiter le « design » des amorces simple base. Compte tenu du nombre croissant de mutations décrites sur les gènes d'intérêt, de la nécessité de recourir au séquençage de type Sanger pour explorer les régions sur lesquelles se situent les SNPs non intégrés dans les multiplexes et malgré la flexibilité du logiciel de design, cette stratégie ne nous semble pas la plus pertinente pour détecter les variants génétiques potentiellement impliqués dans les canalopathies cardiaques congénitales.

A l'opposé de la technique précédente, la technique HRM couplée au séquençage ciblé permet la détection de nouvelles mutations mais présente une optimisation aléatoire selon les exons au vu des résultats de notre étude mais également selon les gènes au vu des données de la littérature. Cette optimisation est d'autant plus longue à mettre en œuvre lors de l'exploitation de prélèvements FFIP et aboutit parfois à des résultats non interprétables. Ce caractère aléatoire implique alors le recours au séquençage direct sur les gènes ou portions de gènes non optimisés ou lors de l'obtention de courbes de fusion non interprétables. Malgré ces limites, notre travail prouve que la technique HRM couplée au séquençage ciblé reste plus économique que le séquençage systématique de l'ensemble du gène KCNQ1 et ce même lors de l'exploitation de prélèvements FFIP (Farrugia, Keyser et al. 2012).

Ce travail a permis de prouver que l'exploitation des prélèvements FFIP par les deux méthodes est possible sous certaines conditions de conservation et selon une stratégie d'investigation définie malgré les artefacts induits. Cependant, afin de faciliter l'optimisation des techniques et de réduire le nombre de séquençage direct pour détecter des faux positifs, il convient de privilégier la conservation par congélation des prélèvements autopsiques destinés aux investigations moléculaires.

L'arrivée des séquenceurs de nouvelles générations dit « de pailleuse » relance le débat sur les stratégies d'investigations des canalopathies cardiaques et ouvre de nouvelles perspectives en termes d'efficacité et de rapidité de mise en œuvre. Cependant, la technologie NGS génère des données dont la pertinence reste à évaluer de même que son application sur les prélèvements FFIP.

Au sein de notre population d'étude, aucun variant potentiellement pathogène n'a été identifié sur les deux gènes KCNQ1 et RyR2. Seuls des variants synonymes ou des variants non synonymes décrits dans la littérature comme des polymorphismes plus ou moins fréquents ont été détectés. A ce stade de l'étude, aucune cause de décès n'a pu être établie et dès lors,

aucune mesure de dépistage clinique ou génétique n'est actuellement justifiée auprès des apparentés du défunt. Par conséquent, il ne s'agit que d'une première étape et des investigations moléculaires au niveau des autres gènes s'avèrent indispensables. Le taux de recrutement très faible dans notre étude constitue certes la principale limite de notre travail mais souligne surtout la nécessité de mettre en place des mesures visant à améliorer la prise en charge des morts subites de l'adulte jeune dans le sillage de celle déjà établie par la Haute Autorité de Santé pour la prise en charge de la mort subite des nourrissons de moins de 2 ans.

A l'issue de ce travail et compte tenu de l'avancée technologique qui a eu lieu au cours de cette thèse, nous proposons comme stratégie future de diagnostic génétique post-mortem des canalopathies cardiaques à la fois d'harmoniser les pratiques médico-légales françaises en matière thanatologique et de prélèvements et d'y associer de manière ciblée la détection des mutations par les séquenceurs de nouvelles générations. Cette démarche permettra de se consacrer au véritable enjeu actuel qui est d'établir un lien entre le génotype identifié et le phénotype du patient décédé.

# **Bibliographie**



## A

- Ackerman, M. J., S. G. Priori, S. Willems, C. Berul, R. Brugada, H. Calkins, A. J. Camm, P. T. Ellinor, M. Gollob, R. Hamilton, R. E. Hershberger, D. P. Judge, H. Le Marec, W. J. McKenna, E. Schulze-Bahr, C. Semsarian, J. A. Towbin, H. Watkins, A. Wilde, C. Wolpert and D. P. Zipes (2011). "HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA)." *Heart Rhythm* 8(8): 1308-1339.
- Ackerman, M. J., B. L. Siu, W. Q. Sturner, D. J. Tester, C. R. Valdivia, J. C. Makielski and J. A. Towbin (2001). "Postmortem molecular analysis of SCN5A defects in sudden infant death syndrome." *Jama* 286(18): 2264-2269.
- Ackerman, M. J., D. J. Tester and D. J. Driscoll (2001). "Molecular autopsy of sudden unexplained death in the young." *Am J Forensic Med Pathol* 22(2): 105-111.
- Ackerman, M. J., D. J. Tester, C. J. Porter and W. D. Edwards (1999). "Molecular diagnosis of the inherited long-QT syndrome in a woman who died after near-drowning." *N Engl J Med* 341(15): 1121-1125.
- Akane, A., K. Matsubara, H. Nakamura, S. Takahashi and K. Kimura (1994). "Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification." *J Forensic Sci* 39(2): 362-372.
- Allegue, C. (2010). Estudio genético de la muerte súbita cardíaca: Miocardiopatía hipertrofica familiar y síndrome de QT largo, Universidad de Santiago de Compostela.
- Allegue, C., R. Gil, A. Blanco-Verea, M. Santori, M. Rodríguez-Calvo, L. Concheiro, A. Carracedo and M. Brion (2011). "Prevalence of HCM and long QT syndrome mutations in young sudden cardiac death-related cases." *Int J Legal Med* 125(4): 565-572.
- Allegue, C., R. Gil, P. Sánchez-Diz, M. Torres, I. Quintela, A. Carracedo and M. Brion (2010). "A new approach to long QT syndrome mutation detection by Sequenom MassARRAY system." *Electrophoresis* 31(10): 1648-1655.
- Allouis, M., V. Probst, P. Jaafar, J. J. Schott and H. Le Marec (2005). "Unusual clinical presentation in a family with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia due to a G14876A ryanodine receptor gene mutation." *Am J Cardiol* 95(5): 700-702.
- Antonarakis, S. E. (1998). "Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group." *Hum Mutat* 11(1): 1-3.
- Antzelevitch, C., P. Brugada, M. Borggrefe, J. Brugada, R. Brugada, D. Corrado, I. Gussak, H. LeMarec, K. Nademanee, A. R. Pérez Riera, W. Shimizu, E. Schulze-Bahr, H. Tan and A. Wilde (2005). "Brugada syndrome: report of the second consensus conference: endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association." *Circulation* 111(5): 659-670.
- Arnestad, M., L. Crotti, T. O. Rognum, R. Insolia, M. Pedrazzini, C. Ferrandi, A. Vege, D. W. Wang, T. E. Rhodes, A. L. George, Jr. and P. J. Schwartz (2007). "Prevalence of long-QT syndrome gene variants in sudden infant death syndrome." *Circulation* 115(3): 361-367.
- Aydin, A., S. Bähring, S. Dahm, U. P. Guenther, R. Uhlmann, A. Busjahn and F. C. Luft (2005). "Single nucleotide polymorphism map of five long-QT genes." *J Mol Med (Berl)* 83(2): 159-165.



## B

- Basso, C., M. Burke, P. Fornes, P. J. Gallagher, R. H. de Gouveia, M. Sheppard, G. Thiene and A. van der Wal (2008). "Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death." *Virchows Arch* 452(1): 11-18.
- Basso, C., F. Calabrese, D. Corrado and G. Thiene (2001). "Postmortem diagnosis in sudden cardiac death victims: macroscopic, microscopic and molecular findings." *Cardiovasc Res* 50(2): 290-300.
- Bastiaenen, R. and E. R. Behr (2011). "Sudden death and ion channel disease: pathophysiology and implications for management." *Heart* 97(17): 1365-1372.
- Belloq, C., A. C. van Ginneken, C. R. Bezzina, M. Alders, D. Escande, M. M. Mannens, I. Baro and A. A. Wilde (2004). "Mutation in the KCNQ1 gene leading to the short QT-interval syndrome." *Circulation* 109(20): 2394-2397.
- Berecki, G., J. G. Zegers, Z. A. Bhuiyan, A. O. Verkerk, R. Wilders and A. C. van Ginneken (2006). "Long-QT syndrome-related sodium channel mutations probed by the dynamic action potential clamp technique." *J Physiol* 570(Pt 2): 237-250.
- Berge, K. E., K. H. Haugaa, A. Fruh, O. G. Anfinson, K. Gjesdal, G. Siem, N. Oyen, G. Greve, A. Carlsson, T. O. Rognum, M. Hallerud, E. Kongsgard, J. P. Amlie and T. P. Leren (2008). "Molecular genetic analysis of long QT syndrome in Norway indicating a high prevalence of heterozygous mutation carriers." *Scand J Clin Lab Invest* 68(5): 362-368.
- Bloch, J., P. Denis and D. Jezewski-Serra (2011). "Les Morts inattendues de nourrissons de moins de 2 ans- Enquête nationale 2007-2009." Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire, 56.
- Bray, M. S., E. Boerwinkle and P. A. Doris (2001). "High-throughput multiplex SNP genotyping with MALDI-TOF mass spectrometry: practice, problems and promise." *Hum Mutat* 17(4): 296-304.
- Brugada, P. and J. Brugada (1992). "Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report." *J Am Coll Cardiol* 20(6): 1391-1396.
- Brugada, R., K. Hong, R. Dumaine, J. Cordeiro, F. Gaita, M. Borggreffe, T. M. Menendez, J. Brugada, G. D. Pollevick, C. Wolpert, E. Burashnikov, K. Matsuo, Y. S. Wu, A. Guerschicoff, F. Bianchi, C. Giustetto, R. Schimpf, P. Brugada and C. Antzelevitch (2004). "Sudden death associated with short-QT syndrome linked to mutations in HERG." *Circulation* 109(1): 30-35.

## C

- Cao, W., M. Hashibe, J. Y. Rao, H. Morgenstern and Z. F. Zhang (2003). "Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells." *Cancer Detect Prev* 27(5): 397-404.
- Carturan, E., D. J. Tester, B. C. Brost, C. Basso, G. Thiene and M. J. Ackerman (2008). "Postmortem genetic testing for conventional autopsy-negative sudden unexplained death: an evaluation of different DNA extraction protocols and the feasibility of mutational analysis from archival paraffin-embedded heart tissue." *Am J Clin Pathol* 129(3): 391-397.
- Cerrone, M., B. Colombi, M. Bloise, C. Memmi, D. Monclavo, C. Napolitano, S. G. BRadley and S. G. Priori (2004). "Clinical and molecular characterization of a large cohort of patients affected with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia." *Circ* 110(Suppl. II): 552-553.

- Choi, G., L. J. Kopplin, D. J. Tester, M. L. Will, C. M. Haglund and M. J. Ackerman (2004). "Spectrum and frequency of cardiac channel defects in swimming-triggered arrhythmia syndromes." *Circulation* 110(15): 2119-2124.
- Chugh, S. S., O. Senashova, A. Watts, P. T. Tran, Z. Zhou, Q. Gong, J. L. Titus and S. J. Hayflick (2004). "Postmortem molecular screening in unexplained sudden death." *J Am Coll Cardiol* 43(9): 1625-1629.
- Cohle, S. D. and B. A. Sampson (2001). "The negative autopsy: sudden cardiac death or other?" *Cardiovasc Pathol* 10(5): 219-222.
- Corrado, D., C. Basso and G. Thiene (2001). "Sudden cardiac death in young people with apparently normal heart." *Cardiovasc Res* 50(2): 399-408.
- Coura, R., J. C. Prolla, L. Meurer and P. Ashton-Prolla (2005). "An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue." *J Clin Pathol* 58(8): 894-895.
- Creighton, W., R. Virmani, R. Kutys and A. Burke (2006). "Identification of novel missense mutations of cardiac ryanodine receptor gene in exercise-induced sudden death at autopsy." *J Mol Diagn* 8(1): 62-67.
- Crotti, L., G. Celano, F. Dagradi and P. J. Schwartz (2008). "Congenital long QT syndrome." *Orphanet J Rare Dis* 3: 18.

## D

- de Vreede-Swagemakers, J. J., A. P. Gorgels, W. I. Dubois-Arbouw, J. W. van Ree, M. J. Daemen, L. G. Houben and H. J. Wellens (1997). "Out-of-hospital cardiac arrest in the 1990's: a population-based study in the Maastricht area on incidence, characteristics and survival." *J Am Coll Cardiol* 30(6): 1500-1505.
- Denjoy, I., A. Maltret and V. Probst (2012). "[Congenital long QT, catecholaminergic VT, Brugada syndrome and unexplained sudden cardiac death in paediatric population]." *Arch of Cardiovasc Diseases Supp* 4: 179-192.
- Di Paolo, M., D. Luchini, R. Bloise and S. G. Priori (2004). "Postmortem molecular analysis in victims of sudden unexplained death." *Am J Forensic Med Pathol* 25(2): 182-184.
- Do, H. and A. Dobrovic (2009). "Limited copy number-high resolution melting (LCN-HRM) enables the detection and identification by sequencing of low level mutations in cancer biopsies." *Mol Cancer* 8: 82.
- Do, H. and A. Dobrovic (2012). "Dramatic reduction of sequence artefacts from DNA isolated from formalin-fixed cancer biopsies by treatment with uracil- DNA glycosylase." *Oncotarget* 3(5): 546-558.
- Do, H., M. Krypuy, P. L. Mitchell, S. B. Fox and A. Dobrovic (2008). "High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies." *BMC Cancer* 8: 142.
- Do, H., B. Solomon, P. L. Mitchell, S. B. Fox and A. Dobrovic (2008). "Detection of the transforming AKT1 mutation E17K in non-small cell lung cancer by high resolution melting." *BMC Res Notes* 1: 14.
- Doolan, A., N. Langlois, C. Chiu, J. Ingles, J. M. Lind and C. Semsarian (2008). "Postmortem molecular analysis of KCNQ1 and SCN5A genes in sudden unexplained death in young Australians." *Int J Cardiol* 127(1): 138-141.
- Doolan, A., N. Langlois and C. Semsarian (2004). "Causes of sudden cardiac death in young Australians." *Med J Aust* 180(3): 110-112.
- Drory, Y., Y. Turetz, Y. Hiss, B. Lev, E. Z. Fisman, A. Pines and M. R. Kramer (1991). "Sudden unexpected death in persons less than 40 years of age." *Am J Cardiol* 68(13): 1388-1392.

## E

- Edelmann, J., S. Schumann, M. Nastainczyk, D. Husser-Bollmann and R. Lessig (2011). "Long QT syndrome mutation detection by SNaPshot technique." *Int J Legal Med*.
- Edelmann, J., S. Schumann, M. Nastainczyk, D. Husser-Bollmann and R. Lessig (2012). "Long QT syndrome mutation detection by SNaPshot technique." *Int J Legal Med* 126(6): 969-973.
- Extramiana, F. (2005). "Syndrome du QT court." *Mt cardio* 1(5): 475-478.

## F

- Farrugia, A., C. Keyser and B. Ludes (2010). "Efficiency evaluation of a DNA extraction and purification protocol on archival formalin-fixed and paraffin-embedded tissue." *Forensic Sci Int* 194(1-3): e25-e28.
- Farrugia, A., C. Keyser and B. Ludes (2012). "Detection of genetic variation in KCNQ1 gene by high-resolution melting analysis in a prospective-based series of postmortem negative sudden death: comparison of results obtained in fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissues." *Int J Legal Med* 126(4): 649-657.
- Farrugia, A. and B. Ludes (2010). "Rôle de l'activité médico-légale dans la connaissance des morts violentes dans le Bas Rhin au cours de l'année 2008." *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire, Numéro thématique « Médecine légale et santé publique : quelques éléments d'illustration »* 40-41: 112-114.
- Ferrer, I., J. Armstrong, S. Capellari, P. Parchi, T. Arzberger, J. Bell, H. Budka, T. Strobel, G. Giaccone, G. Rossi, N. Bogdanovic, P. Fakai, A. Schmitt, P. Riederers, S. Al-Sarraj, R. Ravid and H. Kretschmar (2007). "Effects of formalin fixation, paraffin embedding, and time of storage on DNA preservation in brain tissue: a BrainNet Europe study." *Brain Pathol* 17(3): 297-303.

## G

- Gabriel, S., L. Ziaugra and D. Tabbaa (2009). "SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform." *Curr Protoc Hum Genet* Chapter 2: Unit 2 12.
- Gilbert, M. T., A. J. Hansen, E. Willerslev, L. Rudbeck, I. Barnes, N. Lynnerup and A. Cooper (2003). "Characterization of genetic miscoding lesions caused by postmortem damage." *Am J Hum Genet* 72(1): 48-61.
- Gilbert, M. T., T. Haselkorn, M. Bunce, J. J. Sanchez, S. B. Lucas, L. D. Jewell, E. Van Marck and M. Worobey (2007). "The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when?" *PLoS One* 2(6): e537.
- Giudicessi, J. R., J. D. Kapplinger, D. J. Tester, M. Alders, B. A. Salisbury, A. A. Wilde and M. J. Ackerman (2012). "Phylogenetic and Physicochemical Analyses Enhance the Classification of Rare Nonsynonymous Single Nucleotide Variants in Type 1 and 2 Long-QT Syndrome." *Circ Cardiovasc Genet* 5(5): 519-528.
- Gladding, P. A., C. A. Evans, J. Crawford, S. K. Chung, A. Vaughan, D. Webster, K. Neas, D. R. Love, M. I. Rees, A. N. Shelling and J. R. Skinner (2010). "Posthumous diagnosis of long QT syndrome from neonatal screening cards." *Heart Rhythm* 7(4): 481-486.

- Goelz, S. E., S. R. Hamilton and B. Vogelstein (1985). "Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue." *Biochem Biophys Res Commun* 130(1): 118-126.
- Gouas, L., V. Nicaud, M. Berthet, A. Forhan, L. Tired, B. Balkau and P. Guicheney (2005). "Association of KCNQ1, KCNE1, KCNH2 and SCN5A polymorphisms with QTc interval length in a healthy population." *Eur J Hum Genet* 13(11): 1213-1222.
- Guntheroth, W. G. and P. S. Spiers (2002). "The triple risk hypotheses in sudden infant death syndrome." *Pediatrics* 110(5): e64.
- Gussak, I., P. Brugada, J. Brugada, R. S. Wright, S. L. Kopecky, B. R. Chaitman and P. Bjerregaard (2000). "Idiopathic short QT interval: a new clinical syndrome?" *Cardiology* 94(2): 99-102.

## H

- Hansen, A., E. Willerslev, C. Wiuf, T. Mourier and P. Arctander (2001). "Statistical evidence for miscoding lesions in ancient DNA templates." *Mol Biol Evol* 18(2): 262-265.
- HAS (2007). *Prise en charge en cas de mort inattendue du nourrisson (moins de 2 ans): Recommendations officielles*. Institut de veille sanitaire: 46.
- Hedley, P. L., P. Jorgensen, S. Schlamowitz, R. Wangari, J. Moolman-Smook, P. A. Brink, J. K. Kanters, V. A. Corfield and M. Christiansen (2009). "The genetic basis of long QT and short QT syndromes: a mutation update." *Hum Mutat* 30(11): 1486-1511.
- Heideman, D. A., F. B. Thunnissen, M. Doeleman, D. Kramer, H. M. Verheul, E. F. Smit, P. E. Postmus, C. J. Meijer, G. A. Meijer and P. J. Snijders (2009). "A panel of high resolution melting (HRM) technology-based assays with direct sequencing possibility for effective mutation screening of EGFR and K-ras genes." *Cell Oncol* 31(5): 329-333.
- Hermida, J. S., J. L. Lemoine, F. B. Aoun, G. Jarry, J. L. Rey and J. C. Quiret (2000). "Prevalence of the brugada syndrome in an apparently healthy population." *Am J Cardiol* 86(1): 91-94.
- Hofreiter, M., V. Jaenicke, D. Serre, A. Haeseler Av and S. Paabo (2001). "DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA." *Nucleic Acids Res* 29(23): 4793-4799.
- Horn, H., C. Pott, J. Kalla, M. Dreyling, A. Rosenwald, G. Ott, M. Schwab and E. Schaeffeler (2010). "A multiplex MALDI-TOF MS approach facilitates genotyping of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tumour specimens." *Pharmacogenet Genomics* 20(10): 598-604.

## I

- INRS (2009). "Xylènes." *Fiche toxicologique FT77*.
- Iwasa H, I. T., Nagai R, Nakamura Y, Tanaka T. (2000). "Twenty single nucleotide polymorphisms (SNPs) and their allelic frequencies in four genes that are responsible for familial long QT syndrome in the Japanese population." *J Hum Genet* 45(3): 182-183.

## J

- Jackson, D. P., F. A. Lewis, G. R. Taylor, A. W. Boylston and P. Quirke (1990). "Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction." *J Clin Pathol* 43(6): 499-504.

- Jervell, A. and F. Lange-Nielsen (1957). "Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death." *Am Heart J* 54(1): 59-68.
- Jongbloed, R., C. Marcelis, C. Velter, P. Doevendans, J. Geraedts and H. Smeets (2002). "DHPLC analysis of potassium ion channel genes in congenital long QT syndrome." *Hum Mutat* 20(5): 382-391.
- Jouven, X. and D. Escande (2006). "[Sudden cardiac death: toward the identification of susceptibility genes]." *Arch Mal Coeur Vaiss* 99(9): 806-812.

## K

- Kapplinger, J. D., D. J. Tester, M. Alders, B. Benito, M. Berthet, J. Brugada, P. Brugada, V. Fressart, A. Guerschicoff, C. Harris-Kerr, S. Kamakura, F. Kyndt, T. T. Koopmann, Y. Miyamoto, R. Pfeiffer, G. D. Pollevick, V. Probst, S. Zumhagen, M. Vatta, J. A. Towbin, W. Shimizu, E. Schulze-Bahr, C. Antzelevitch, B. A. Salisbury, P. Guicheney, A. A. Wilde, R. Brugada, J. J. Schott and M. J. Ackerman (2010). "An international compendium of mutations in the SCN5A-encoded cardiac sodium channel in patients referred for Brugada syndrome genetic testing." *Heart Rhythm* 7(1): 33-46.
- Kaufenstein, S., N. Kiehne, D. Erkapic, J. Schmidt, C. W. Hamm, H. Bratzke, H. F. Pitschner, M. Kuniss and T. Neumann (2011). "A novel mutation in the cardiac ryanodine receptor gene (RyR2) in a patient with an unequivocal LQTS." *Int J Cardiol* 146(2): 249-250.
- Keller, D. I., J. Grenier, G. Christe, F. Dubouloz, S. Osswald, M. Brink, E. Ficker and M. Chahine (2009). "Characterization of novel KCNH2 mutations in type 2 long QT syndrome manifesting as seizures." *Can J Cardiol* 25(8): 455-462.
- Keyser-Tracqui, C. and B. Ludes (2005). "Methods for the study of ancient DNA." *Methods Mol Biol* 297: 253-264.
- Klaver, E. C., G. M. Versluijs and R. Wilders (2011). "Cardiac ion channel mutations in the sudden infant death syndrome." *Int J Cardiol* 152(2): 162-170.
- Koop, A., P. Goldmann, S. R. Chen, R. Thieleczek and M. Varsanyi (2008). "ARVC-related mutations in divergent region 3 alter functional properties of the cardiac ryanodine receptor." *Biophys J* 94(12): 4668-4677.
- Krous, H. F., J. B. Beckwith, R. W. Byard, T. O. Rognum, T. Bajanowski, T. Corey, E. Cutz, R. Hanzlick, T. G. Keens and E. A. Mitchell (2004). "Sudden infant death syndrome and unclassified sudden infant deaths: a definitional and diagnostic approach." *Pediatrics* 114(1): 234-238.
- Krypuy, M., A. A. Ahmed, D. Etemadmoghadam, S. J. Hyland, G. Australian Ovarian Cancer Study, A. DeFazio, S. B. Fox, J. D. Brenton, D. D. Bowtell and A. Dobrovic (2007). "High resolution melting for mutation scanning of TP53 exons 5-8." *BMC Cancer* 7: 168.
- Kudryavtsev, B. N., M. V. Kudryavtseva, G. A. Sakuta and G. I. Stein (1993). "Human hepatocyte polyploidization kinetics in the course of life cycle." *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 64(6): 387-393.
- Kung, H. C., D. L. Hoyert, J. Xu and S. L. Murphy (2008). "Deaths: final data for 2005." *Natl Vital Stat Rep* 56(10): 1-120.

## L

- Lahat, H., E. Pras, T. Olender, N. Avidan, E. Ben-Asher, O. Man, E. Levy-Nissenbaum, A. Khoury, A. Lorber, B. Goldman, D. Lancet and M. Eldar (2001). "A missense

- mutation in a highly conserved region of CASQ2 is associated with autosomal recessive catecholamine-induced polymorphic ventricular tachycardia in Bedouin families from Israel." *Am J Hum Genet* 69(6): 1378-1384.
- Lai, L. P., Y. N. Su, F. J. Hsieh, F. T. Chiang, J. M. Juang, Y. B. Liu, Y. L. Ho, W. J. Chen, S. J. Yeh, C. C. Wang, Y. L. Ko, T. J. Wu, K. C. Ueng, M. H. Lei, H. M. Tsao, S. A. Chen, T. K. Lin, M. H. Wu, H. M. Lo, S. K. Huang and J. L. Lin (2005). "Denaturing high-performance liquid chromatography screening of the long QT syndrome-related cardiac sodium and potassium channel genes and identification of novel mutations and single nucleotide polymorphisms." *J Hum Genet* 50(9): 490-496.
- Laitinen, P. J., K. M. Brown, K. Piippo, H. Swan, J. M. Devaney, B. Brahmabhatt, E. A. Donarum, M. Marino, N. Tiso, M. Viitasalo, L. Toivonen, D. A. Stephan and K. Kontula (2001). "Mutations of the cardiac ryanodine receptor (RyR2) gene in familial polymorphic ventricular tachycardia." *Circulation* 103(4): 485-490.
- Lawler, W. (1990). "The negative coroner's necropsy: a personal approach and consideration of difficulties." *J Clin Pathol* 43(12): 977-980.
- Lee MP, H. R., Johnson LA, Feinberg AP. (1997). "Human KVLQT1 gene shows tissue-specific imprinting and encompasses Beckwith-Wiedemann syndrome chromosomal rearrangements." *Nat Genet.* 15(2): 181-185.
- Leenhardt, A., V. Lucet, I. Denjoy, F. Grau, D. D. Ngoc and P. Coumel (1995). "Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in children. A 7-year follow-up of 21 patients." *Circulation* 91(5): 1512-1519.
- Liberthson, R. R. (1996). "Sudden death from cardiac causes in children and young adults." *N Engl J Med* 334(16): 1039-1044.
- Lindahl, T. (1993). "Instability and decay of the primary structure of DNA." *Nature* 362(6422): 709-715.
- Loire, R. (2007). "Mort subite." *Encycl Med Chir* 11-038-B-20.
- Lorin de la Grandmaison, G., I. Sibille and M. Durigon (2001). "La levée de corps peut-elle être un substitut de principe à l'autopsie médico-légale ?" *J Méd Lég Droit Méd* 44: 271-274.

## M

- Ma, E. S., C. L. Wong, F. B. Law, W. K. Chan and D. Siu (2009). "Detection of KRAS mutations in colorectal cancer by high-resolution melting analysis." *J Clin Pathol* 62(10): 886-891.
- Maron, B. J. (2003). "Sudden death in young athletes." *N Engl J Med* 349(11): 1064-1075.
- Maron, B. J., C. E. Clark, R. E. Goldstein and S. E. Epstein (1976). "Potential role of QT interval prolongation in sudden infant death syndrome." *Circulation* 54(3): 423-430.
- Medeiros-Domingo, A., Z. A. Bhuiyan, D. J. Tester, N. Hofman, H. Bikker, J. P. van Tintelen, M. M. Mannens, A. A. Wilde and M. J. Ackerman (2009). "The RYR2-encoded ryanodine receptor/calcium release channel in patients diagnosed previously with either catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia or genotype negative, exercise-induced long QT syndrome: a comprehensive open reading frame mutational analysis." *J Am Coll Cardiol* 54(22): 2065-2074.
- Mendisco, F., C. Keyser, C. Hollard, V. Seldes, A. E. Nielsen, E. Crubezy and B. Ludes (2011). "Application of the iPLEX Gold SNP genotyping method for the analysis of Amerindian ancient DNA samples: benefits for ancient population studies." *Electrophoresis* 32(3-4): 386-393.

- Michaud, K., P. Mangin and B. S. Elger (2011). "Genetic analysis of sudden cardiac death victims: a survey of current forensic autopsy practices." *Int J Legal Med* 125(3): 359-366.
- Miething, F., S. Hering, B. Hanschke and J. Dressler (2006). "Effect of fixation to the degradation of nuclear and mitochondrial DNA in different tissues." *J Histochem Cytochem* 54(3): 371-374.
- Millat, G., V. Chanavat, H. Crehalet and R. Rousson (2011). "Development of a high resolution melting method for the detection of genetic variations in Long QT Syndrome." *Clin Chim Acta* 412(1-2): 203-207.
- Millat, G., V. Chanavat, C. Rodriguez-Lafrasse and R. Rousson (2009). "Rapid, sensitive and inexpensive detection of SCN5A genetic variations by high resolution melting analysis." *Clin Biochem* 42(6): 491-499.
- Millat, G., B. Kugener, P. Chevalier, M. Chahine, H. Huang, D. Malicier, C. Rodriguez-Lafrasse and R. Rousson (2009). "Contribution of long-QT syndrome genetic variants in sudden infant death syndrome." *Pediatr Cardiol* 30(4): 502-509.
- Milting, H., N. Lukas, B. Klauke, R. Korfer, A. Perrot, K. J. Osterziel, J. Vogt, S. Peters, R. Thieleczek and M. Varsanyi (2006). "Composite polymorphisms in the ryanodine receptor 2 gene associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy." *Cardiovasc Res* 71(3): 496-505.
- Moretti, A., M. Bellin, A. Welling, C. B. Jung, J. T. Lam, L. Bott-Flugel, T. Dorn, A. Goedel, C. Hohnke, F. Hofmann, M. Seyfarth, D. Sinnecker, A. Schomig and K. L. Laugwitz (2010). "Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome." *N Engl J Med* 363(15): 1397-1409.
- Morita, H., J. Wu and D. P. Zipes (2008). "The QT syndromes: long and short." *Lancet* 372(9640): 750-763.

## N

- Napolitano, C., S. G. Priori, P. J. Schwartz, R. Bloise, E. Ronchetti, J. Nastoli, G. Bottelli, M. Cerrone and S. Leonardi (2005). "Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice." *JAMA* 294(23): 2975-2980.
- Ning, L., A. Moss, W. Zareba, J. Robinson, S. Rosero, D. Ryan and M. Qi (2003). "Denaturing high-performance liquid chromatography quickly and reliably detects cardiac ion channel mutations in long QT syndrome." *Genet Test* 7(3): 249-253.
- Nishio, H., M. Iwata and K. Suzuki (2006). "Postmortem molecular screening for cardiac ryanodine receptor type 2 mutations in sudden unexplained death: R420W mutated case with characteristics of status thymico-lymphatics." *Circ J* 70(11): 1402-1406.
- Nishio, H., M. Kuwahara, H. Tsubone, Y. Koda, T. Sato, S. Fukunishi, A. Tamura and K. Suzuki (2009). "Identification of an ethnic-specific variant (V207M) of the KCNQ1 cardiac potassium channel gene in sudden unexplained death and implications from a knock-in mouse model." *Int J Legal Med* 123(3): 253-257.

## O

- Otagiri, T., K. Kijima, M. Osawa, K. Ishii, N. Makita, R. Matoba, K. Umetsu and K. Hayasaka (2008). "Cardiac ion channel gene mutations in sudden infant death syndrome." *Pediatr Res* 64(5): 482-487.

## P

- Plant, L. D., P. N. Bowers, Q. Liu, T. Morgan, T. Zhang, M. W. State, W. Chen, R. A. Kittles and S. A. Goldstein (2006). "A common cardiac sodium channel variant associated with sudden infant death in African Americans, SCN5A S1103Y." *J Clin Invest* 116(2): 430-435.
- Plenat, F., K. Montagne, N. Weinbreck, S. Corby, J. Champigneulle, L. Antunes, C. Bonnet, C. Maire and N. Monhoven (2006). "[Molecular consequences of fixation and tissue processing: the examples of nucleic acids and proteins]." *Ann Pathol* 26(1): 8-21.
- Postma, A. V., I. Denjoy, J. Kamblock, M. Alders, J. M. Lupoglazoff, G. Vaksman, L. Dubosq-Bidot, P. Sebillon, M. M. Mannens, P. Guicheney and A. A. Wilde (2005). "Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: RYR2 mutations, bradycardia, and follow up of the patients." *J Med Genet* 42(11): 863-870.
- Priori, S. G. and S. R. Chen (2011). "Inherited dysfunction of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> handling and arrhythmogenesis." *Circ Res* 108(7): 871-883.
- Priori, S. G., C. Napolitano, M. Memmi, B. Colombi, F. Drago, M. Gasparini, L. DeSimone, F. Coltorti, R. Bloise, R. Keegan, F. E. Cruz Filho, G. Vignati, A. Benatar and A. DeLogu (2002). "Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia." *Circulation* 106(1): 69-74.
- Priori, S. G., C. Napolitano and P. J. Schwartz (1999). "Low penetrance in the long-QT syndrome: clinical impact." *Circulation* 99(4): 529-533.
- Priori, S. G., S. V. Pandit, I. Rivolta, O. Berenfeld, E. Ronchetti, A. Dhamoon, C. Napolitano, J. Anumonwo, M. R. di Barletta, S. Gudapakkam, G. Bosi, M. Stramba-Badiale and J. Jalife (2005). "A novel form of short QT syndrome (SQT3) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene." *Circ Res* 96(7): 800-807.
- Priori, S. G., P. J. Schwartz, C. Napolitano, R. Bloise, E. Ronchetti, M. Grillo, A. Vicentini, C. Spazzolini, J. Nastoli, G. Bottelli, R. Folli and D. Cappelletti (2003). "Risk stratification in the long-QT syndrome." *N Engl J Med* 348(19): 1866-1874.
- Probst, V., M. Allouis, F. Sacher, S. Pattier, D. Babuty, P. Mabo, J. Mansourati, J. Victor, J. M. Nguyen, J. J. Schott, P. Boisseau, D. Escande and H. Le Marec (2006). "Progressive cardiac conduction defect is the prevailing phenotype in carriers of a Brugada syndrome SCN5A mutation." *J Cardiovasc Electrophysiol* 17(3): 270-275.
- Probst, V., S. Evain, V. Gournay, A. Marie, J. J. Schott, P. Boisseau and L. E. M. H (2006). "Monomorphic ventricular tachycardia due to Brugada syndrome successfully treated by hydroquinidine therapy in a 3-year-old child." *J Cardiovasc Electrophysiol* 17(1): 97-100.
- Puranik, R., C. K. Chow, J. A. Duflo, M. J. Kilborn and M. A. McGuire (2005). "Sudden death in the young." *Heart Rhythm* 2(12): 1277-1282.

## Q

- Quach, N., M. F. Goodman and D. Shibata (2004). "In vitro mutation artifacts after formalin fixation and error prone translesion synthesis during PCR." *BMC Clin Pathol* 4(1): 1.
- Quatrehomme, G. and D. Rouge (2003). "La recommandation N°R99(3) du Comité des ministres aux Etats membres du Conseil de l'Europe relatives à l'harmonisation des règles en matière d'autopsie légale." *J Méd Lég Droit Méd* 46: 249-260.



## R

- Rambaud, C. and M. C. Imbert (1993). "[Autopsy protocol in the sudden infant death syndrome (SIDS)]." *Ann Pathol* 13(2): 131-134.
- Romano, C., G. Gemme and R. Pongiglione (1963). "[Rare Cardiac Arrhythmias of the Pediatric Age. II. Syncopal Attacks Due to Paroxysmal Ventricular Fibrillation. (Presentation of 1st Case in Italian Pediatric Literature)]." *Clin Pediatr (Bologna)* 45: 656-683.
- Roux-Buisson, N., M. Cacheux, A. Fourest-Lieuvin, J. Fauconnier, J. Brocard, I. Denjoy, P. Durand, P. Guicheney, F. Kyndt, A. Leenhardt, H. Le Marec, V. Lucet, P. Mabo, V. Probst, N. Monnier, P. F. Ray, E. Santoni, P. Tremeaux, A. Lacampagne, J. Faure, J. Lunardi and I. Marty (2012). "Absence of triadin, a protein of the calcium release complex, is responsible for cardiac arrhythmia with sudden death in human." *Hum Mol Genet* 21(12): 2759-2767.

## S

- Saffitz, J. E. (2005). "Structural heart disease, SCN5A gene mutations, and Brugada syndrome: a complex menage a trois." *Circulation* 112(24): 3672-3674.
- Schimpf, R., U. Bauersfeld, F. Gaita and C. Wolpert (2005). "Short QT syndrome: successful prevention of sudden cardiac death in an adolescent by implantable cardioverter-defibrillator treatment for primary prophylaxis." *Heart Rhythm* 2(4): 416-417.
- Schwartz, P. J. (1976). "Cardiac sympathetic innervation and the sudden infant death syndrome. A possible pathogenetic link." *Am J Med* 60(2): 167-172.
- Schwartz, P. J. (2006). "The congenital long QT syndromes from genotype to phenotype: clinical implications." *J Intern Med* 259(1): 39-47.
- Schwartz, P. J., S. G. Priori, R. Bloise, C. Napolitano, E. Ronchetti, A. Piccinini, C. Goj, G. Breithardt, E. Schulze-Bahr, H. Wedekind and J. Nastoli (2001). "Molecular diagnosis in a child with sudden infant death syndrome." *Lancet* 358(9290): 1342-1343.
- Schwartz, P. J., S. G. Priori, R. Dumaine, C. Napolitano, C. Antzelevitch, M. Stramba-Badiale, T. A. Richard, M. R. Berti and R. Bloise (2000). "A molecular link between the sudden infant death syndrome and the long-QT syndrome." *N Engl J Med* 343(4): 262-267.
- Schwartz, P. J., S. G. Priori, C. Spazzolini, A. J. Moss, G. M. Vincent, C. Napolitano, I. Denjoy, P. Guicheney, G. Breithardt, M. T. Keating, J. A. Towbin, A. H. Beggs, P. Brink, A. A. Wilde, L. Toivonen, W. Zareba, J. L. Robinson, K. W. Timothy, V. Corfield, D. Wattanasirichaigoon, C. Corbett, W. Haverkamp, E. Schulze-Bahr, M. H. Lehmann, K. Schwartz, P. Coumel and R. Bloise (2001). "Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias." *Circulation* 103(1): 89-95.
- Skinner, J. R., J. Crawford, W. Smith, A. Aitken, D. Heaven, C. A. Evans, I. Hayes, K. R. Neas, S. Stables, T. Koelmeyer, L. Denmark, J. Vuletic, F. Maxwell, K. White, T. Yang, D. M. Roden, T. P. Leren, A. Shelling and D. R. Love (2011). "Prospective, population-based long QT molecular autopsy study of post-mortem negative sudden death in 1-40 year olds." *Heart Rhythm* 8(3): 412-419.
- Smith, L. M., J. Z. Sanders, R. J. Kaiser, P. Hughes, C. Dodd, C. R. Connell, C. Heiner, S. B. Kent and L. E. Hood (1986). "Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis." *Nature* 321(6071): 674-679.
- Splawski, I., J. Shen, K. W. Timothy, M. H. Lehmann, S. Priori, J. L. Robinson, A. J. Moss, P. J. Schwartz, J. A. Towbin, G. M. Vincent and M. T. Keating (2000). "Spectrum of

- mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2." *Circulation* 102(10): 1178-1185.
- Srinivasan, M., D. Sedmak and S. Jewell (2002). "Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids." *Am J Pathol* 161(6): 1961-1971.
- Stanta, G. and C. Schneider (1991). "RNA extracted from paraffin-embedded human tissues is amenable to analysis by PCR amplification." *Biotechniques* 11(3): 304, 306, 308.

## T

- Tester, D., B. Salisbury, R. Judson and e. al. (2005). "Spectrum and prevalence of genetic variants in the RyR2-encoded cardiac ryanodine receptor-calcium release channel in healthy subjects (abstr)." *Circulation*(11): 516.
- Tester, D. J. and M. J. Ackerman (2005). "Genetic testing for cardiac channelopathies: ten questions regarding clinical considerations for heart rhythm allied professionals." *Heart Rhythm* 2(6): 675-677.
- Tester, D. J. and M. J. Ackerman (2005). "Sudden infant death syndrome: how significant are the cardiac channelopathies?" *Cardiovasc Res* 67(3): 388-396.
- Tester, D. J. and M. J. Ackerman (2005). "Sudden infant death syndrome: how significant are the cardiac channelopathies?" *Cardiovasc Res* 67(3): 388-396.
- Tester, D. J. and M. J. Ackerman (2007). "Postmortem long QT syndrome genetic testing for sudden unexplained death in the young." *J Am Coll Cardiol* 49(2): 240-246.
- Tester, D. J., M. Dura, E. Carturan, S. Reiken, A. Wronska, A. R. Marks and M. J. Ackerman (2007). "A mechanism for sudden infant death syndrome (SIDS): stress-induced leak via ryanodine receptors." *Heart Rhythm* 4(6): 733-739.
- Tester, D. J., A. Medeiros-Domingo, M. L. Will and M. J. Ackerman (2011). "Unexplained drownings and the cardiac channelopathies: a molecular autopsy series." *Mayo Clin Proc* 86(10): 941-947.
- Tester, D. J., D. B. Spoon, H. H. Valdivia, J. C. Makielski and M. J. Ackerman (2004). "Targeted mutational analysis of the RyR2-encoded cardiac ryanodine receptor in sudden unexplained death: a molecular autopsy of 49 medical examiner/coroner's cases." *Mayo Clin Proc* 79(11): 1380-1384.
- Tester, D. J., M. L. Will and M. J. Ackerman (2006). "Mutation detection in congenital long QT syndrome: cardiac channel gene screen using PCR, dHPLC, and direct DNA sequencing." *Methods Mol Med* 128: 181-207.
- Tester, D. J., M. L. Will, C. M. Haglund and M. J. Ackerman (2005). "Compendium of cardiac channel mutations in 541 consecutive unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing." *Heart Rhythm* 2(5): 507-517.
- Tiso, N., D. A. Stephan, A. Nava, A. Bagattin, J. M. Devaney, F. Stanchi, G. Larderet, B. Brahmabhatt, K. Brown, B. Bauce, M. Muriago, C. Basso, G. Thiene, G. A. Danieli and A. Rampazzo (2001). "Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2)." *Hum Mol Genet* 10(3): 189-194.

## V

- Virmani, R., A. P. Burke and A. Farb (2001). "Sudden cardiac death." *Cardiovasc Pathol* 10(6): 275-282.

## W

- Ward, O. C. (1964). "A New Familial Cardiac Syndrome in Children." *J Ir Med Assoc* 54: 103-106.
- Wedekind, H., T. Bajanowski, P. Friederich, G. Breithardt, T. Wulfing, C. Siebrands, B. Engeland, G. Monnig, W. Haverkamp, B. Brinkmann and E. Schulze-Bahr (2006). "Sudden infant death syndrome and long QT syndrome: an epidemiological and genetic study." *Int J Legal Med* 120(3): 129-137.
- Willerslev, E. and A. Cooper (2005). "Ancient DNA." *Proc Biol Sci* 272(1558): 3-16.
- Williams, C., F. Ponten, C. Moberg, P. Soderkvist, M. Uhlen, J. Ponten, G. Sitbon and J. Lundeberg (1999). "A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens." *Am J Pathol* 155(5): 1467-1471.
- Winkel, B. G., M. K. Larsen, K. E. Berge, T. P. Leren, P. H. Nissen, M. S. Olesen, M. V. Hollegaard, T. Jespersen, L. Yuan, N. Nielsen, S. Haunso, J. H. Svendsen, Y. Wang, I. B. Kristensen, H. K. Jensen, J. Tfelt-Hansen and J. Banner (2012). "The Prevalence of Mutations in KCNQ1, KCNH2, and SCN5A in an Unselected National Cohort of Young Sudden Unexplained Death Cases." *J Cardiovasc Electrophysiol*.
- Wong, C. H., S. H. Koo, G. Q. She, P. Chui and E. J. Lee (2009). "Genetic variability of RyR2 and CASQ2 genes in an Asian population." *Forensic Sci Int* 192(1-3): 53-55.

## Y

- Yang, T., S. K. Chung, W. Zhang, J. G. Mullins, C. H. McCulley, J. Crawford, J. MacCormick, C. A. Eddy, A. N. Shelling, J. K. French, P. Yang, J. R. Skinner, D. M. Roden and M. I. Rees (2009). "Biophysical properties of 9 KCNQ1 mutations associated with long-QT syndrome." *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2(4): 417-426.

## Z

- Zareba, W., A. J. Moss, P. J. Schwartz, G. M. Vincent, J. L. Robinson, S. G. Priori, J. Benhorin, E. H. Locati, J. A. Towbin, M. T. Keating, M. H. Lehmann and W. J. Hall (1998). "Influence of genotype on the clinical course of the long-QT syndrome. International Long-QT Syndrome Registry Research Group." *N Engl J Med* 339(14): 960-965.
- Zipes, D. P. and H. J. Wellens (1998). "Sudden cardiac death." *Circulation* 98(21): 2334-2351.

# **Annexes**



**Annexe 1 Tableau récapitulatif présentant la séquence des amorces PCR utilisées pour l'amplification des exons du gène KCNQ1 par PCR en temps réel sur la plateforme Light cycler 480.**

	Exon	Amorces (5'→3')		Condition de la PCR				
		Sens	Anti sens	Amplicon (bp)	T°a (°C)	DNA (ng)	MgCl2 (mM)	
1	1a	CGG CAG GCC CTC CTC GTT	TCC AGC GAG AAG GGG CAT TTT	134	68-59	30	2,5	Séquençage Direct
	1b	GAA AGG AAG CGC TGG GGT TG	GGC CAA GGT CGG AAG CAA CT	211	68-59	30	2,5	
	1c	CCT TCT CGC TGG AAC TGG	CCG GTG GCG ATA CTC AC	300	65-53	30	2,5	
2		ACT GCC GTG TCC CTG TCT T	TAT CAG GGC AGG ACC AAT GT	248	65-53	30	2,5	
3		AAA CAG GTT GCA GGG TCT GAA G	TCC TTC CTG GTC TGG AAA CCT G	254	65-53	30	2,5	
4		CCC TCT CCT GCA CTC CAC	GAG CTT GTG GCA CAG ACG	120	68-59	30	2,5	
5		AGC CCC ACA CCA TCT CCT T	AGG TTG GGG ACA GGA CGG A	171	68-59	30	3	
6		AGC CCG ACA CTG TGT GTT TT	GCC TGG AAG TTT CCG ACT TA	191	65-53	30	2,5	
7		TGG GTT TGG GTT AGG CAG TTG	AAG GAG CCA GGG AAA ACG CA	223	65-53	30	2,5	
8		GAG CCT CCT GTC CAT TCC TT	GGC TGG ATG CAA CAA TAA CA	183	68-59	30	2,5	
9		GAA CAG GGA GGG GGA GCT GT	TGG TGG CAG GTG GGC TAC TC	231	68-59	45	2,5	
10		TAG GGC CTG GCA GAC GAT GT	CCC AAC TGC CTG AGG GGT TC	222	68-59	30	2,5	
11		TGT CCC CAC ACT TTC TCC TC	TTC ACG CAC ATG TAG GCA CT	166	65-53	30	2,5	
12		TGG CCA CTC ACA ATC TCC T	GCC TTG ACA CCC TCC ACT A	222	68-59	30	2,5	
13		AGG AGA AGT GAT GCG TGT CTT TTT G	AGA GGC AAG AAC TCA GGG TCT CAG C	244	68-59	45	2,5	Séquençage Direct
14		GTG TGA ACT GGT GTC TGT GTC CTT	GTT TCT GTG TCA GTT ACT CTG GGC	107	65-53	30	2,5	
15		CCC AGC ACT TGG CCC TGA TT	ACG CAG ACC ACA GGG AGG TG	178	65-53	30	2,5	
16		CAC CAC TGA CTC TCT CGT CTG C	CCA TCC CCC AGC CCC ATC	297	65-53	30	2,5	Séquençage Direct

**Annexe 2 Liste des SNPs recherchés par spectrométrie de masse dans notre étude**  
(NM\_001035,2; NP\_001026,2)

Exon	Base modifiée	Acide aminé modifié
3	184 C>T	L62F ; <b>ctc</b> → <b>ttc</b>
3	230 C>T	A77V ; <b>gcg</b> → <b>gtg</b>
3	241 A>C	M81L ; <b>atg</b> → <b>ctg</b>
8	493 C>T	P164S ; <b>cct</b> → <b>tct</b>
8	506 G>A	R169Q ; <b>cga</b> → <b>caa</b>
8	527 G>A	R176Q ; <b>cga</b> → <b>caa</b>
8	556 G>A	V186M ; <b>gtg</b> → <b>atg</b>
8	567 A>T	E189D ; <b>gaa</b> → <b>gat</b>
10	6337 G>A	H240R ; <b>cac</b> → <b>cgc</b>
10	727 G>A	E243K ; <b>gag</b> → <b>aag</b>
12	985 T>C	F329L ; <b>ttt</b> → <b>ctt</b>
12	994C>T	R332W ; <b>cgg</b> → <b>tgg</b>
13	1072 G>A	G357S ; <b>ggt</b> → <b>agt</b>
13	1129 G>A	V377M ; <b>gtg</b> → <b>atg</b>
15	1298 T>C	L433P ; <b>ctt</b> → <b>cct</b>
15	1396 C>G	P466A ; <b>cca</b> → <b>gca</b>
16	1519 G>A	V507I ; <b>gtc</b> → <b>atc</b>
17	1646 C>T	A549V ; <b>gct</b> → <b>gtt</b>
19	1847 C>T	S616L ; <b>tca</b> → <b>tta</b>
21	2216 G>A	R739H ; <b>cgt</b> → <b>cat</b>
26	3038 G>A	R1013Q ; <b>cgg</b> → <b>cag</b>
27	3152 G>C	R1051P ; <b>cgc</b> → <b>ccc</b>
28	3320 C>T	T1107M ; <b>acg</b> → <b>atg</b>
28	3407 C>T	A1136V ; <b>gcc</b> → <b>gtc</b>
37	5170 G>A	E1724K ; <b>gag</b> → <b>aag</b>
37	5509 G>A	E1837K ; <b>gag</b> → <b>aag</b>
37	5654 G>A	G1885E ; <b>ggg</b> → <b>gag</b>
37	5656 G>A	G1886S ; <b>ggc</b> → <b>agc</b>
40	6137 A>G	E2045G ; <b>gaa</b> → <b>gga</b>
41	6337 G>A	V2113M ; <b>gtg</b> → <b>atg</b>
41	6433 G>A	G2145R ; <b>gga</b> → <b>aga</b>
42	6467 A>G	Y2156C ; <b>tac</b> → <b>tgc</b>
42	6504 C>G	H2168Q ; <b>cac</b> → <b>cag</b>
42	6548 A>T	E2183V ; <b>gag</b> → <b>gtg</b>
43	6647 A>T	D2216V ; <b>gat</b> → <b>gtt</b>

Exon	Base modifiée	Acide aminé modifié
44	6737 C>T	S2246L ; tcg → ttg
44	6761 C>T	A2254V ; gca → gta
45	6800 G>A	R2267H ; cgt → cat
45	6886 G>C	E2296Q ; gag → cag
45	6916 G>A	V2306I ; gtc → atc
45	6919 T>C	F2307L ; ttc → ctc
46	6933 G>A	E2311D ; gag → gaa
46	6992 T>C	V2321M ; gtg → atg
46	6982 C>T	P2328S ; cct → tct
46	6992 T>C	F2331S ; ttt → tct
46	7076 G>A	R2359Q ; cga → caa
48	7258 A>T	R2420W ; agg → tgg
49	7422 G>C	P2474S ; agg → agc
49	7423 G>T	V2475F ; gtc → ttc
49	7459 C>A	L2487I ; ctt → att
49	7511 C>T	T2504M ; acg → atg
50	7528 T>C	T2510A ; aca → gca
50	7600 C>G	L2534V ; ctc → gtc
61	8876 A>G	Q2958R ; caa → cga
69	9923 A>G	N3308S ; aat → agt
75	10708 C>T	R3570W ; cgg → cgt
83	11332 C>T	L3778F ; ctt → ttt
83	11399 G>T	C3800F ; tgt → ttt
86	11636 T>C	L3879P ; ctg → ccg
87	11773 C>G	Q3925E ; cga → gag
88	11814 C>A	S3938R ; agc → aga
88	11836 G>A	G3946S ; ggc → agc
88	11837 G>C	G3946A ; ggc → gcc
88	11876 C>T	S3959L ; tcg → ttg
89	11916 G>T	M3972I ; atg → att
89	11917 G>C	D3973H ; gat → cat
89	11921 T>A	L3974Q ; ctg → cag
90	11989 A>G	K3997E ; aaa → gaa
90	12028 G>A	V4010M ; gtg → atg
90	12058 T>C	F4020L ; ttc → ctc
90	12845 C>T	A4282V ; gcc → gtc
90	12892 G>A	V4298M ; gtg → atg
90	12919 C>T	R4307C ; cgc → tgc
90	12944 G>A	G4315E ; ggg → gag



Exon	Base modifiée	Acide aminé modifié
91	13291 G>A	E4431K ; gaa→aaa
93	13489 C>T	R4497C ; cgc→tgc
93	13496 T>G	F4499C ; ttt→tgt
93	13512 G>A	M4504I ; atg→ata
93	13528 G>A	A4510T ; gca→aca
93	13531 T>C	F4511L ; ttt→ctt
94	13533 T>A. G	F4511L ; ttt→tta ou ttg
94	13666 G>A	A4556T ; gca→aca
94	13695 C>A	S4565R ; agc→aga
95	13819 G>C	A4607P ; gca→cca
95	13831 G>A	E4611K ; gaa→aaa
96	13933 T>A. C	W4645R ; tgg→cgg
96	13948 A>G	K4650E ; aaa→gaa
97	13957 G>T	V4653F ; gtt→ttt
97	13984 G>A	G4662S ; ggc→agc
97	14011 G>C	G4671R ; ggc→cgc
99	14285 A>C	H4762P ; cac→ccc
100	14311 G>C	V4771I ; gtt→ctt
100	14369 G>A	R4790Q ; cga→caa
100	14414 A>G	K4805R ; aaa→aga
101	14465 G>A	R4822H ; cgt→cat
101	14542 G>A	I4848V ; atc→gtc
101	14552 T>G	F4851C ; ttc→tgc
101	14579 C>G	A4860G ; gcc→ggc
102	14601 T>G	I4867M ; att→atg
102	14639 T>C	V4880A ; gtc→gcc
103	14683 A>G	N4895D ; aat→gat
103	14705 C>T	P4902L ; cca→cta
103	14705 C>T	P4902S ; cca→cta
104	14803 G>A	G4935R ; gga→aga
105	14848 G>A	E4950K ; gaa→aaa
105	14876 G>A	R4959Q ; cgg→cag

## Annexe 3 Séquences des amorces PCR et SBE utilisées avec la technologie iPLEX Gold sur le gène RyR2

ID-SNP		Amorce PCR sens (5-'3')	Amorce PCR anti-sens (5-'3')	Taille de l'amplicon (pb)	Sens de l'amorce SBE	Amorce SBE
EXON 42_6504	A1	ACGTTGGATGGTCCATTGTCCTTTCTAGGG	ACGTTGGATGTCCCTGGTAGAAAAGGTGAC	146	R	ACCTCCATCACAGTCTC
EXON 37_5509_2	A1	ACGTTGGATGCTATACCCTGCTGATCATGG	ACGTTGGATGTTTCATTTGGAGCAGGCCTCC	216	R	GATGTGCTTCAAGTCTC
EXON 28_3407	A1	ACGTTGGATGAGAAGACCTATGCAGTGAAC	ACGTTGGATGGACAAAGTCCACTCACCTTG	168	F	AGATGAACGTGCCTTTG
EXON 88_11814	A1	ACGTTGGATGGGGAATCAACAGAGTTTGGC	ACGTTGGATGAGAGAGAGGAAGGCAGTTAG	122	R	CACAGCATCCCACAGCCT
EXON 101_14465	A1	ACGTTGGATGTCCCTCCAAGAAGTGATACC	ACGTTGGATGCAGTGAGGAGGATACTTACC	211	R	CCCGATCCCTCCTCCAGCA
EXON 97_13984	A1	ACGTTGGATGGGTGGAAGCCAACAAAATGC	ACGTTGGATGTCTCTGGCATCACTGAAAGTC	133	R	TCACTGATTCTGTCTCGGC
EXON 104_14803	A1	ACGTTGGATGCTGTAGGTTTTTTCTGATG	ACGTTGGATGCATTTCTTTTCAGAAGATGAC	96	F	AGATGAAACAGAACACACA
EXON 17_1646	A1	ACGTTGGATGTCTTCTTTTGCAGCGGCTC	ACGTTGGATGATCTGCTGATCAACCAGTCG	86	R	tgGGGAGCCAGAAAATTGA
EXON 27_3152	A1	ACGTTGGATGTCTGGATGACCGAACCAAG	ACGTTGGATGTTCCAAGTTGTAGCCGTACC	86	R	cccGCGTGCACAGCCTCG
EXON 93_13496	A1	ACGTTGGATGCACCCTCAGAACTATTTTGC	ACGTTGGATGAACAGTGAGATGTACGTACC	115	F	GAACTATTTTGTCTCGCAACT
EXON 100_14414	A1	ACGTTGGATGACCTGGTCCCTTGTACATTG	ACGTTGGATGCTGCAGAAGCAGGAGACATT	219	F	TGGTGATACACCAGATATGA
EXON 3_230	A1	ACGTTGGATGGAAGATGATGCTGCTGACTG	ACGTTGGATGTGATTCTCCACGGTGTTAG	139	R	ccccCCAGCATCTCCTGCAGC
EXON 91_13291	A1	ACGTTGGATGATTCAAGGAACAGAAGGCA	ACGTTGGATGCTCGGCTTTTTTCAGGTTGAG	76	R	CAGATTTGGTTTCTTCTTTTT
EXON 94_13666	A1	ACGTTGGATGATGCCAAAGTGACAAGCCTG	ACGTTGGATGAGCTAAGATACGCAACGTGG	107	R	CCTCTAGTACATAGTGAAGT
EXON 13_1129	A1	ACGTTGGATGGAAGTAGATGGCATGGGAAC	ACGTTGGATGCCTTACGTTGTATAGATCCC	139	R	ccccCACGGATTTACAGTCCA
EXON 86_11636	A1	ACGTTGGATGATCTGAGAACTCAGACTGGC	ACGTTGGATGTATGGAAAACAACATACCTG	94	R	cccGCAACATACCTGAACTCTC
EXON 83_11399	A1	ACGTTGGATGTTTCAGTGGCCACGTGGTTTC	ACGTTGGATGAACCCCAAGAAGGAAG	143	R	GAAGGAAGTGAGTCTTACCTA
EXON 28_3320	A1	ACGTTGGATGAGAAGACCTATGCAGTGAAC	ACGTTGGATGGACAAAGTCCACTCACCTTG	168	R	cccCATGTCTCCAGCAGTGACC
EXON 101_14542	A1	ACGTTGGATGTCCCTCCAAGAAGTGATACC	ACGTTGGATGCAGTGAGGAGGATACTTACC	211	F	AGATCTATCGAATCATCTTTGAC

ID-SNP		Amorce PCR sens (5-'3')	Amorce PCR anti-sens (5-'3')	Taille de l'amplicon (pb)	Sens de l'amorce SBE	Amorce SBE
EXON 46_7076	A1	ACGTTGGATGACTTATCTTCCCCATTCTAC	ACGTTGGATGACTGGATCCGCTATTTGGTG	204	R	ggagATTTGGTGAGGGACCATCT
EXON 41_6433	A1	ACGTTGGATGCTGCCAAAGACCTACACGAT	ACGTTGGATGGACAAAGGGTTGTAGTAGTT	168	F	gaggGAGAAGCTCATGATTCTG
EXON 61_8876	A1	ACGTTGGATGAAATCTACAGATGGTGGCAG	ACGTTGGATGGTACTTTTGCAAAGAACTTG	79	F	acGGAGAACATTTCCCTTATGAAC
EXON 96_13948	A1	ACGTTGGATGTTTTAGGTCATTTCCCAAC	ACGTTGGATGAAATGTAGAGGATTCCAAG	78	R	cTTCCAAGTAATATTACCTTTCTTT
EXON 102_14639	A1	ACGTTGGATGGGAACTGAATTATTCATTGC	ACGTTGGATGGACAACAAAGAAGCTGAGTC	160	R	tgatCTTACCTCCATGTCTTCTTTG
EXON 41_6337	A1	ACGTTGGATGCTGCCAAAGACCTACACGAT	ACGTTGGATGGACAAAGGGTTGTAGTAGTT	168	R	ggcatCAGGTTGATGGTGTCTCTCCA
EXON 49_7459	A1	ACGTTGGATGGTTTTGCCAGATCACAAGG	ACGTTGGATGGCACAGAGTGAAGAGTCAAG	186	F	gggatGTTCAAGACTTCTCTCTCCAT
EXON 100_14311	A1	ACGTTGGATGACCTGGTCTTGTACATTG	ACGTTGGATGCTGCAGAAGCAGGAGACATT	219	F	ggggTGTTTTCCAGCTCGTATTAACC
EXON 48_7258	A1	ACGTTGGATGAGTTGATTCATGCCGGAAG	ACGTTGGATGATAACGCCACCAAATCTCC	91	F	cctGGAAGGGAGAAGCCATCAGAATT
EXON 12_994	A2	ACGTTGGATGCCTTCTACTCATGGACAAAG	ACGTTGGATGGACCGGGTAAACATTTATAGG	112	R	TCTCACCTTGAAGACC
EXON 16_1519	A2	ACGTTGGATGAGGGAATGATCAACCTCGTG	ACGTTGGATGCCAGCAACATCAGCAAAGTG	84	R	TGCTGCACTGCTGTAGA
EXON 37_5170_1	A2	ACGTTGGATGTGATTGACATCCACCTGAGC	ACGTTGGATGTGATGCTTTCGTCCTCTCC	93	R	CATGGGGACAATGTACT
EXON 46_6933	A2	ACGTTGGATGACTTATCTTCCCCATTCTAC	ACGTTGGATGACTGGATCCGCTATTTGGTG	204	R	aGCATTTCTCTCCACACT
EXON 99_14285	A2	ACGTTGGATGAAGAACCATCTTGTCTCAG	ACGTTGGATGTTCTGCAAGGGGAGGAAAAAG	73	F	ATCTTGTCTCAGTAACTC
EXON 103_14683	A2	ACGTTGGATGCCAAATGCTTCATCTGTGGG	ACGTTGGATGTGTGCTCTGTAAAGTGTGG	84	R	ACTGTGTCGAAGTAATCAT
EXON 21_2216	A2	ACGTTGGATGCCTTCTTAATGTTTTCCCC	ACGTTGGATGCAGATGTTGGTTTGGTGAGC	68	R	GTTTGGTGAGCTTACAGTA
EXON 26_3038	A2	ACGTTGGATGAATGGTGGACAAGTTGGCAG	ACGTTGGATGGTTGGATGCCATAAGTCCAG	83	R	TGCCATAAGTCCAGCCCTGC
EXON 75_10708	A2	ACGTTGGATGTCTTTCAGAAGTCTAAACG	ACGTTGGATGATCTCTAGGCCATTGAGCAC	73	F	gggAGTCTAAACGTGTGGGT
EXON 88_11876	A2	ACGTTGGATGGGGAATCAACAGAGTTTGGC	ACGTTGGATGAGAGAGAGGAAGGCAGTTAG	122	R	tCAGTTAGTTAGTTTACCTGC
EXON 43_6647	A2	ACGTTGGATGCTTCTGTCTATAAGTAGGC	ACGTTGGATGGACCAACTGCTGTTTTCC	80	R	TCCAGTAAATAACTGAGATGA
EXON 49_7423	A2	ACGTTGGATGGTTTTGCCAGATCACAAGG	ACGTTGGATGGCACAGAGTGAAGAGTCAAG	186	R	ctTTGAACCTCAATCCCATAGA
EXON 69_9922	A2	ACGTTGGATGTAAACAGTGTTTTCCAGCC	ACGTTGGATGGTTTCTCCATTAACGGCAAG	82	R	gggGAGCTGAGGTTTCACTTTA
EXON 105_14848	A2	ACGTTGGATGTGCAGGAATCTTATGTCTGG	ACGTTGGATGTAGAGGTGATTGGGTCTGAG	122	F	tcTGATCAAGAAAGGTGTTGG
EXON 97_13957	A2	ACGTTGGATGGTTGAAGCCAACAAAATGC	ACGTTGGATGTCTCTGGCATCACTGAAGTC	133	R	GAACTCTCCATATTTATCCATAA
EXON 37_5656_2	A2	ACGTTGGATGCTATACCCTGCTGATCATGG	ACGTTGGATGTTCAATTTGGAGCAGGCCCTCC	216	R	caAGGCCTTCTTGGGCCGCTTGC

ID-SNP	Amorce PCR sens (5-'3')	Amorce PCR anti-sens (5-'3')	Taille de l'amplicon (pb)	Sens de l'amorce SBE	Amorce SBE
EXON 100_14369	A2 ACGTTGGATGACCTGGTCTTGTACATTG	ACGTTGGATGCTGCAGAAGCAGGAGACATT	219	F	tttTGGTGGCATTCAATTTTTTCC
EXON 44_6761	A2 ACGTTGGATGAGGTTCAACACCACTGGATG	ACGTTGGATGCTTTTCTAGATCCGGCTCAC	88	F	aGGTGATGGATAATAATGAAGTAG
EXON 49_7511	A2 ACGTTGGATGGTTTTGCCAGATCACAAGG	ACGTTGGATGGCACAGAGTGAAGAGTCAAG	186	F	aTCCGGGCGGCTGCTTCTTTAGATA
EXON 19_1847	A2 ACGTTGGATGCTCTTTTCAGGTTCTGGATG	ACGTTGGATGTGAGATGCTGGTTAGAACGG	77	F	gTTCAGGTTCTGGATGTCTTGTGCT
EXON 101_14579	A2 ACGTTGGATGTCCCTCCAAGAAGTGATACC	ACGTTGGATGCAGTGAGGAGGATACTTACC	211	F	ccTCTTTGTTATTGTCTTCTCTTGG
EXON 50_7600	A2 ACGTTGGATGGGCCTTCTACTCTCTGATTG	ACGTTGGATGTCAATGAGAGAAGCGTGGTG	153	F	cttCCATTGTTAACAAGATGTGCTCCT
EXON 42_6548	A2 ACGTTGGATGGTCCATTGTCCTTTCTAGGG	ACGTTGGATGTCCCTGGTAGAAAAGGTGAC	146	R	ggAGGAATCAAAGACGTTACCTTGGAC
EXON 93_13489	A2 ACGTTGGATGCACCCTCAGAACTATTTTGC	ACGTTGGATGAACAGTGAGATGTACGTACC	115	F	TGTTTTTCACCCTCAGAACTATTTTGGCT
EXON 93_13512	A3 ACGTTGGATGCACCCTCAGAACTATTTTGC	ACGTTGGATGAACAGTGAGATGTACGTACC	115	F	TTTACAACATGAGAAT
EXON 8_506	A3 ACGTTGGATGCATATCCGTATATCTGCAGG	ACGTTGGATGCAGCAGATACATGATCCTAC	168	F	CCCTGCCTCTAAGCAGC
EXON 10_727	A3 ACGTTGGATGATTGGTGGTGATGTCCTCAG	ACGTTGGATGCTCTTCACCATGTTCTCCTG	81	F	TGCATGGACACATGGAC
EXON 95_13819	A3 ACGTTGGATGCCTATGTAGGTCCTTGGT	ACGTTGGATGATCTTCTGAAGGCTGTTCTG	104	F	AGCGAGAAAAGGAAGTG
EXON 103_14705	A3 ACGTTGGATGCCAAATGCTTCATCTGTGGG	ACGTTGGATGTGTGCTCCTGTAAAGTGTGG	84	F	ATTACTTCGACACAGTGC
EXON 15_1396	A3 ACGTTGGATGGTGAATCACTGACAATAGAG	ACGTTGGATGATTCTTCAGGGCTCGTAGTC	202	F	CATTGGCTACTTCCACCCC
EXON 12_985	A3 ACGTTGGATGCCTTCTACTCATGGACAAAG	ACGTTGGATGGACCGGTAACATTTATAGG	112	F	TGATGTAAAATCAACAGCA
EXON 46_6982	A3 ACGTTGGATGACTTATCTTCCCCATTCTAC	ACGTTGGATGACTGGATCCGCTATTTGGTG	204	F	gcGATTGCTCATTCCGGAGG
EXON 96_13933	A3 ACGTTGGATGTTTTAGGTCATTTCCCAAC	ACGTTGGATGAAATGTAGAGGATTCCAAG	78	F	GGTCATTTCCCAACAACACTAC
EXON 88_11837	A3 ACGTTGGATGGGGAATCAACAGAGTTTGGC	ACGTTGGATGAGAGAGAGGAAGGCAGTTAG	122	R	GGGCAAACACATGAAGAAAAG
EXON 105_14877	A3 ACGTTGGATGTGCAGGAATCTTATGTCTGG	ACGTTGGATGTAGAGGTGATTGGGTCTGAG	122	R	TAGCTGGTCTTCATACTGTTT
EXON 50_7528	A3 ACGTTGGATGGGCCTTCTACTCTCTGATTG	ACGTTGGATGTCAATGAGAGAAGCGTGGTG	153	R	ccAGGGCCAAGGCCATGTCTG
EXON 3_184	A3 ACGTTGGATGGAAGATGATGCTGCTGACTG	ACGTTGGATGTGATTTCTCCACGGTGTAG	139	R	aCACAAAGGTGCAGATGGAGA
EXON 37_5654_2	A3 ACGTTGGATGCTATACCCTGCTGATCATGG	ACGTTGGATGTTTCAATTTGGAGCAGGCCTCC	216	F	gttGTGAGGAAGAAGCCAAGG
EXON 44_6737	A3 ACGTTGGATGAGGTTCAACACCACTGGATG	ACGTTGGATGCTTTTCTAGATCCGGCTCAC	88	R	aTAGTTCATTATTATCCATCACC
EXON 101_14552	A3 ACGTTGGATGTCCCTCCAAGAAGTGATACC	ACGTTGGATGCAGTGAGGAGGATACTTACC	211	R	AGAGAATGACAATAACAAAAGAAAG
EXON 40_6134	A3 ACGTTGGATGTCCCTGGTAGAAAAGGTGAC	ACGTTGGATGACAGGACTTTTTGGAGTCAC	78	R	agGGAGTCACTCTCAACTGGTTTT

ID-SNP	Amorce PCR sens (5-'3')	Amorce PCR anti-sens (5-'3')	Taille de l'amplicon (pb)	Sens de l'amorce SBE	Amorce SBE
EXON 94_13695	A3 ACGTTGGATGATGCCAAAGTGACAAGCCTG	ACGTTGGATGAGCTAAGATACGCAACGTGG	107	F	gaACTATGTACTAGAGGAGAGCAG
EXON 83_11332	A3 ACGTTGGATGTTTCAGTGGCCACGTGGTTTC	ACGTTGGATGAACCCCAAGAAGGAAG	142	F	GTTTCTATAATTCCCATAGAAAATG
EXON 42_6467	A3 ACGTTGGATGGTCCATTGTCCTTTCTAGGG	ACGTTGGATGTCCCTGGTAGAAAAGGTGAC	146	F	GGATATTATGAATAACAAAGTGTTTT
EXON 15_1298	A4 ACGTTGGATGGTGAATCACTGACAATAGAG	ACGTTGGATGATTCTTCAGGGCTCGTAGTC	202	R	TCTTGCTGAGAGCATCA
EXON 88_11836	A4 ACGTTGGATGGGGAATCAACAGAGTTTGGC	ACGTTGGATGAGAGAGAGGAAGGCAGTTAG	122	F	TGTGGGATGCTGTGGTC
EXON 10_719	A4 ACGTTGGATGATTGGTGGTGTATGTCCTCAG	ACGTTGGATGCTCTTACCATGTCTCCTG	81	F	cCAGGTTGCTGCATGGAC
EXON 46_6962	A4 ACGTTGGATGACTTATCTTCCCCATTCTAC	ACGTTGGATGACTGGATCCGCTATTGGTG	204	F	GGAAAATGCAAATGTCGTG
EXON 49_7422	A4 ACGTTGGATGGTTTTGCCAGATCACAAGG	ACGTTGGATGGCACAGAGTGAAAGTCAAG	186	F	cTGGTTTTATTCTTGACAG
EXON 93_13531	A4 ACGTTGGATGCACCCTCAGAACTATTTTGC	ACGTTGGATGAACAGTGAGATGTACGTACC	115	R	GAGCAAGATGAAATTGATAA
EXON 97_14011	A4 ACGTTGGATGGGTTGAAGCCAACAAAATGC	ACGTTGGATGTCTCTGGCATCACTGAAGTC	133	F	GACAGAATCAGTGAATTACTT
EXON 87_11773	A4 ACGTTGGATGTCCAAAGCTATCCAAGTGGC	ACGTTGGATGCAGTGCTACAGATAGCAGCC	93	F	TTTAACACTCTTACAGAGTATATT
EXON 90_12058	A4 ACGTTGGATGGTAATGTTGTTAATGGAACGA	ACGTTGGATGGACGACGTCAAATCCTTTAG	76	R	GACGTCAAATCCTTTAGTTTTAAGA
EXON 89_11916	A4 ACGTTGGATGTGATTCCAGTCAAATTGAGC	ACGTTGGATGATGGACAGCAACATGACCAC	74	R	ATGACCACCATATCCTTCTGCAGATC
EXON 45_6886	A4 ACGTTGGATGTTTCAGCCAAGGGATAACTC	ACGTTGGATGGACCTCAAGAAATCAAGTCC	200	R	AAATCTAAGAAAGTCAAGATATCTCT
EXON 90_12892	A4 ACGTTGGATGAGAGCCTGAAGAAGCAGATG	ACGTTGGATGTTTTTAGCACCTTCGACGAG	187	F	AGTATTTTCATGACCCTCTTGCACTTC
EXON 8_567	A4 ACGTTGGATGCATATCCGTATATCTGCAGG	ACGTTGGATGCAGCAGATACATGATCCTAC	168	R	GATACATGATCCTACTTTCAAGTACCT
EXON 89_11921	A5 ACGTTGGATGTGATTCCAGTCAAATTGAGC	ACGTTGGATGATGGACAGCAACATGACCAC	74	R	CCACCATATCCTTCTGC
EXON 8_556	A5 ACGTTGGATGCATATCCGTATATCTGCAGG	ACGTTGGATGCAGCAGATACATGATCCTAC	168	R	GTACCTTTCAGAGGACA
EXON 45_6800	A5 ACGTTGGATGTTTCAGCCAAGGGATAACTC	ACGTTGGATGGACCTCAAGAAATCAAGTCC	200	R	CCACAACCAGCCAAATAA
EXON 90_12845	A5 ACGTTGGATGAGAGCCTGAAGAAGCAGATG	ACGTTGGATGTTTTTAGCACCTTCGACGAG	187	F	TGAAGGACATGGTCACGG
EXON 90_12919	A5 ACGTTGGATGAGAGCCTGAAGAAGCAGATG	ACGTTGGATGTTTTTAGCACCTTCGACGAG	187	F	CGTTTTTCAGAGGCTTTTTTC
EXON 45_6916	A5 ACGTTGGATGTTTCAGCCAAGGGATAACTC	ACGTTGGATGGACCTCAAGAAATCAAGTCC	200	R	CAAGTCTACCATTACAGAAGA
EXON 93_13528	A5 ACGTTGGATGCACCCTCAGAACTATTTTGC	ACGTTGGATGAACAGTGAGATGTACGTACC	115	R	AGCAAAGTGAATGATAAATG
EXON 46_6992	A6 ACGTTGGATGACTTATCTTCCCCATTCTAC	ACGTTGGATGACTGGATCCGCTATTGGTG	204	R	CTCTCAAAGCAGGACCA
EXON 3_241	A6 ACGTTGGATGGAAGATGATGCTGCTGACTG	ACGTTGGATGTGATTCTCCACGGTGTAG	139	R	CACGGTGTTAGCCAGCA

ID-SNP	Amorce PCR sens (5'-3')	Amorce PCR anti-sens (5'-3')	Taille de l'amplicon (pb)	Sens de l'amorce SBE	Amorce SBE
EXON 90_12944	A6 ACGTTGGATGAGAGCCTGAAGAAGCAGATG	ACGTTGGATGTTTTAGCACCTTCGACGAG	187	R	ACCTTCGACGAGGCTTCCC
EXON 45_6919	A6 ACGTTGGATGTTTCAGCCAAGGGATAACTC	ACGTTGGATGGACCTCAAGAAATCAAGTCC	200	R	CAAGTCCTACCATTACAGA
EXON 90_11989	A6 ACGTTGGATGGTAATGTTGTTAATGGAACGA	ACGTTGGATGGACGACGTCAAAATCCTTTAG	124	F	TGTTAATGGAACGATTGGC
EXON 8_527	A6 ACGTTGGATGCATATCCGTATATCTGCAGG	ACGTTGGATGCAGCAGATACATGATCCTAC	168	R	AGATGAGGTCATCTCCAAC
EXON 89_11917	A6 ACGTTGGATGTGATTCCAGTCAAATTGAGC	ACGTTGGATGATGGACAGCAACATGACCAC	74	R	CCACCATATCCTTCTGCAGAT
EXON 93_13533	A6 ACGTTGGATGAGAGCCTGAAGAAGCAGATG	ACGTTGGATGTTTTAGCACCTTCGACGAG	115	R	AAAAGAGCAAGATGAAATTGAT

#### Annexe 4 Amorces PCR utilisées pour le séquençage direct des exons non inclus dans les multiplexes

Locus	Nombre de SNP recherchés	Taille de l'amplicon (pb)	Tm (C°)	Amorces PCR (5'-3')	
				Sens	Anti-sens
Exon 14	5	122	54,6 - 54,7	GGA AAA GAG ACG TTG GGA GT	TCA AAC AAC TAC GCC TAC AAA AGA
Exon 47	8	106	52,6 - 54	TCC CAT TTG CTT TCT CTT TCT T	TGG TTT TGG ATG CTG TTA TGC
Exon 90_a	10	501	53,7- 54	AAC AAA TGC AAC TGC TTT ACC A	TCTGCTAATTCAGAAAAGTCTGA
Exon 90_b	12	573	55,2 - 54,8	CCAACGATACCCGACTTCAG	CATGTCCTCACGGTCATCTT

## Annexe 5 Résultats de la quantification d'ADN extrait à l'aide du kit Quantifiler™ à partir des 22 échantillons (11 échantillons de foie et 11 échantillons de cœur) selon les trois méthodes d'extraction et calcul de la quantité moyenne d'ADN extrait en fonction du poids de la coupe

### 1. Méthode A : Extraction organique suivie d'une purification avec le kit CleanMix (Talent)

Echantillons	Organe	Poids de la coupe (mg)	Quantification de l'ADN (ng/µl)	IPC (Internal PCR Control)	Quantité totale d'ADN (Q) (µg)	Q/100mg	Organe	Poids de la coupe (mg)	Quantification de l'ADN (ng/µl)	IPC (Internal PCR Control)	Quantité totale d'ADN (Q) (µg)	Q/100mg
		Cœur						Foie				
149/07	Organe Cœur	53	56,1	28,43	4,48	8,45	Organe Foie	42	56,2	28,7	4,496	10,70
151/07		39	45,7	28,39	3,656	9,37		51	53,1	29,46	4,248	8,32
153/07		45	70,2	28,23	5,616	12,48		50	64	28,91	5,12	10,24
154/07		67,2	5,38	27,13	8,97	13,34		47	85,8	27,75	6,86	14,59
157/07		56,2	4,5	26,89	6,82	12,13		41	117	27,42	9,36	22,83
161/07		55	68,4	28,59	5,472	9,94		50	84,64	29,73	6,771	13,54
162/07		40	42,08	29,2	3,366	8,41		40	69,52	29,19	5,561	13,90
163/07		54	60,56	29,56	4,844	8,97		49	56,48	29,23	4,518	9,22
164/07		48	52,72	29,46	4,217	8,78		50	44,24	29,26	3,539	7,07
165/07		44	59,68	29,24	4,774	10,85		50	59,04	28,67	4,723	9,44
167/07		42	46,8	28,68	3,744	8,911		54	45,36	28,39	3,628	6,71

### 2. Méthode B : Kit QIAamp DNA mini® (Qiagen)

Echantillons	Organe	Poids de la coupe (mg)	Quantification de l'ADN (ng/µl)	IPC (Internal PCR Control)	Quantité totale d'ADN (Q) (µg)	Q/100mg	Organe	Poids de la coupe (mg)	Quantification de l'ADN (ng/µl)	IPC (Internal PCR Control)	Quantité totale d'ADN (Q) (µg)	Q/100mg
		Cœur						Foie				
149/07	Organe Cœur	52	5,55	27,75	0,444	0,85	Organe Foie	45	29,7	28,06	2,376	5,28
151/07		31	9,33	27,6	0,746	2,4		48	11,3	28,06	0,904	1,88
153/07		48	10,2	27,6	0,816	1,7		49	9,22	27,85	7,376	1,5
154/07		68	10,8	27,12	0,86	1,26		50	243	30,77	19,44	38,88
157/07		63	5,95	26,56	0,48	0,76		42	41,4	27,06	3,31	7,88
161/07		56	8,94	27,64	0,715	1,27		50	3,624	27,82	0,289	0,58
162/07		43	2,4	28,1	0,192	0,44		40	10,48	27,96	0,838	2,09
163/07		57	3,06	28,1	0,245	0,43		49	2,56	27,86	0,204	0,42
164/07		45	6,128	28,51	0,49	1,08		50	5,872	27,77	0,469	0,94
165/07		46	7,968	27,98	0,637	1,38		49	3,104	28	0,248	0,5
167/07		46	10,8	28,04	0,864	1,87		49	2,512	27,75	0,2	0,41

### 3. Méthode C : Extraction organique suivie d'une purification avec le Kit QIAamp DNA mini®

Echantillons	Organe	Poids de la coupe (mg)	Quantification de l'ADN (ng/µl)	IPC (Internal PCR Control)	Quantité totale d'ADN (Q) (µg)	Q/100mg	Organe	Poids de la coupe (mg)	Quantification de l'ADN (ng/µl)	IPC (Internal PCR Control)	Quantité totale d'ADN (Q) (µg)	Q/100mg
		Cœur						Foie				
149/07	Organe Cœur	52	48,7	28,92	3,896	7,49	Organe Foie	43	80,5	29,68	6,44	14,97
151/07		38	40,9	28,05	3,272	8,61		48	78	29,46	6,24	13
153/07		45	61,9	28,66	4,952	11		52	85,6	29,23	6,848	13,17
154/07		63	129	27,76	10,32	16,38		46	243	31,53	19,44	42,26
157/07		63	116	27,47	9,28	14,73		40	166	29,7	13,28	33,2
161/07		50	75,36	29,89	6,028	12,05		50	143,76	33,17	11,5	23
162/07		40	54,08	29,66	4,326	10,81		41	80,4	29,56	6,432	15,68
163/07		56	94,64	30,34	7,571	13,52		40	68,32	28,3	5,465	13,66
164/07		45	51,52	30,08	4,121	9,16		50	92,32	29,52	7,385	14,77
165/07		44	62,88	29,11	5,03	11,43		50	102,16	29,38	8,172	16,34
167/07		40	43,2	28,71	3,456	8,64		55	83,92	28,89	6,713	12,2

## Annexe 6 Résultats de l'analyse des 105 SNPs sur le gène RyR2 par la technologie iPLEX Gold de Sequenom

FFIP C	<u>AG</u> <u>AG</u>	Identification d'un allèle modifié à la fois sur les prélèvements congelés et FFIP
FFIP C	<u>CT</u> C	Discordance d'assignement entre prélèvements congelés et FFIP
FFIP C	<u>A</u> <u>AG</u>	Identification d'un allèle modifié sur les prélèvements congelés avec discordance d'assignement entre prélèvements congelés et FFIP





Analyse	Individus	Type d'échantillon	Multiplexe 3 = 21 SNP																					Multiplexe 4 = 13 SNP													Multiplexe 5 = 9 SNP									Multiplexe 6 = 8 SNP																																																							
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8																																																
			T>G	EXON101_1452	T>G	EXON102_14601	C>T	EXON103_14705	G>A	EXON105_14877	G>A	EXON107_14977	T>C	EXON12_985	C>G	EXON15_1396	G>A	EXON37_5654_2	C>T	EXON3_184	A>G	EXON40_6134	A>G	EXON42_6467	C>T	EXON44_6737	C>T	EXON46_6982	A>G	EXON50_7528	C>T	EXON83_11332	G>C	EXON88_11837	G>A	EXON8_506	G>A	EXON93_13512	C>A	EXON94_13695	G>C	EXON95_13819	T>C	EXON96_13933	A>G	EXON10_719	T>C	EXON15_1298	G>A	EXON45_6886	G>A	EXON46_6962	G>C	EXON49_7422	C>G	EXON87_11773	G>A	EXON88_11836	G>T	EXON89_11916	A>T	EXON8_567	T>C	EXON90_12058	G>A	EXON90_12892	T>C	EXON93_13531	G>C	EXON97_14011	G>A	EXON45_6800	T>A	EXON89_11921	C>T	EXON8_490	C>A	EXON8_556	G>A	EXON90_12028	C>T	EXON90_12845	C>T	EXON90_12919	G>A	EXON93_13528	G>A	EXON45_6916	A>C	EXON3_241	T>C	EXON45_6919	T>C	EXON46_6992	G>C	EXON89_11917	G>A	EXON8_527	A>G	EXON90_11989	G>A
ANALYSE 1	12	FFIP C	GT	T	T	C	G	G	T	C	C	A	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	G	C	C	G	T	A	T	G	G	C	G	G	A	T	G	T	G	G	T	A	T	G	G	C	C	G	G	A	T	T	G	G	A	G	T																																									
	10	FFIP C	T	T	C	G	G	T	C	C	A	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	G	C	C	G	T	A	T	G	G	C	G	G	A	T	G	T	G	G	T	A	T	G	G	A	G	T																																																
	11	FFIP C	G	T	T	C	G	G	T	C	C	A	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	G	C	C	G	T	A	T	G	G	C	G	G	A	T	G	T	G	G	T	A	T	G	G	A	G	T																																																		
	7	FFIP C	GT	T	T	C	G	G	T	C	C	A	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	G	C	C	G	T	A	T	G	G	C	G	G	A	T	G	T	G	G	T	A	T	G	G	A	G	T																																																		
	8	FFIP C	GT	T	T	C	G	G	T	C	C	A	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	G	C	C	G	T	A	T	G	G	C	G	G	A	T	G	T	G	G	T	A	T	G	G	A	G	T																																																		
	9	FFIP C	GT	T	T	C	G	G	T	C	AG	C	A	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	G	C	C	G	T	A	T	G	G	C	G	G	A	T	G	T	G	G	T	A	T	G	G	A	G	T																																																	
	1	FFIP C	T	T	C	G	G	T	C	C	A	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	G	C	C	G	T	A	T	G	G	C	G	G	A	T	G	T	G	G	T	A	T	G	G	A	G	T																																																
	2	FFIP C	T	T	C	G	G	T	C	C	A	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	G	C	C	G	T	A	T	G	G	C	G	G	A	T	G	T	G	G	T	A	T	G	G	A	G	T																																																
	3	FFIP C	T	T	C	G	G	T	C	C	A	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	G	C	C	G	T	A	T	G	G	C	G	G	A	T	G	T	G	G	T	A	T	G	G	A	G	T																																																
	4	FFIP C	GT	T	T	C	G	G	T	C	C	A	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	G	C	C	G	T	A	T	G	G	C	G	G	A	T	G	T	G	G	T	A	T	G	G	A	G	T																																																		
	5	FFIP C	T	T	C	G	G	T	C	C	A	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	G	C	C	G	T	A	T	G	G	C	G	G	A	T	G	T	G	G	T	A	T	G	G	A	G	T																																																
	6	FFIP C	GT	T	T	C	G	G	T	C	C	A	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	G	C	C	G	T	A	T	G	G	C	G	G	A	T	G	T	G	G	T	A	T	G	G	A	G	T																																																		
ANALYSE 2	12	FFIP C	T	T	C	G	G	T	C	C	A	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	G	C	C	G	T	A	T	G	G	C	G	G	A	T	G	T	G	G	T	A	T	G	G	A	G	T																																																			
	10	FFIP C	GT	T	T	C	G	G	T	C	C	A	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	G	C	C	G	T	A	T	G	G	C	G	G	A	T	G	T	G	G	T	A	T	G	G	A	G	T																																																		
	11	FFIP C	G	T	T	C	G	G	T	C	C	A	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	G	C	C	G	T	A	T	G	G	C	G	G	A	T	G	T	G	G	T	A	T	G	G	A	G	T																																																		
	7	FFIP C	GT	T	T	C	G	G	T	C	C	A	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	G	C	C	G	T	A	T	G	G	C	G	G	A	T	G	T	G	G	T	A	T	G	G	A	G	T																																																		
	8	FFIP C	GT	T	T	C	G	G	T	C	C	A	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	G	C	C	G	T	A	T	G	G	C	G	G	A	T	G	T	G	G	T	A	T	G	G	A	G	T																																																		
	9	FFIP C	T	T	C	G	G	T	C	AG	C	A	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	G	C	C	G	T	A	T	G	G	C	G	G	A	T	G	T	G	G	T	A	T	G	G	A	G	T																																																		
	1	FFIP C	T	T	C	G	G	T	C	C	A	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	G	C	C	G	T	A	T	G	G	C	G	G	A	T	G	T	G	G	T	A	T	G	G	A	G	T																																																
	2	FFIP C	T	T	C	G	G	T	C	C	A	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	G	C	C	G	T	A	T	G	G	C	G	G	A	T	G	T	G	G	T	A	T	G	G	A	G	T																																																
	3	FFIP C	T	T	C	G	G	T	C	C	A	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	G	C	C	G	T	A	T	G	G	C	G	G	A	T	G	T	G	G	T	A	T	G	G	A	G	T																																																
	4	FFIP C	T	T	C	G	G	T	C	C	A	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	G	C	C	G	T	A	T	G	G	C	G	G	A	T	G	T	G	G	T	A	T	G	G	A	G	T																																																
	5	FFIP C	T	T	C	G	G	T	C	C	A	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	G	C	C	G	T	A	T	G	G	C	G	G	A	T	G	T	G	G	T	A	T	G	G	A	G	T																																																
	6	FFIP C	T	T	C	G	G	T	C	C	A	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	A	C	C	G	G	C	C	G	T	A	T	G	G	C	G	G	A	T	G	T	G	G	T	A	T	G	G	A	G	T																																																

**Annexe 7 Coût du séquençage direct (SD) versus la technique HRM couplée au séquençage direct ciblé (HRM/SDC) pour l'ensemble des exons du gène KCNQ1. Calcul réalisé pour les 8 échantillons selon le type d'échantillons (congelés ou FFIP)**

Paramètre	SD pour 16 exons	HRM/SDC pour 13 exons + SD de 3 exons							
	FFIP et congelé	FFIP				Congelé			
Type d'échantillon		HRM	SDC	SD de 3 exons	Subtotal	HRM	SDC	SD de 3 exons	Subtotal
Coût des consommables	600€	110€	80€	110€	300€	110€	25€	110€	245€
Coût des réactifs (kit)	2100€	830€	270€	400€	1500€	830€	80€	400€	1310€
Coût total du temps de travail (avec un temps unitaire de travail évalué à 23 € h <sup>-1</sup> )	462€	161€	115€	115€	391€	161€	23€	115€	299€
Temps de laboratoire et d'analyse des résultats	22h	7h	5h	5h	17h	7h	1h	5h	13h
<b>Coût total de l'analyse</b>	<b>3162€</b>				<b>2191€</b>				<b>1854€</b>

# Publications



**Efficiency evaluation of a DNA extraction and purification protocol on archival formalin-fixed and paraffin-embedded tissue.**

A. FARRUGIA, C. KEYSER, B. LUDES.

*Forensic Science International, Janvier 210, 194(1-3): e25-e28.*





## Rapid communication

## Efficiency evaluation of a DNA extraction and purification protocol on archival formalin-fixed and paraffin-embedded tissue

A. Farrugia\*, C. Keyser, B. Ludes

Institute of Legal Medicine, EA4438, University of Strasbourg, 11 rue Human 67085, Strasbourg Cedex, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 9 February 2009

Received in revised form 29 June 2009

Accepted 2 September 2009

Available online 24 September 2009

## Keywords:

Formalin-fixed and paraffin-embedded Tissue

DNA extraction

Phenol–chloroform

Silica based-spin columns

## ABSTRACT

Formalin-fixed and paraffin-embedded tissue (FF-PET) is an invaluable resource for retrospective molecular genetic studies, but the extraction of high-quality genomic DNA from FF-PET is still a problematic issue. Despite the range of DNA extraction methods currently in use, the association of phenol–chloroform extraction and silica-based purification protocols, reported in ancient DNA studies on archaeological bones, has, to our knowledge, not been used for DNA extraction from FF-PET yet. The present study compared the efficiency of three DNA extraction and purification protocols from two different FF-PET substrates, heart and liver, by using quantitative PCR and multiplex amplification.

We showed that the method, using phenol–chloroform and the QIAamp DNA mini<sup>®</sup> Kit (Qiagen), was the most effective DNA extraction and purification method and that the DNA quantity extracted from liver is statistically more important than that extracted from heart. Autosomal STR typing by multiplex amplifications gave partial allelic profiles with only small size products (less than 300 bases) amplified, suggesting that DNA extracted from FF-PET was degraded.

In conclusion, the protocol presented here, previously described in studies on ancient bones, should find application in different molecular studies involving FF-PET material.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The extraction of DNA from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue (FF-PET) enables pathologists to use archival material for a variety of purposes including retrospective molecular genetic studies based on DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR). However, there are several reasons for the failure of PCR using DNA isolated from FF-PET:

- (i) the generation of DNA–protein cross-linkages due to formaldehyde solution resulting in nucleic acid fragmentation [1,2],
- (ii) the presence of remnants of substances that inhibit the amplification reaction such as formalin [3] or inhibit the proteinase K used in the extraction procedure such as xylene [4],
- (iii) the risk of contamination during manipulation of samples.

Because of these difficulties, number of DNA extraction methods have been tested and several studies comparing different methods have been published such as phenol–chloroform method [3–7], ammonium acetate precipitation [8,6], ethanol precipitation [9] and commercially available kits based on silica binding principle [3–11].

The combination of phenol–chloroform extraction and silica-based purification method, developed for DNA extraction from ancient bones [12] has to your knowledge, not yet been tested on FF-PET.

The aim of this work was to test the efficiency of such protocol on FF-PET. Indeed, one of the major difficulties in using FF-PET is the degradation of nucleic acids [5] like in archeological biological remains.

For this purpose we compared the use of organic extraction coupled with silica-based purification method using two different commercial kits, CleanMix (Talent) [13–15] and QIAamp DNA mini<sup>®</sup> Kit (Qiagen) to the most popular method based on direct use of the commercial QIAamp DNA mini<sup>®</sup> Kit (Qiagen).

Tests were performed from two types of substrates, heart and liver from 22 individuals.

## 2. Materials and methods

## 2.1. Samples

Twenty two formalin-fixed and paraffin-embedded (FF-PE) tissue blocks from heart and liver autopsy tissue were obtained from the Forensic Institute of Strasbourg, France. The preparation of the FF-PE block was done with the same size of fresh tissue (1.5 cm wide, 1.5 cm long, and 0.3 cm of thickness). All of them had been fixed in 10% buffered formalin. The average period of fixation was 34.27 days (min = 28 days and max = 51 days) at room temperature. This formalin fixation time usually corresponds to the time of tissue fixation before inclusion in paraffin in our Medico-legal Institute. The time elapsing between autopsy and tissue sampling was less than three days.

\* Corresponding author. Tel.: +33 368853363; fax: +33 368853362.

E-mail address: [audrey.farrugia@unistra.fr](mailto:audrey.farrugia@unistra.fr) (A. Farrugia).



After the formalin fixation and paraffin inclusion steps, the surrounding paraffin was removed with a scalpel and the center of the organ was trimmed to a surface of 1 cm<sup>2</sup> of tissue. Then using a standard microtome with disposable blade, serial sections of 50 µm thickness from each FF-PE blocks were obtained and placed in a microcentrifuge tube. Each sample weigh ranged from 38 to 57 mg. Because of the low density of paraffin wax (inferior to water's density), we have considered that the presence of paraffin in our samples had not affected the measurements of tissue weight.

Great care was taken to prevent cross-contamination between samples by using fresh blades for each specimen and by cleaning the microtome with DNase Away (Molecular Bioproducts) between specimens.

2.2. DNA deparaffinization and rehydration

The technique for paraffin removal was based on that described by Goelz et al. [16] using two xylene washes (1 mL of xylene for 10 min at room temperature), followed by decreasing concentration of alcohol (ethanol, 100%, 95%, 70%) and then two distilled water washes [4]. Then samples were rehydrated with Tris/EDTA (Tris 100 mM, pH7.5, EDTA 5 M) for 5 min at room temperature and Tris buffered solution (100 mM, pH7.5) for 20 h at 55 °C with four changes of solution. To avoid loss of sample, centrifugation (13,500 rpm, 5 min) was performed before each change of solution [4].

2.3. DNA extraction and purification: three protocols

The material studied was submitted to one of the following DNA extraction and purification methods.

2.3.1. Protocol A: phenol–chloroform followed by the use of the CleanMix Kit [13]

Tissue digestion was realized by incubation of the samples at 55 °C overnight with 300 µL of lysis-buffer (100 mM Tris–HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA, 1% sodium dodecyl sulfate, 1 mg/mL proteinase K). After incubation, a phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25/24/1, v/v) extraction was performed on the supernatant.

The aqueous phase was then purified with the CleanMix purification kit according to the manufacturer's instructions (Talent, Trieste, Italy).

2.3.2. Protocol B: direct use of the QIAamp DNA mini<sup>®</sup> Kit (Qiagen)

The extraction and purification procedure was performed according to the manufacturer's instructions (QIAamp DNA mini<sup>®</sup> Kit, Qiagen). Briefly, samples were digested with Qiagen Proteinase K and lysis-buffer at 55 °C overnight and loaded onto spin columns. DNA was then adsorbed by short centrifugation onto the QIAamp silica membrane, washed and eluted with 100 µL water.

2.3.3. Protocol C: phenol–chloroform followed by the use of the QIAamp DNA mini<sup>®</sup> Kit (Qiagen)

This method was performed as described above, but with an additional step. After proteinase K digestion, a phenol–chloroform–isoamyl alcohol purification was added as in protocol A. The supernatant was carefully removed and the next steps of the QIAamp DNA mini<sup>®</sup> Kit (Qiagen) were performed according to the manufacturer's instructions (QIAamp).

In total 132 DNA extractions were performed, sourced from 22 blocks of heart and liver by using the three above mentioned methods.

2.4. Polymerase chain reaction and typing

To detect potential cross-contamination and to evaluate the efficiency of the amplification, the DNA extracts were typed with AmpFISTR<sup>®</sup> Identifier<sup>™</sup> Amplification Kit according to the manufacturer's recommendation (Applied Biosystems). Fifteen Short Tandem Repeats (STRs) loci (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, and FGA) and the gender-identification locus amelogenine were simultaneously amplified using Biometra T3<sup>™</sup> (Biometra<sup>®</sup>). The separation of the

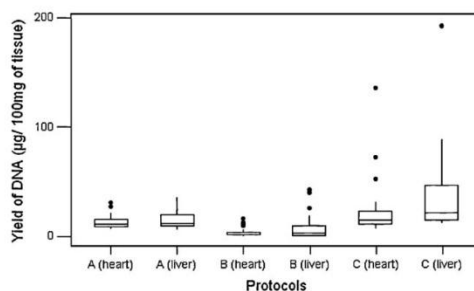


Fig. 1. Yield of DNA extracted from heart and liver with three different protocols: A = phenol–chloroform extraction followed by the use of the commercial CleanMix Kit, B = direct use of the commercial QIAamp DNA mini<sup>®</sup> Kit, C = phenol–chloroform extraction followed by the use of the commercial QIAamp DNA mini<sup>®</sup> Kit.

PCR products was performed by capillary electrophoresis on an ABI PRISM<sup>®</sup> 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems), and genotyping was made with the Gene Mapper v1.02 (Applied Biosystems). Genotypes of all persons involved in the processing of the samples were determined and compared to the results obtained from each FF-PET samples.

2.5. Concentration measurements

DNA was quantified by real-time PCR using Quantifiler<sup>™</sup> Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems, AB, Foster City, CA) with the ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 Sequence Detection System (AB) following the manufacturer's recommendations.

2.6. Statistical methods

Quantitative data were submitted to a variance analysis to detect differences among the amount of DNA obtained from different extraction method and from different substrates. For statistical analysis, we used SPSS for Windows. Differences were considered statistically significant when the probability (*p*) was less than 0.05.

3. Results

3.1. Yield of DNA

The amount of DNA extracted from each FF-PET heart and liver sample by each method is shown in Fig. 1. The mean values of DNA

Table 1 Mean values of DNA extracted (µg/100 mg of tissue) with three protocols without taken into account the type of substrates.

Protocol	Mean	Standard error	95% Confidence intervals (CIs)	
			Minimum	Maximum
A	13.997	1.405	11.075	16.919
B	5.894	1.675	2.411	9.377
C	30.104	6.676	16.221	43.987

Table 2 Comparison of mean values differences between the three protocols (based on the estimated marginal means).

Protocol (I)	Protocol (J)	Mean differences (I–J)	Standard error	Signification <sup>a</sup>	95% CIs of the mean differences <sup>a</sup>	
					Minimum	Maximum
A	B	8.103 <sup>+</sup>	2.189	0.001 <sup>+</sup>	3.551	12.655
	C	–16.107 <sup>+</sup>	6.043	0.014 <sup>+</sup>	–28.673	–3.540
B	A	–8.103 <sup>+</sup>	2.189	0.001 <sup>+</sup>	–12.655	–3.551
	C	–24.210 <sup>+</sup>	6.242	0.001 <sup>+</sup>	–37.191	–11.228
C	A	16.107 <sup>+</sup>	6.043	0.014 <sup>+</sup>	3.540	28.673
	B	24.210 <sup>+</sup>	6.242	0.001 <sup>+</sup>	11.228	37.191

<sup>+</sup> The difference in averages is significant for *p* = 0.05.

<sup>a</sup> Adjustment of multiple comparisons: the least significant difference (equivalent to no adjustment).

**Table 3**  
Mean of DNA extracted ( $\mu\text{g}/100\text{ mg}$  of tissue) from heart and liver without taken into account the type of protocol used.

Tissue	Mean	Standard error	95% CIs	
			Minimum	Maximum
Heart	13.645	2.401	8.652	18.638
Liver	19.685	3.502	12.402	26.969

**Table 4**  
Comparison of mean differences between heart and liver (based on the estimated marginal means).

Tissue (I)	Tissue (J)	Mean differences (I–J)	Standard error	Signification <sup>a</sup>	95% CIs of the mean differences <sup>a</sup>	
					Minimum	Maximum
Heart	Liver	–6.041	2.438	0.022*	–11.111	–0.971
Liver	Heart	6.041	2.438	0.022*	0.971	11.111

\* The difference in averages is significant for  $p=0.05$ .

<sup>a</sup> Adjustment of multiple comparisons: the least significant difference (equivalent to no adjustment).

extracted is shown in Table 1. These values do not take the type of substrate into account. Variance analyses show significant differences between the three methods employed ( $p=0.001$ ). Each method differs from the two others: method A differs from method B ( $p=0.001$ ) and method C ( $p=0.014$ ) and method B differs from method C ( $p=0.001$ ) (Table 2). The amount of DNA obtained by method C using a combination of phenol–chloroform extraction and QIAamp DNA mini<sup>®</sup> Kit (Qiagen) purification ( $p < 0.05$ ) was higher than that obtained by methods A and B with  $p < 0.05$ .

The mean values of DNA extracted from the two types of substrates is shown in Table 3. These values do not take the type of protocol used into account. Variances analyses (Table 4) show that the DNA quantity extracted from liver is more important than that extracted from the heart with statistical difference ( $p=0.022$ ).

### 3.2. Autosomal STR analysis

The DNA profiling results were compared to the genotypes of all persons involved in processing samples. No match was observed, indicating that the precautions taken against the risk of sample contamination were efficient. The molecular and morphological sex determinations were in accordance for all samples, showing the authenticity of amplification products [17]. Autosomal STR typing gave partial allelic profiles for all subjects. Larger sized loci (more than 300 bases) always failed to amplify suggesting that DNA extracted from FF-PET was degraded. Repeated amplifications showed that the degree of reproducibility was high, indicating that despite DNA degradation, the DNA molecules present in these samples had a high quality standard.

## 4. Discussion

Genomic DNA isolated from FF-PET has important applications in retrospective epidemiologic studies, notably in sudden unexplained death [18,19], in which most often FF-PET is the unique source of genetic material. Using paraffin-embedded material is also useful in prospective studies according to the facility to collect tissues from already existing archives in comparison to frozen fresh tissues that need a specific collection, with dedicated spaces and specific equipment.

It is well known that the quality and quantity of nucleic acid extracted from archival tissue are highly dependent on the fixative procedure [11]. The samples used in this study were fixed with buffered formaldehyde during approximately 30 days that corre-

spond to the fixative time where DNA could be detected in different tissues such as cardiac muscle, skeletal muscle, liver, kidney and brain as demonstrated previously [20,21]. According to Carturan et al. [10] different tissues show different yields of DNA. In this study, we found that DNA quantity extracted from liver is more important than DNA extracted from heart with statistical difference ( $p < 0.05$ ). Such a result might be explained by the fact that the number of polyploidy cells averages 30–40% in the adult liver [22].

We could logically think that the use of two purification steps (phenol–chloroform followed by silica matrix in methods A and C) instead of one (silica matrix alone in method B) could lead to lower DNA recovery, because of DNA loss on each step. However we concluded that the method C, using phenol–chloroform and QIAamp DNA mini<sup>®</sup> Kit (Qiagen), was the most effective DNA extraction and purification method. There are at least two different explanations of these results. The first one is that the phenol–chloroform purification probably has constituted an important step for the removal of potential contaminants from aqueous phase that could interfere with the subsequent DNA binding capacity of the silica matrix. The second one is that the phenol–chloroform and the silica matrix steps might remove potential PCR inhibitors allowing successful PCR amplification [23].

This method allowed to obtain the highest amount of DNA among the three methods tested, with statistical difference ( $p < 0.05$ ). It was possible to amplify DNA from all samples but PCR amplification strength is inversely related to product size which is a typical molecular behavior of degraded DNA. Such result is typically obtained from degraded DNA [6]. Indeed, Lehmann and Kreipe [2] described that the average fragment length of DNA is 300–400 bases in biopsy tissues, but much shorter in postmortem paraffin wax embedded tissues.

Despite DNA degradation, repeated amplifications showed that the degree of reproducibility was high, indicating that, the DNA molecules present in these samples were of good quality.

As far as we know, this is the first report where association of phenol–chloroform and silica matrix in DNA extraction and purification from FF-PET is used. However, the use of FF-PET for retrospective studies requires the use of primers that generate small amplification products, because larger DNA fragments are more difficult to amplify [24].

In conclusion, the protocol presented in this study, previously described in articles on ancient DNA, should be widely exploited in different molecular studies involving FF-PET material.

### Acknowledgement

We gratefully thank Jean Luc Fausser for his technical help.

### References

- [1] M.Y. Feldman, Reactions of nucleic acids and nucleoproteins with formaldehyde, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 13 (1973) 1–49.
- [2] U. Lehmann, H. Kreipe, Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies, *Methods* 25 (2001) 409–418.
- [3] W. Cao, M. Hashibe, J.Y. Rao, H. Morgenstern, Z.F. Zhang, Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells, *Cancer Detect. Prev.* 27 (2003) 397–404.
- [4] R. Coura, J.C. Prolla, L. Meurer, P. Ashton-Prolla, An alternative protocol for DNA extraction from formalin-fixed and paraffin wax embedded tissue, *J. Clin. Pathol.* 58 (2005) 894–895.
- [5] S. Bonin, F. Petretra, B. Niccolini, G. Stanta, PCR analysis in archival postmortem tissues, *Mol. Pathol.* 56 (2003) 184–186.
- [6] E.R. Rivero, A.C. Neves, M.G. Silva-Valenzuela, S.O. Sousa, F.D. Nunes, Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues, *Pathol. Res. Pract.* 202 (2006) 523–529.
- [7] Y. Sato, R. Sugie, B. Tsuchiya, T. Kameya, M. Natori, K. Mukai, Comparison of the DNA extraction methods for polymerase chain reaction amplification from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues, *Diagn. Mol. Pathol.* 10 (2001) 265–271.
- [8] M.C. Santos, C.P. Saito, S.R. Line, Extraction of genomic DNA from paraffin-embedded tissue sections of human fetuses fixed and stored in formalin for long periods, *Pathol. Res. Pract.* 204 (2008) 633–636.

- [9] T.S. Frank, S.M. Svoboda-Newman, E.D. Hsi, Comparison of methods for extracting DNA from formalin-fixed paraffin sections for nonisotopic PCR, *Diagn. Mol. Pathol.* 5 (1996) 220–224.
- [10] E. Carturan, D.J. Tester, B.C. Brost, C. Basso, G. Thiene, M.J. Ackerman, Postmortem genetic testing for conventional autopsy-negative sudden unexplained death: an evaluation of different DNA extraction protocols and the feasibility of mutational analysis from archival paraffin-embedded heart tissue, *Am. J. Clin. Pathol.* 129 (2008) 391–397.
- [11] M.T. Gilbert, T. Haselkorn, M. Bunce, J.J. Sanchez, S.B. Lucas, L.D. Jewell, E. Van Marck, M. Worobey, The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues—which methods are useful when? *PLoS ONE* 2 (2007) e537.
- [12] C. Keyser-Tracqui, B. Ludes, Methods for the study of ancient DNA, *Methods Mol. Biol.* 297 (2005) 253–264.
- [13] C. Keyser-Tracqui, E. Crubézy, B. Ludes, Nuclear and mitochondrial DNA analysis of a 2,000-year-old necropolis in the Egyin Gol Valley of Mongolia, *Am. J. Hum. Genet.* 73 (2003) 247–260.
- [14] F.X. Ricaut, C. Keyser-Tracqui, E. Crubézy, B. Ludes, STR-genotyping from human medieval tooth and bone samples, *Forensic Sci. Int.* 151 (2005) 31–35.
- [15] F.X. Ricaut, S. Kolodetsnikov, C. Keyser-Tracqui, A.N. Alekseev, E. Crubézy, B. Ludes, Molecular genetic analysis of 400-year-old human remains found in two Yakut burial sites, *Am. J. Phys. Anthropol.* 129 (2006) 55–63.
- [16] S.E. Goelz, S.R. Hamilton, B. Vogelstein, Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin-embedded human tissue, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 130 (1985) 118–126.
- [17] E. Meyer, M. Wiese, H. Bruchhaus, M. Claussen, A. Klein, Extraction and amplification of authentic DNA from ancient human remains, *Forensic Sci. Int.* 113 (2000) 87–90.
- [18] A. Doolan, N. Langlois, C. Chiu, J. Ingles, J.M. Lind, C. Semsarian, Postmortem molecular analysis of KCNQ1 and SCN5A genes in sudden unexplained death in young Australians, *Int. J. Cardiol.* 127 (2008) 138–141.
- [19] S.S. Chugh, O. Senashova, A. Watts, P.T. Tran, Z. Zhou, Q. Gong, J.L. Titus, S.J. Hayflick, Postmortem molecular screening in unexplained sudden death, *J. Am. Coll. Cardiol.* 43 (2004) 1625–1629.
- [20] C.E. Greer, J.K. Lund, M.M. Manos, PCR amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies, *PCR Methods Appl.* 1 (1991) 46–50.
- [21] F. Miething, S. Hering, B. Hanschke, J. Dressler, Effect of fixation to the degradation of nuclear and mitochondrial DNA in different tissues, *J. Histochem. Cytochem.* 54 (2006) 371–374.
- [22] B.N. Kudryavtsev, M.V. Kudryavtseva, G.A. Sakuta, G.I. Stein, Human hepatocyte polyploidization kinetics in the course of life cycle, *Virchows Arch. B: Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 64 (1993) 387–393.
- [23] D.P. Jackson, F.A. Lewis, G.R. Taylor, A.W. Boylston, P. Quirke, Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction, *J. Clin. Pathol.* 43 (1990) 499–504.
- [24] P.J. Coates, A.J. d'Ardenne, G. Khan, H.O. Kangro, G. Slavin, Simplified procedures for applying the polymerase chain reaction to routinely fixed paraffin wax sections, *J. Clin. Pathol.* 44 (1991) 115–118.

**Detection of genetic variation in KCNQ1 gene by High Resolution Melting analysis in a prospective-based series of postmortem negative sudden death: comparison of results obtained in fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissues.**

A. FARRUGIA, C. KEYSER, B. LUDES.

*International Journal of legal medicine, Juillet 2012, 126, (4): 649-657.*



## Detection of genetic variation in *KCNQ1* gene by high-resolution melting analysis in a prospective-based series of postmortem negative sudden death: comparison of results obtained in fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissues

Audrey Farrugia · Christine Keyser · Bertrand Ludes

Received: 2 November 2011 / Accepted: 23 February 2012  
© Springer-Verlag 2012

**Abstract** High-resolution melting (HRM) analysis is a recently developed molecular technique proved to be applicable for detection of genetic variation, notably in sudden cardiac death. In certain circumstances, especially in postmortem genetic investigations, the formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissues are the only DNA source available. The present study aimed to develop HRM assays, optimized for the analysis of FFPE tissues, to detect sequence variations in *KCNQ1* exons in a prospective population-based series of postmortem negative sudden death and to compare the results between the paired freshly frozen and FFPE tissue samples simultaneously obtained from the same case. The analyses were conducted in each case of sudden death involving cases younger than 35 years with no significant morphological anomalies particularly with no cardiac structural disease and with negatives toxicological investigations. HRM analysis was successfully optimized for 13 of the 16 exons of the *KCNQ1* gene. All mutated samples were correctly identified by HRM whatever the type of tissue tested. However, for FFPE samples, HRM indicated more positive samples than classical sequencing, used in parallel, due to the degradation of DNA by formalin fixation. This is the first postmortem study of *KCNQ1* mutation detection with HRM on DNA extracted from FFPE samples with adapted protocol. Despite the false-positive detection, we concluded that the use of HRM as a screening method with FFPE samples to analyze *KCNQ1* mutations can reduce the number of sequencing reactions and, thus, results in substantial time and cost savings.

**Keywords** High-resolution melting · Sudden cardiac death · *KCNQ1* · Formalin-fixed and paraffin-embedded tissue

### Introduction

In developed countries, sudden cardiac death (SCD) is considered as one of the most common cause of death, representing a major health problem [1, 2]. Although the majority of cardiac death victims are elderly, many children and young adults under the age of 35 years die each year due to various cardiac pathologies. Structural cardiovascular abnormalities are often evident at autopsy, including hypertrophic cardiomyopathy, arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, myocarditis, or congenital coronary artery anomalies [3, 4]. However, it has been described that the cause of death remains unknown in 10–30 % of cases of sudden death in young adults and children [3, 5]. Potentially lethal and heritable ion channel disorders or “channelopathies” such as long QT syndromes (LQTS), catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT) or Brugada syndrome may be responsible for a portion of those cases. In the last years, many of the mutated genes implicated in these channelopathies have been identified and their role in the development of cardiac arrhythmias has been confirmed [6].

To date, different technologies and genetic approaches have been developed for the diagnosis of these cardiac disorders. These technologies enable the single nucleotide mutation screening (with notably the iPLEX Gold technology from Sequenom [7] or the SNaPshot technology [8]), the scanning of known genes or the searching for new genes [9]. Among the molecular techniques, which aimed to detect novel and/or known DNA sequence variant,

A. Farrugia (✉) · C. Keyser · B. Ludes  
Institute of Legal Medicine,  
Strasbourg, France  
e-mail: audrey.farrugia@unistra.fr

the high-resolution melting (HRM) analysis is a recently developed methodology that has an enormous potential [10]. The HRM is a simple, semi-automated and cost-effective approach to identify single-base substitutions and small insertions/deletions with nearly 100 % detection [11, 12]. The HRM assay is based on a real-time polymerase chain reaction (PCR) amplification of genomic DNA with target specific primers in the presence of a fluorescent intercalating DNA dye followed by a fluorescent melting curves of PCR amplicons to discriminate between wild-type and mutant DNA. The HRM assay is particularly suited as a prescreening test to decide whether or not a specimen should be subjected to subsequent classical sequencing in order to identify nucleotide alteration(s). As recently reviewed, the list of genes analyzed by HRM is increasing [13]. Among the different cardiac channelopathy susceptibility genes implicated in sudden death with structurally normal heart (namely 12 genes in LQTS [14], seven genes in Brugada Syndrome [15], two genes in CPTV [16, 17]), three genes (KCNQ1, KCNH2, and SCN5A) have been studied by Millat et al. by HRM analysis [12, 18]. The KCNQ1, KCNH2, and SCN5A genes account for 70–75 % of definite congenital LQTS cases with a frequency in the affected people of 40–55, 35–45, and 2–8 %, respectively [14]. In the last study of Millat et al. [18], the HRM analysis was performed on DNA extracted from whole blood in a panel of LQTS-suspected patients.

In cases of autopsy-negative sudden cardiac death in the young adult, postmortem genetic diagnosis of mutations in cardiac ion channel genes was performed from different sort of samples: DNA immediately extracted from blood or tissue taken during autopsy [19], DNA extracted from EDTA blood samples [20], DNA extracted from paraffin-embedded tissue [2, 21, 22], or DNA extracted from frozen tissue [23]. Concerning the problematic investigations on sudden cardiac death in France, the principal limitation to perform prospective or retrospective postmortem molecular study is the possibility of having access to the appropriate sampling and storage material [9, 24]. Because of the constraints that are required to collect frozen fresh tissues (such as the necessity to have dedicated spaces and specific equipment to preserve the samples), the FFPE samples are more frequently the unique source of DNA.

If HRM analysis was previously validated as a screening method for EGFR and KRAS mutation detection on degraded DNA from FFPE tissues in lung or colorectal cancer studies [25–29], no previous study has evaluated the use of HRM for mutation screening on FFPE samples on gene implicated in sudden cardiac death. The main objective of the present study was to develop HRM assays, optimized for the analysis of FFPE tissues, to detect sequence variations in KCNQ1 exons by using as control the freshly frozen specimens simultaneously obtained from the same case. The KCNQ1 gene was selected in a first approach because it

represents a large percentage of the long QT syndrome mutations (40–55 % according to Hedley et al. [14]), and for its low number of small size exons.

## Materials and methods

### Process of investigations

During 3 years (2008–2010), 5 g of fresh tissue of heart and liver were retained and frozen at  $-80^{\circ}$  at the initial autopsy of individuals 0–40 years of age where the cause of sudden death was not immediately apparent. After 4–6 weeks, time during which histopathology and toxicology results became available, we determined if genetic investigations should start within the judicial mandate which is to establish the cause of death. The inclusion criteria were: no organic abnormality, no macroscopical, or microscopical abnormalities of the heart and negatives toxicological analyses. All the histopathological examinations of the heart was realized by the same histopathologist specialized in cardiac disease according to the guidelines of Association for European Cardiovascular Pathology [1]. For each case, tissue samples (heart and liver) were processed under freshly frozen and FFPE conditions in parallel. The time of fixation in the buffered formaldehyde is specified in Table 1. We also included in the cohort four negatives controls (wild-type samples). Forensic investigations including genetic testing were carried out within the judicial mandate which is to determine the cause of death.

### DNA extraction and quantification

The DNA extraction was adapted to the type of tissue. For the FFPE tissue, we used the protocol consisting in the association of phenol-chloroform and QIAamp DNA mini<sup>®</sup> Kit (Qiagen) as previously described [30]. The frozen samples were extracted and purified by using the QIAamp DNA Mini<sup>®</sup>

**Table 1** Characteristics of the cohort

Case	Sex	Age	Time of formalin fixation (days)
1	F	4 Months	17
2	M	20 Years	7
3	M	2 Months	11
4	F	3 Years	16
5	M	20 Years	4
6	F	16 Years	11
7	F	8 Days	16
8	M	3 Months	6

F female, M male

Kit according to the manufacturer's instructions. Quantification of all DNA samples was made with the NanoDrop™ 8000 Spectrophotometer (Thermo Scientific®).

#### Design of HRM primers

Primers giving rise to short amplicons were designed as they are more likely to result in satisfactory amplification from degraded FFPE DNA. Each primer, designed with Primer3 software, was analyzed with FastPCR software (Institute of Biotechnology, University of Helsinki) for the detection of hairpin or dimer formations and was submitted to Basic Local Alignment Search Tool search to ensure they are specific for the target species and gene.

Identical primers pairs were used for HRM analysis and sequencing of KCNQ1 exons. Primers sequence is listed in Table 2. Two types of primers, high-performance liquid chromatography (HPLC) and non-HPLC were tested.

#### PCR and HRM conditions

Real-time PCR amplification and HRM analysis were performed on Light Cycler®480 Real-Time PCR Systems (Roche Diagnostics) by using the Light Cycler®480 High

Resolution Melting Master kit (Roche Applied Science) according to the manufacturer's instructions.

The first step was to determine the optimal MgCl<sub>2</sub> concentration for each exon with the four negatives controls. MgCl<sub>2</sub> concentrations between 1.2 and 4 mM were evaluated with a touchdown PCR program (annealing temperature from +65 to 53°C). The second step was to test two different PCR touchdown program (annealing temperature from +65 to 53°C and 68 to 59°C). The DNA concentration was adapted depending on the Cp value. PCR amplifications were carried out in a final volume of 20 µL containing 10 µL of Master mix, 0.25 µM of each primer, DNA, and MgCl<sub>2</sub> at indicated concentration in Table 2.

The PCR conditions were: pre-incubation step at 95°C for 10 min for activation of the polymerase, followed by 35 cycles of 95°C for 10 s, a touchdown for 15 s (1°C/s) with annealing temperature from 65 to 53°C or 68 to 59°C (depending on the exon at indicated in Table 2) and extension step at 72°C for 20 s. After the amplification, the PCR products were denatured at 95°C for 1 min and cooled down to 40°C. The final HRM step was performed from 70 to 95°C with increase of 1°C per second with 25 acquisitions per degree. As HRM could induce some false positives, all samples were tested in duplicate with four negative controls

**Table 2** Specific primers used and HRM conditions for HRM analyses

Exon	Primers (5'→3')		PCR conditions				HRM conditions
	Forward	Reverse	Amplicon Size (bp)	T <sup>a</sup> (°C)	DNA (ng)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	
1	1a	CGG CAG GCC CTC CTC GTT	TCC AGC GAG AAG GGG CAT TTT	134	68–59	30	DS
	1b	GAA AGG AAG CGC TGG GGT TG	GGC CAA GGT CGG AAG CAA CT	211	68–59	30	
	1c	CCT TCT CGC TGG AAC TGG	CCG GTG GCG ATA CTC AC	300	65–53	30	
2	ACT GCC GTG TCC CTG TCT T	TAT CAG GGC AGG ACC AAT GT	248	65–53	30	2.5	
3	AAA CAG GTT GCA GGG TCT GAA G	TCC TTC CTG GTC TGG AAA CCT G	254	65–53	30	2.5	
4	CCC TCT CCT GCA CTC CAC	GAG CTT GTG GCA CAG ACG	120	68–59	30	2.5	
5	AGC CCC ACA CCA TCT CCT T	AGG TTG GGG ACA GGA CGG A	171	68–59	30	3	
6	AGC CCG ACA CTG TGT GTT TT	GCC TGG AAG TTT CCG ACT TA	191	65–53	30	2.5	
7	TGG GTT TGG GTT AGG CAG TTG	AAG GAG CCA GGG AAA ACG CA	223	65–53	30	2.5	
8	GAG CCT CCT GTC CAT TCC TT	GGC TGG ATG CAA CAA TAA CA	183	68–59	30	2.5	
9	GAA CAG GGA GGG GGA GCT GT	TGG TGG CAG GTG GGC TAC TC	231	68–59	45	2.5	
10	TAG GGC CTG GCA GAC GAT GT	CCC AAC TGC CTG AGG GGT TC	222	68–59	30	2.5	
11	TGT CCC CAC ACT TTC TCC TC	TTC ACG CAC ATG TAG GCA CT	166	65–53	30	2.5	
12	TGG CCA CTC ACA ATC TCC T	GCC TTG ACA CCC TCC ACT A	222	68–59	30	2.5	
13	AGG AGA AGT GAT GCG TGT CTT TTT G	AGA GGC AAG AAC TCA GGG TCT CAG C	244	68–59	45	2.5	DS
14	GTG TGA ACT GGT GTC TGT GTC CTT	GTT TCT GTG TCA GTT ACT CTG GGC	107	65–53	30	2.5	
15	CCC AGC ACT TGG CCC TGA TT	ACG CAG ACC ACA GGG AGG TG	178	65–53	30	2.5	
16	CAC CAC TGA CTC TCT CGT CTG C	CCA TCC CCC AGC CCC ATC	297	65–53	30	2.5	DS

DS direct sequencing



for each exon in order to decrease significantly the number of false positive calls.

#### HRM analysis

The HRM curve analysis was performed on the Light Cycler® 480 Gene Scanning Software (Version 1.5). The efficiency and sensibility of the amplification was deduced from the amplification curves. The specificity of amplification was assessed using melting peaks analysis and agarose gel electrophoresis. Gene scanning information was derived from melting curves analysis: the melting curves were normalized, temperature-adjusted and, finally, a difference plot was generated. The four wild-type controls were selected as the baseline for comparison. Samples were considered mutated when significant difference of fluorescence level for all duplicate fell outside of the range of variation detected for the wild-type controls.

#### Sequence analysis

PCR products showing aberrant melting curves were purified by using NucleoSpin Extract II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's recommendations and directly analyzed by capillary electrophoresis on ABI Prism 3500 genetic analyzer (Applied Biosystems) using the BigDye® Terminator. The four negatives controls were also sequenced. All putative KCNQ1-associated mutations and other variants were denoted using known and accepted nomenclature [31]. The reference sequence used is the NM\_000218.2.

## Results

#### Samples studied

DNA was stored at the time of autopsy from 23 unrelated sudden unexplained deaths in the young victims. In 15 cases, laboratory test revealed a diagnosis such that molecular autopsy was not required. These included four cardiac diagnoses such as acute myocarditis (one), acute myocardial infarction (two) or endocardial fibroelastosis (one), and 11 various noncardiac diagnoses including respiratory infections (two), and narcotic or drug intoxication (nine). Eight cases were referred for channelopathies gene screening. Among these eight cases, we distinguish children and young adults aged between 1 and 35 years old and infants aged less than 1 year (Table 1).

#### Optimisation of HRM conditions

Despite the use of different primers pairs (carefully selected with Primer3 software) and different amplification protocol

(modifications of DNA concentration, MgCl<sub>2</sub> concentrations, annealing temperature), PCR optimisation of three exons did not allow to obtain a sufficient amplicon quality for subsequent HRM analysis. Most of them present abnormal PCR characteristics such as presence of nonspecific products or high C<sub>p</sub> value. Consequently, these three exons (1, 13, and 16) were analyzed by direct sequencing (Table 2).

For two successfully optimized exons, we tested the same primers pairs with or without purification with HPLC. No differences were observed in the melting curves (results not shown). Therefore, we decided to use only non-HPLC primers for economic reason.

#### Mutation scanning and sequencing results

For eight exons (3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, and 15), the melting curves analysis showed only one population whatever the type of storage and the type of tissue, indicating that no variant were detected. In such case and in order to monitor false negatives, we used a random control strategy to sequence heart or liver samples for each case. No mutation was detected in random samples (Fig. 1a).

For three exons (2, 6, 12), five cases were identified to be "mutant" in frozen and FFPE tissue-derived DNA. The HRM profiles on exon 12 of frozen tissue samples and their matched FFPE samples is represented in Fig. 1b. The direct sequencing confirmed the HRM results and found three genomic variant, c.858 C>T in exon 6 for the case 5, c.1590+14 T>C in intron 12 for cases 6 and 8, c.477+96 del GG in the intron 2 for cases 1 and 4.

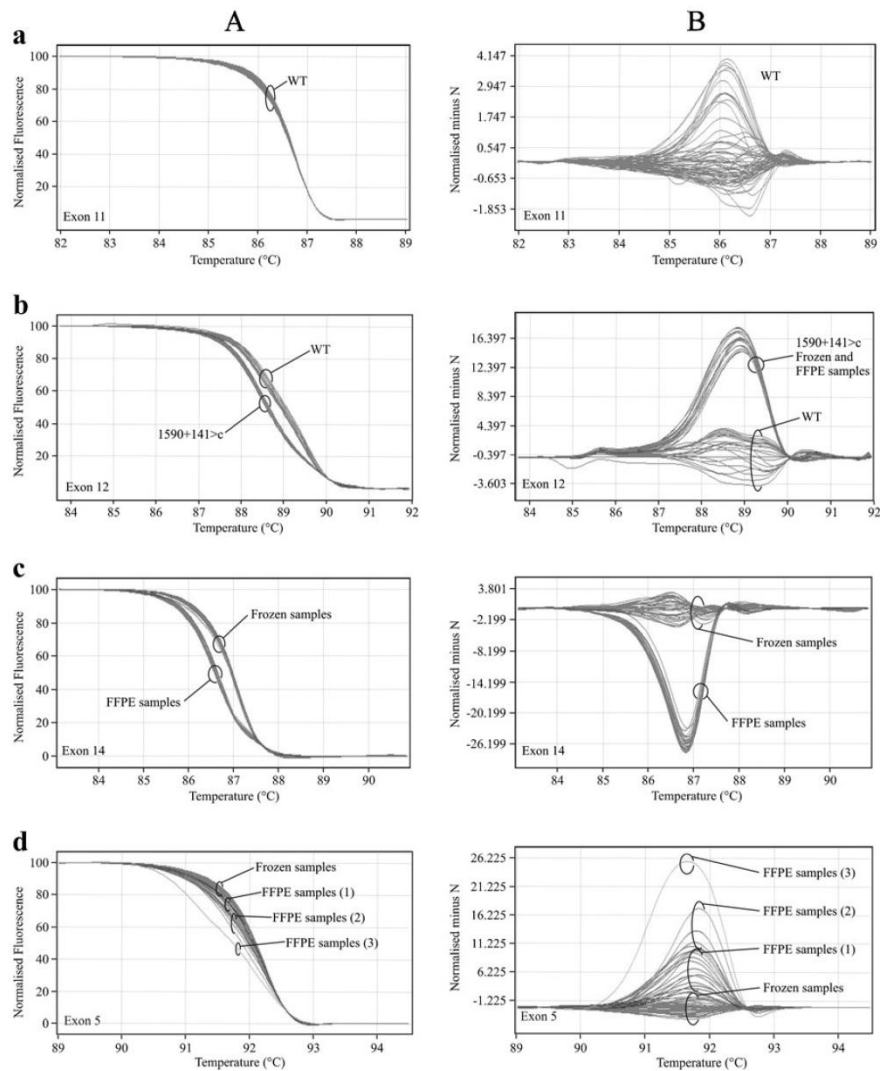
For exon 14, the melting curves showed two distinct population corresponding to frozen and FFPE tissue-derived DNA (Fig. 1c). We used a random control strategy to sequence heart or liver samples for each case. No mutation was detected in random samples.

For exon 5, we observed a discordant results between the paired frozen and FFPE samples. Indeed, no variant were identified in frozen samples while three distinct populations were identified in FFPE tissue-derived DNA (Fig. 1d). All samples identified as "mutant" by HRM were sequenced and no mutation was found. Consequently, these samples were in fact wild-type.

The direct sequencing of the three non-optimized exons (exons 1, 13, and 16) detected a substitution c.1638 G>A in exon 13 for two cases (Table 3).

## Discussion and conclusions

The HRM analysis is an attractive screening method that works with a great precision in detecting single nucleotide substitutions that produce missense, nonsense, and splice site mutations or small insertion/deletions. However large



**Fig. 1** Normalized plot (a) and difference plot (b) of on example of each case observed: a one population whatever the type of storage (frozen or FFPE) and the type of tissue indicating that no variant were detected, b two populations whatever the type of storage and the type

of tissue corresponding to the wild-type and two variants, c two distinct populations corresponding to the frozen samples and the FFPE samples, and d no variant observed in frozen samples and different populations observed in FFPE samples

whole gene, multiple exon, or single exon deletions or duplications elude detection by this approach. According to the publicly available website (<http://www.fsm.it/cardmoc>) maintained by priori (last update in December 2010) among over 300 mutations listed on KCNQ1, the majority (80 %) are single nucleotide substitutions and the remaining 20 % are

small in frame insertion or deletions. Consequently, the HRM could theoretically detect the majority of the KCNQ1 mutations actually described, excepted the rare copy number variations that explain around 3 % of LQTS in patients with no point mutation in the KCNQ1 and KCNH2 genes [32, 33].

**Table 3** Details of KCNQ1 variations identified by HRM and confirmed with sequencing for eight cases of the cohort studied

Nucleotide change (NM_000218.2)	Amino acid change (NP_000209.2)	Region	Case number	Previous report (if any)
c.477+96 del GG	Intronic variant	Intron 2	1, 4	
c.858 C>T	p.D286D	Exon 6	5	
c.1590+14 T>C	Intronic variant	Intron 12	6, 8	[34, 35]
c.1638 G>A	p.S546S	Exon 13	1, 5	[34–38]

Nucleotide numbering starts from the ATG start codon

In the present study, whatever the type of storage condition (frozen or FFPE), not all the KCNQ1 exons can be studied by the HRM which was successfully optimized for 13 of the 16 KCNQ1 exons. Despite the use of different primer pairs and different amplification protocols, we did not obtain a sufficient amplicon quality for three exons: the exons 1, 13, and 16. Millat et al. meet similar difficulty in their study performed on DNA extracted from whole blood in a panel of patients with a suspicion of LQTS. Indeed, despite the use of different kits (LightCycler® 480 High Resolution Melting Master kit and SYTO-9 dye combined with other DNA polymerases), the HRM was not optimized for two of the 16 KCNQ1 exons (exons 1 and 16) and for 12 of the 15 KCNH2 exons [18]. One of the hypotheses that might explain the difference of results concerning the exon 13 between our study and the Millat’s publication is the use of a different instrument (Light Cycler®480 Real-Time PCR Systems from Roche Diagnostics versus Rotor-Gene 6000 analyser from QIAGEN) with a different software and a different PCR kit (LightCycler® 480 High Resolution Melting Master kit versus LightCycler® 480 Probes Master kit and SYTO-9 dye).

Consequently, the HRM analyses could not be performed, in our study, on these three exons which had to be explored with direct sequencing to get the whole genetic information of the KCNQ1 gene. Despite the different time of formalin fixation of the samples varying from 4 to 17 days, the melting curve behavior was identical whatever the type of storage condition for 11 of the 13 exons which were screened by HRM analysis. In our cohort of eight

cases, among the sequence variants detected by HRM and confirmed by sequencing, we distinguished: one deletion of two nucleotides in the intron 2 (c.2477+96 del GG) not previously described, a single nucleotide substitution on exon 6 (c.858 C>T) not previously described which was synonymous (p.D286D) and a single nucleotide substitution in intron 12 (c.1590+14 T>C) which was previously described [34, 35]. The direct sequencing of exon 13 revealed a single nucleotide substitution (c.1638 G>A) that were previously described as synonymous polymorphism [35–38]. Consequently, no mutation with amino acid change and therefore with functional effect on ion channel was detected in our cohort. No conclusion concerning the cause of death in our prospective-based series of postmortem negative sudden death could be emitted and complementary investigations on other genes involved in channelopathies must be obviously performed.

If we compare the low yield of genetic testing in our cohort with the data of the 10 years of published studies of molecular autopsies of sudden death in the young, we observed a KCNQ1 mutation detection rate extremely variable according to the publications. For example, the KCNQ1 mutation detection rate was 0 % in a cohort of 12 cases [22] and 59 cases [3], 2.5–3 % in a cohort of 33 cases [19] and 35 cases [8], 7 % in two cohorts of 14 cases [7, 39], 10 % in a cohort of 49 cases [40], and 20 % in a cohort of 10 cases [41]. Consequently, considering the small size of our study population and the variability of the KCNQ1 mutation detection rate, the low yield of genetic testing observed in our study does not contradict the data of the literature.

**Table 4** Cost analysis of direct sequencing (DS) versus HRM/targeting direct sequencing (TDS) of all exons in the KCNQ1 gene for eight samples according to the type of samples (frozen or FFPE)

Parameter	DS of 16 exons		HRM/TDS of 13 exons couples with DS of 3 exons							
	FFPE or frozen	FFPE	HRM	TDS	DS of 3 exons	Subtotal	HRM	TDS	DS of 3 exons	Subtotal
Type of samples						Frozen				
Featuring disposable cost	600 €	110 €	80 €	110 €	300 €	110 €	25 €	110 €	245 €	
Chemical costs	2,100 €	830 €	270 €	400 €	1,500 €	830 €	80 €	400 €	1,310 €	
Total working costs in Euros (if unitary working costs is set to 23 € h <sup>-1</sup> )	506 €	161 €	115 €	115 €	391 €	161 €	23 €	115 €	299 €	
Hands on time and time of results interpretation	22 h	7 h	5 h	5 h	17 h	7 h	1 h	5 h	13 h	
Total cost analysis	3,206 €				2,191 €				1,854 €	

However, this result highlights the fact that the low number of cases included in our prospective series of postmortem negative sudden death constitutes the principal limitation of the present study. It can be explained by the very strict inclusion criteria used and the low number of autopsy performed each year at the Institute of Legal Medicine of Strasbourg, France (200 autopsy annually). To increase the number of cases, a national or multinational multicenter study might be a potential solution with the risk of losing sample quality monitoring. Indeed, in the present study, we had the possibility to control rigorously each processing step from tissue sample to the genetic analyses allowing a very good monitoring of the samples.

If the melting curve behavior in HRM analyses were equivalent whatever the type of storage for the majority of the exons, for two exons (numbers 5 and 14) however, the results observed between the paired frozen and FFPE samples were discordant (Figs. 1c–d): all cases were grouped as wild-type in frozen samples and as variant in FFPE samples with no sequence variation detected by sequencing of all FFPE samples. The detection of false positives by HRM could be explained by the PCR artifacts induced either from Taq polymerase error or from errors attributed to chemical reactions of formalin on DNA. The cumulative effects of these two phenomena influence the melting profile of the amplicon depending on the degree of DNA damages [42–44]. The same phenomenon of false positive was previously described in a study performed on FFPE samples for other genes [25, 28]. For example, Do et al. reported a level of 12.5 % of false positive with 200 FFPE samples tested for the detection of somatic EGFR and KRAS mutations [25]. The level of false positive could not be calculated in our study owing to the low number of cases included in the cohort.

Given the existence of false positive and the necessity to sequence directly the three exons with non-optimal amplification conditions, we can wonder why it would not be more efficient and more economical to sequence directly the 16 exons of KCNQ1? To respond to this question, we compared, for the eight cases of our cohort, the cost of the HRM coupled with targeted direct sequencing (HRM/TDS) and the direct sequencing (DS) of the 16 exons of KCNQ1, without considering the cost of the equipments. We evaluated the relative featuring disposable cost, chemical cost, hands-on time, and time of results interpretation by the two techniques (HRM/TDS versus DS) with the two types of samples by taking into account the necessity to sequence the false positives observed with FFPE samples. The results, presented in Table 4, showed that the cost of direct sequencing of the 16 exons, whatever the type of samples, is 3,206 Euros, the cost of the HRM analysis (realized with samples in duplicate) coupled with targeted sequencing on variant detected, with direct sequencing of three exons (1,

13, and 16) and with the sequencing of false positives only with FFPE samples is 2,191 Euros for FFPE samples and 1,854 Euros for frozen samples. Therefore, with frozen samples, the cost reduction of HRM/TDS versus DS is more than 40 %. Moreover, even with false positive results, the mutation screening with HRM/TDS on FFPE samples allowed a cost reduction of more than 30 % compared with direct sequencing of all exons in the gene of interest. The principal reason of such results is the reduction of sequencing reactions. Indeed, in our study, the screening of mutations with HRM allowed to eliminate up to 70 % of the sequencing reactions for FFPE samples. The same results were described in previous study of Do et al. in which it was estimated that up to 80 % of sequencing reactions can be eliminated for the KRAS and EGFR genes if samples are screened by HRM [25].

In conclusion, the realization of postmortem genetic diagnosis of mutations in cardiac ion channel genes in France is limited by the quality of the samples more frequently collected by the forensic pathologists, namely FFPE samples. When only FFPE samples are available, our initial evaluation provided evidence that the HRM method coupled with targeted sequencing is applicable on FFPE samples. Even with false positives, we have estimated that the HRM allowed a reduction of sequencing reactions number by up to 70 % and thus result in substantial time and cost savings allowing a routine use. The validation of HRM method as a screening method of mutations on KCNQ1 gene on FFPE samples requires at least his verification in a large number of samples. Moreover, although KCNQ1 represents a large percentage of the long QT syndrome it must be develop further investigation on other genes implicated in sudden cardiac death.

While it is true that the starting material in retrospective genetic studies is DNA extracted from FFPE samples, it should be a priority to establish a protocol for frozen samples collection in autopsy for potential prospective studies in France.

**Acknowledgments** We gratefully thank the Genetic Diagnostic Laboratory of the University Hospital of Strasbourg, directed by Professor Mandel, for the free access to the HRM platform. We also thank Aurélie Marchet and Daniel Montagnon for their technical help.

## References

1. Basso C, Burke M, Fomes P, Gallagher PJ, de Gouveia RH, Sheppard M, Thiene G, van der Wal A (2008) Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death. *Virchows Arch* 452(1):11–18
2. Doolan A, Langlois N, Chiu C, Ingles J, Lind JM, Semsarian C (2008) Postmortem molecular analysis of KCNQ1 and SCN5A genes in sudden unexplained death in young Australians. *Int J Cardiol* 127(1):138–141

3. Doolan A, Langlois N, Semsarian C (2004) Causes of sudden cardiac death in young Australians. *Med J Aust* 180(3):110–112
4. Maron BJ, Shirani J, Poliac LC, Mathenge R, Roberts WC, Mueller FO (1996) Sudden death in young competitive athletes. Clinical, demographic, and pathological profiles. *Jama* 276(3):199–204
5. Tester DJ, Ackerman MJ (2006) The role of molecular autopsy in unexplained sudden cardiac death. *Curr Opin Cardiol* 21(3):166–172
6. Rodriguez-Calvo MS, Brion M, Allegue C, Concheiro L, Carracedo A (2008) Molecular genetics of sudden cardiac death. *Forensic Sci Int* 182(1–3):1–12
7. Allegue C, Gil R, Blanco-Verea A, Santori M, Rodriguez-Calvo M, Concheiro L, Carracedo A, Brion M (2011) Prevalence of HCM and long QT syndrome mutations in young sudden cardiac death-related cases. *Int J Legal Med* 125(4):565–572
8. Edelmann J, Schumann S, Nastainczyk M, Husser-Bollmann D, Lessig R (2011) Long QT syndrome mutation detection by SNaP-shot technique. *Int J Legal Med*
9. Brion M, Quintela I, Sobrino B, Torres M, Allegue C, Carracedo A (2010) New technologies in the genetic approach to sudden cardiac death in the young. *Forensic Sci Int* 203(1–3):15–24
10. Reed GH, Kent JO, Wittwer CT (2007) High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics* 8(6):597–608
11. Erali M, Wittwer CT (2010) High resolution melting analysis for gene scanning. *Methods* 50(4):250–261
12. Millat G, Chanavat V, Rodriguez-Lafresse C, Rousson R (2009) Rapid, sensitive and inexpensive detection of SCN5A genetic variations by high resolution melting analysis. *Clin Biochem* 42(6):491–499
13. Montgomery JL, Sanford LN, Wittwer CT (2010) High-resolution DNA melting analysis in clinical research and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 10(2):219–240
14. Hedley PL, Jorgensen P, Schlamowitz S, Wangari R, Moolman-Smook J, Brink PA, Kanters JK, Corfield VA, Christiansen M (2009) The genetic basis of long QT and short QT syndromes: a mutation update. *Hum Mutat* 30(11):1486–1511
15. Hedley PL, Jorgensen P, Schlamowitz S, Moolman-Smook J, Kanters JK, Corfield VA, Christiansen M (2009) The genetic basis of Brugada syndrome: a mutation update. *Hum Mutat* 30(9):1256–1266
16. Lahat H, Pras E, Olender T, Avidan N, Ben-Asher E, Man O, Levy-Nissenbaum E, Khoury A, Lorber A, Goldman B, Lancet D, Eldar M (2001) A missense mutation in a highly conserved region of CASQ2 is associated with autosomal recessive catecholamine-induced polymorphic ventricular tachycardia in Bedouin families from Israel. *Am J Hum Genet* 69(6):1378–1384
17. Priori SG, Napolitano C, Tiso N, Memmi M, Vignati G, Bloise R, Sorrentino V, Danieli GA (2001) Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* 103(2):196–200
18. Millat G, Chanavat V, Crehalet H, Rousson R (2011) Development of a high resolution melting method for the detection of genetic variations in Long QT syndrome. *Clin Chim Acta* 412(1–2):203–207
19. Skinner JR, Crawford J, Smith W, Aitken A, Heaven D, Evans CA, Hayes I, Neas KR, Stables S, Koelmeyer T, Denmark L, Vuletic J, Maxwell F, White K, Yang T, Roden DM, Lerer TP, Shelling A, Love DR (2011) Prospective, population-based long QT molecular autopsy study of post-mortem negative sudden death in 1–40 year olds. *Hear Rhythm* 8(3):412–419
20. Kiehne N, Kaufenstein S (2007) Mutations in the SCN5A gene: evidence for a link between long QT syndrome and sudden death? *Forensic Sci Int Genet* 1(2):170–174
21. Ackerman MJ, Tester DJ, Driscoll DJ (2001) Molecular autopsy of sudden unexplained death in the young. *Am J Forensic Med Pathol* 22(2):105–111
22. Chugh SS, Senashova O, Watts A, Tran PT, Zhou Z, Gong Q, Titus JL, Haylick SJ (2004) Postmortem molecular screening in unexplained sudden death. *J Am Coll Cardiol* 43(9):1625–1629
23. Ackerman MJ, Siu BL, Sturmer WQ, Tester DJ, Valdivia CR, Makielski JC, Towbin JA (2001) Postmortem molecular analysis of SCN5A defects in sudden infant death syndrome. *Jama* 286(18):2264–2269
24. Michaud K, Mangin P, Elger BS (2011) Genetic analysis of sudden cardiac death victims: a survey of current forensic autopsy practices. *Int J Legal Med* 125(3):359–366
25. Do H, Krypuy M, Mitchell PL, Fox SB, Dobrovic A (2008) High resolution melting analysis for rapid and sensitive EGFR and KRAS mutation detection in formalin fixed paraffin embedded biopsies. *BMC Cancer* 8:142
26. Do H, Solomon B, Mitchell PL, Fox SB, Dobrovic A (2008) Detection of the transforming AKT1 mutation E17K in non-small cell lung cancer by high resolution melting. *BMC Res Notes* 1:14
27. Heideman DA, Thunnissen FB, Doeleman M, Kramer D, Verheul HM, Smit EF, Postmus PE, Meijer CJ, Meijer GA, Snijders PJ (2009) A panel of high resolution melting (HRM) technology-based assays with direct sequencing possibility for effective mutation screening of EGFR and K-ras genes. *Cell Oncol* 31(5):329–333
28. Ma ES, Wong CL, Law FB, Chan WK, Siu D (2009) Detection of KRAS mutations in colorectal cancer by high-resolution melting analysis. *J Clin Pathol* 62(10):886–891
29. Pichler M, Balic M, Stadelmeyer E, Ausch C, Wild M, Guelly C, Bauernhofer T, Samonigg H, Hoefler G, Dandachi N (2009) Evaluation of high-resolution melting analysis as a diagnostic tool to detect the BRAF V600E mutation in colorectal tumors. *J Mol Diagn* 11(2):140–147
30. Farrugia A, Keyser C, Ludes B (2010) Efficiency evaluation of a DNA extraction and purification protocol on archival formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. *Forensic Sci Int* 194(1–3):e25–e28
31. Antonarakis SE (1998) Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. *Hum Mutat* 11(1):1–3
32. Barc J, Bricc F, Schmitt S, Kyndt F, Le Cunff M, Baron E, Vieyres C, Sacher F, Redon R, Le Caignec C, Le Marec H, Probst V, Schott JJ (2011) Screening for copy number variation in genes associated with the long QT syndrome: clinical relevance. *J Am Coll Cardiol* 57(1):40–47
33. Tester DJ, Ackerman MJ (2008) Novel gene and mutation discovery in congenital long QT syndrome: let's keep looking where the street lamp standeth. *Hear Rhythm* 5(9):1282–1284
34. Gouas L, Nicaud V, Berthet M, Forhan A, Tiret L, Balkau B, Guicheney P (2005) Association of KCNQ1, KCNE1, KCNH2 and SCN5A polymorphisms with QTc interval length in a healthy population. *Eur J Hum Genet* 13(11):1213–1222
35. Jongbloed R, Marcelis C, Velter C, Doevendans P, Geraedts J, Smeets H (2002) DHPLC analysis of potassium ion channel genes in congenital long QT syndrome. *Hum Mutat* 20(5):382–391
36. Aydin A, Bahrng S, Dahm S, Guenther UP, Uhlmann R, Busjahn A, Luft FC (2005) Single nucleotide polymorphism map of five long-QT genes. *J Mol Med (Berl)* 83(2):159–165
37. Iwasa HIT, Nagai R, Nakamura Y, Tanaka T (2000) Twenty single nucleotide polymorphisms (SNPs) and their allelic frequencies in four genes that are responsible for familial long QT syndrome in the Japanese population. *J Hum Genet* 45(3):182–183
38. Lee MPH, Johnson LA, Feinberg AP (1997) Human KVLQT1 gene shows tissue-specific imprinting and encompasses Beckwith-Wiedemann syndrome chromosomal rearrangements. *Nat Genet* 15(2):181–185

39. Creighton W, Virmani R, Kutys R, Burke A (2006) Identification of novel missense mutations of cardiac ryanodine receptor gene in exercise-induced sudden death at autopsy. *J Mol Diagn* 8(1):62–67
40. Tester DJ, Ackerman MJ (2007) Postmortem long QT syndrome genetic testing for sudden unexplained death in the young. *J Am Coll Cardiol* 49(2):240–246
41. Di Paolo M, Luchini D, Bloise R, Priori SG (2004) Postmortem molecular analysis in victims of sudden unexplained death. *Am J Forensic Med Pathol* 25(2):182–184
42. Quach N, Goodman MF, Shibata D (2004) In vitro mutation artifacts after formalin fixation and error prone translesion synthesis during PCR. *BMC Clin Pathol* 4(1):1
43. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S (2002) Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 161(6):1961–1971
44. Williams C, Ponten F, Moberg C, Soderkvist P, Uhlen M, Ponten J, Sitbon G, Lundeberg J (1999) A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol* 155(5):1467–1471



**Multiplexed genotyping of the RyR2 gene by mass spectrometry in a cohort of autopsy-negative sudden unexplained death**

A. Farrugia , S. Kaufenstein , A. Gonzalez , C. Keyser , B. Ludes

*Article soumis à Forensic Science Medicine and Pathology*





**Multiplexed genotyping of the RyR2 gene by mass spectrometry in a cohort of autopsy-negative sudden unexplained death**

**A. Farrugia<sup>a\*</sup>, S. Kaufenstein<sup>b</sup>, A. Gonzalez<sup>a</sup>, C. Keyser<sup>a</sup>, B. Ludes<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Institute of Legal Medicine, University of Strasbourg, EA4438, Strasbourg, France

<sup>b</sup> Institute of Legal Medicine, University of Frankfurt, Frankfurt, Germany

\*Corresponding author. Institute of Legal Medicine, 11 rue human 67085, Strasbourg, France. Tel.: +33 368853363; fax: +33 368853362; *E-mail address*: [audrey.farrugia@unistra.fr](mailto:audrey.farrugia@unistra.fr) (A.Farrugia)

**Abstract:**

Genetic screening of the *RyR2* gene in sudden unexplained death (SUD) cases usually uses targeted screening strategy based on direct sequencing of the "hot spots regions" considering the large size of the *RyR2*. The first goal of the present study was to investigate the potential use of the single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping technique based on a matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), called iPLEX Gold (Sequenom), for the detection of SNPs in the *RyR2* gene in a cohort of twelve SUD cases. The second objective was to compare the genotyping data obtained from corresponding frozen and formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cardiac samples in order to prove the reliability of this approach tested on DNA extracted from FFPE samples. In this context, we developed six multiplex assays which allowed the detection of 105 SNPs located on the *RyR2* gene, and generated a high call rate and a high degree of reproducibility for frozen samples. For the FFPE samples, the replicate experiment increased the number of genotypes assigned of about 3% to reach a final satisfactory genotyping call rate of 94.3% versus 97.1% with frozen tissues. Four non-synonymous genetic variants, described in the literature as common polymorphisms, were detected (p.Q2958R, p.G1886E, p.G1885S, p.V507I). In conclusion the iPLEX Gold technology can be used for accurate SNPs genotyping of the *RyR2* gene using FFPE samples when those are the only available source of DNA.

**Keywords:** MALDI-TOF MS; MassARRAY system; sudden cardiac death; RyR2; Formalin-fixed and paraffin-embedded Tissue; SNP genotyping.

## 1. Introduction

In the developed countries, the incidence of sudden cardiac death (SCD) in young people (<35 years) is approximately 3 per 100 000 persons per year [1]. Despite a detailed forensic autopsy, histopathological and toxicological analyses, 10% to 30% of these deaths cases remain unexplained [2, 3] and are labeled as autopsy-negative sudden unexplained death (SUD) [4]. Molecular autopsy has revealed that potentially lethal channelopathies such as catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT) may account for a certain number of these SUDs [3, 5-8].

CPVT is characterized by adrenergically induced bidirectional or polymorphic ventricular tachycardia causing syncope, cardiac arrest or even sudden death [9]. The prevalence of CPVT in the population has been estimated to be approximately 1:10,000 [10]. It occurs predominantly in children and young adults in the absence of a structural heart disease [11] and it has been identified in cases of sudden infant death syndrome (SIDS) [12]. Physical exertion and emotional stress are a well established arrhythmogenic triggers in people with CPVT [11]. Some rare cases of SCD occurring during sleep have also been reported [13, 14].

CPVT is predominantly caused by autosomal dominant mutations, affecting the cardiac ryanodine receptor type 2 (RyR2), which is the major calcium release channel in the sarcoplasmic reticulum of cardiomyocytes [15]. This receptor is encoded by the *RyR2* gene, located on chromosome 1q42. With 105 exons, encoding 4967 amino acid residues, *RyR2* is one of the largest cardiac genes [16]. Although few recessive mutations in *CASQ2* gene encoding the calcium binding protein calsequestrin 2 in the sarcoplasmic reticulum, have been identified to cause CPVT [11, 17].

Among the molecular autopsy series involving the major Long QT syndrome (LQTS) and CPVT genes reported to date [6-8, 18-30], the postmortem genetic diagnosis of mutations in *RyR2* gene was performed on DNA extracted from either autopsy blood samples or frozen tissue [8, 12, 20, 21, 25, 29]. All these studies employed the same targeted screening strategy considering the large size of the *RyR2* gene and assuming that the vast majority of the mutations clustered in the *RyR2* gene are distributed in three "hot spots regions" [31, 32] (Table 1).

Since whole *RyR2* gene sequencing constitutes an expensive and time consuming method using classical technologies, the targeted detection of single nucleotide polymorphisms (SNPs) by Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) on a Sequenom MassARRAY platform represents a promising analytical tool. This SNP genotyping strategy using IPLEX Gold technology is based on allelic discrimination by a single base extension (SBE) reaction and the SBE products are detected by MALDI-TOF MS as illustrated in Figure 1. This method is described as an accurate cost effective, fast and sensitive protocol ideally suited for the analysis of degraded DNA [33]. These advantages are also important for analyzing DNA extracted from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) specimens which are often the only source of DNA for genetic testing for SUD in France. Since this SNP genotyping technology has already been used on some genes involved in the cardiac channelopathies LQTS, namely *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A* [28, 34], no previous study has evaluated the use of the mass spectrometry MALDI-TOF to detect RyR2 SNPs potentially implicated in CPVT.

The aims of the present study are (i) to investigate the potential use of the Sequenom MassARRAY MALDI-TOF MS platform using IPLEX Gold Technology for the detection of SNP in *RyR2* gene in a cohort of SUD cases, and (ii) to compare the genotyping data obtained from corresponding frozen and FFPE cardiac samples in order to prove the reliability of this approach tested on DNA extracted from FFPE samples.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Studied subjects

We examined twelve cases autopsied in our Institute over four years (2008-2011): 6 males and 6 females, with an age range from 8 days to 20 years. In all cases, the cause of death could not be determined after a rigorously autopsy including a heart examination according to the guidelines of Association for European Cardiovascular Pathology [35] and after histopathological and toxicological analyses. For each case, cardiac tissue was freshly frozen and using FFPE conditions in parallel. Circumstances of deaths were provided from police records (Table

2). Forensic investigations including genetic testing to determine the cause of death were carried out with the judicial mandate.

As a control, we used four healthy blood donors (negatives controls) and one patient (positive control) with an unequivocal LQTS phenotype and the missense mutation V4299M (NC\_000001.9) in the *RyR2* gene [36].

#### 2.2 DNA extraction and quantification

The DNA extraction was adapted to the type of tissue. For the FFPE tissue phenol-chloroform and QIAamp DNA mini® Kit (Qiagen) was used as previously described [37]. The frozen samples were extracted and purified by applying the QIAamp DNA Mini® Kit according to the manufacturer's instructions. Quantification of the DNA samples was performed using the NanoDrop™ 8000 Spectrophotometer (Thermo Scientific®).

#### 2.3 Single-nucleotide polymorphism selection

The assays were designed to target a panel of 139 SNPs previously described in the literature and summarized in the publication of Medeiros et al. [32]. For 35 SNPs distributed on exons 14, 47, 90<sub>a</sub>, 90<sub>b</sub>, the design of the SBE primers was not possible, because the SNPs were too close together on the DNA sequence. Moreover, one novel SNP described by Kaufenstein et al. [36] was also included. Finally, a total of 105 SNPs were analyzed with the MassARRAY system (an overview of the 105 SNPs is summarized in Online Resource 1). The reference sequence used to name the mutations is the NM\_001035.2.

The genetic variants described as polymorphisms in the literature were also included because of their possible modifier effect [38, 39].

#### 2.4 Assay design

PCR and SBE primers for each SNP investigated were designed using the MassARRAY design software, version 4.0 (Sequenom Inc., San Diego, CA). To avoid confusion in the mass spectrum with the SBE products, a 10-mer tag (5'-ACGTTGGATG-3') was added to the 5' end of each PCR primer. The SBE primers were 5' tailed with varying lengths of nonhomologous tails to create a difference large enough to analyze the spectrometer results. PCR and SBE primers as well as the distribution of SNP in multiplex reactions are given in Online Resource 2.

#### 2.5 Mutation detection

The genotyping analysis was performed following manufacturer's recommendations [40] with reagents included in the iPLEX Gold SNP genotyping kit (Sequenom) and the software and equipment provided with the MassARRAY platform (Sequenom).

PCR amplifications were carried out in a final volume of 5µL composed of 1xPCR buffer, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 500µM dNTPs, 0.1 µM each PCR primer, 0.5U of HotStartTaq enzyme and 10 ng extracted DNA. The PCR protocol consists of a first denaturation step at 95°C for 2min, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 30s, annealing at 56°C for 30s and extension at 72°C for 1min, with a final extension step at 72°C for 5min.

To neutralize unincorporated dNTPs, PCR products were treated with 0.5U shrimp alkaline phosphatase (SAP) enzyme by incubation at 37°C for 40min, followed by enzyme inactivation by heating at 85°C for 5min.

Following SAP treatment, iPLEX Gold reaction was performed. The final iPLEX cocktail mix volume was 9µL including 10x iPLEX buffer, 1 x iPLEX termination mix, 1 x iPLEX enzyme and the SBE primer mix divided into 4 groups from low to high masses (7µM, 9.3 µM, 11.6µM, 14µM). The iPLEX extension reaction was performed as follow: initial denaturation step at 94°C for 30s, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 5s, 5 cycles of annealing at 52°C for 5s and extension at 80°C for 5s, with a final extension step at 72°C for 3min.

After a cleanup step with the SpectroCLEAN resin to remove salts, extended products were spotted onto a 96 SpectroCHIP array using an RS1000 Nanodispenser. Finally, the products were detected with the MassARRAY Compact 96 mass spectrometer. Data analysis was carried out using the MassARRAY Typer software, version 4.0.20 (Sequenom Inc., San Diego, CA). Samples were automatically called by the Sequenom software. Each assay call was dependent on the degree of confidence of the data resulting in conservative (i.e. high degree of confidence or quality), moderate (i.e. intermediate degree of confidence or quality), and aggressive (i.e. lowest acceptable degree of confidence or with low quality) calls. The item "no calls" designed the situation where no peak appeared on the mass spectra and when the quality was insufficient to make a call with any confidence (low probability). The item "user call" designed the manual genotyping calls.

To test the reproducibility of the iPLEX method we analyzed two different extracts (obtained from FFPE and frozen tissue) for each case. Moreover, two replicate experiments were performed for each type of sample. One positive control and negatives controls (DNA extracted from frozen blood) were added during the genotyping process in order to detect problems (e.g. false positive, false negative).

### 2.6 DNA Sequencing

All the genetic variants detected with the MassARRAY system and markers that failed to be detected with this technique were sequenced. Moreover, all samples were sequenced for the *RyR2* exons 14, 47, 90<sub>a</sub>, 90<sub>b</sub>, corresponding to the exons for which the SNPs could not be included in the assay design. The PCR primers were designed using the program primer 3 and are shown in Online Resource 3. Direct sequencing was performed using a BigDye® Terminator (version 3.1) cycle sequencing kit (AB) according to the manufacturer's recommendations. Capillary electrophoresis was performed on ABI Prism 3500 genetic analyzer (Applied Biosystems) and the resulting sequences were assembled and edited using the software Sequencer, version 4.7.

## 3. Results

At least 105 SNPs of interest were successfully analyzed with the MassARRAY system in 48 amplicons distributed in six different-sized multiplex assays: 29-plex (A1), 25-plex (A2), 21-plex (A3), 13-plex (A4), 9-plex (A5), 8-plex (A6). The six multiplex assays were applied to all twelve SUD cases using two different extracts, frozen and FFPE, in two replicate experiments.

For the two SNP genotyping replicate assays performed on DNA extracted from frozen cardiac tissue, 1224 genotypes were assigned from the 1260 genotypes expected, resulting in a call rate of 97.1% for each assay. The detection rate of the two replicate experiments revealed 100% concordant results indicating good reproducibility of the method.

In the SNP genotyping assays performed on DNA extracted from FFPE tissue, a reduced call rate of 91.9% (1158/1260) and 91.5% (1153/1260) was obtained in the two replicate experiments. These experiments performed on FFPE samples had a discordance of 6.2% corresponding to 61 genotypes not assigned in one of the two experiments and to 17 genotypes with different nucleotide changes detected in the two experiments. The combination of the results enabled a finally assignment of 1188 genotypes from the 1260 genotypes expected, resulting in a genotyping call rate of 94.3%.

Comparison of the genotyping quality (degree of confidence defined by the Software) when using DNA derived from FFPE and frozen samples indicated that the amount of genotypes with reduced quality label including "aggressive", "no calls" and "user calls" was higher in DNA samples extracted from FFPE tissue (400/2520, 15.8%) in contrast to DNA extracted from frozen tissue (217/2520, 8.6%) (Figure2). Moreover, among the expected genotypes from the FFPE samples, 24 positions with nucleotide changes were found that were not detected by Sequenom MassARRAY system in the corresponding frozen samples. By direct sequencing of these samples, the nucleotide changes could not be confirmed suggesting artefacts. The most frequent artefacts observed were C>T or G>A transitions. An example of an artefact sequence detected on Mass ARRAY spectrum in the case 1 is shown in the Figure 3.

The DNA regions around the loci 14, 47, 90<sub>a</sub>, 90<sub>b</sub> were analyzed by capillary electrophoresis sequencing instead of MALDI-TOF MS assay. The sequencing results revealed no genetic variants.

Four different genetic variants present in the heterozygote form were detected among the twelve cases (Table 3). All these variants leading to non synonymous amino acid changes, had been previously described as common polymorphisms in the literature [16, 23, 32, 39, 42, 43]. The most frequent genetic variant was the p.Q2958R (c.8876 A>G) polymorphism found in eight of the cases (cases 1, 2, 4-9). The p.G1886S (c.5656 G>A), p.G1886E (c.5654 G>A) and the p.V507I (c.1519 G>A) polymorphisms were present in three independent cases (cases 1, 9 and 10), respectively.

Except the positive control mutation V4299M, no genetic variant involved in CPTV was detected in present cohort.

#### 4. Discussion and conclusion

In genetic screening of the *RyR2* gene in SUD cases usually the same targeted screening strategy based on direct sequencing of a variable number of exons (from 18 to 64 exons) located in the "hot spots regions" are applied, (Table 1) [6-8, 18-30]. The complete gene sequencing is extremely laborious with the classic Sanger technique because of the large size of the *RyR2* gene

The present study examines the potential application of the SNP genotyping technology, called iPLEX Gold (Sequenom), on the commercially available Sequenom MassARRAY MALDI-TOF MS platform for the detection of *RyR2* SNPs in a cohort of twelve SUD cases. If this SNP genotyping method was described in previous study on genes implicated in Long QT syndrome [28, 34], this strategy was not previously employed for the detection of SNPs on *RyR2* gene. Moreover the originality of this work is to compare for the first time the results between fresh frozen samples and FFPE samples simultaneously obtained from the same SUD case to evaluate the reliability of this approach on FFPE samples.

All SNPs of interest have been previously described in the literature and summarized by Medeiros et al. [32]. For 35 SNPs, the design of SBE primers was impossible because of their very close together positions on the sequence that constitutes one of the limitations of this technology. At least, the six multiplex reactions that were developed allowed the detection of 105 SNPs located on *RyR2* gene, including mutations and common polymorphisms, and generated a high call rate and a high degree of reproducibility for frozen samples.

When comparing the genotyping data of DNA extracted from frozen samples to corresponding FFPE samples, a reduction of less than 6 % of the call rate and an increase of low quality genotypes of approximately 7% for FFPE samples was observed. These results confirm those obtained by Horn et al [44], indicating that genotyping with MALDI-TOF MS of 31 SNPs from 64 FFPE tissue-derived DNA compared with results of corresponding blood samples from the same patient revealed a call rate at 93% for FFPE samples versus 99.8% for frozen samples with a slightly increase of low quality genotypes in DNA extracted from FFPE samples.

The difference in the genotyping data observed between the two experiments repeated on FFPE samples (discordance of 6.4%) and between FFPE and frozen samples (discordance of less than 6%) corresponds to false positives results which could be explained by PCR artefacts induced by errors attributed to formalin effects on DNA [45]. The most frequent artefacts observed in our study were C:G>T:A base transitions which correspond to the most predominant type of sequence artefacts in FFPE and in ancient and/or degraded DNA samples, as reported in the literature [46-48].

As this study indicates, a replicate experiment can increase the number of genotypes assigned by MALDI-TOF MS technology of about 3 %. The analyses of the FFPE samples reached a final genotyping call rate of 94.3% versus 97.1% for the frozen tissues. These results are in accordance with previous studies using the same strategy on FFPE samples to analyze different genes associated with SUD and SIDS [28, 34, 49].

Four non-synonymous genetic variants were detected in our cohort including the p.Q2958R (66%), the p.G1886S (8%) and the p.G1885E (8%). These three amino acid exchanges have been described by Medeiros et al. as common polymorphisms detected among 100 Caucasian controls with a detection rate of respectively 34% (p.Q2958R), 9% (p.G1886S) and 6% (p.G1885E) [32]. No case of the present study exhibited both amino acid exchanges p.G1885S and p.G1886S. The combined expression in a heterologous in vitro system is associated with increase in the cellular Ca(2+) oscillation activity when compared with *RyR2* wild type channels [39, 42]. The last non-synonymous variant identified in one SUD case was p.V507I which is not included in the dbSNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>), but which was characterized as a common polymorphism by Medeiros et al. [32].

Comparing the low yield of genetic testing in our cohort with studies of molecular autopsy series of SUD in the last ten years, we observed a highly variable detection rate for mutations in the *RyR2* gene. For example, the *RyR2* genetic variant detection rate was 0% in a cohort of 35 cases (age group, n.a.) [22], 9.5% in a cohort of 74 cases (age group, 0-40 years) [29], 14% in a cohort of 49 cases (age group, 1-43 years) [18] and 21% in a cohort of 14 cases (age group, 1-43 years) [21] (Table 1). One possible explanation of such variability could be the targeted screening strategy resulting in a different number of exons studied and, consequently, in the number of mutations detected.

Therefore, considering the small size of our population studied and the variability of the *RyR2* mutation detection rate, the low yield of genetic testing observed in the present study is not contradicting data of the literature.

The failure to detect SNPs, when their positions in the sequence are too close, limited design of SBE primers. In these cases, analysis of the region of interest is only possible by direct sequencing. However, despite this restriction this study allowed us to emphasize many benefits of the Sequenom MassARRAY genotyping platform. Every procedural step is performed by adding reagents to previously obtained products: thus, yield losses due to purification and transfer steps and the risk of contamination when using degraded DNA are reduced to a minimum. The speed of the analysis system with the possibility to develop assays up to 29 markers per reaction and the easy handling to detect mutations makes this process considerably cheaper and easier than large scale sequence analysis. Furthermore, as new mutations on *RyR2* gene are discovered, the flexibility of the design of multiplex reactions in Sequenom MassARRAY allowed the incorporation of new SNPs without affecting a lot the previous design.

In this study, we preferred to investigate the major CPVT-associated *RyR2* gene, but several other genes are important to be included into postmortem genetic tests in SUD cases, such as the *CASQ2* gene or the recently discovered *TRND* gene responsible for autosomal recessive form of CPVT [50], and should be explored in further studies.

To conclude, this study provided evidence that the iPLEX Gold technology with the Sequenom Mass ARRAY platform can be used for accurate SNPs genotyping of the *RyR2* gene on FFPE samples when they are the only available source of DNA. Even with false positives, the combination of MassARRAY assays performed with replicate experiments and targeted sequencing of regions with artefact sequences, offer a higher throughput, a more flexible and cost effective option than scale large sequencing of the entire *RyR2* gene. Nevertheless, despite the feasibility of using degraded DNA extracted from FFPE samples, it should be a priority in the cases with no autopsy findings to establish a protocol for frozen samples collection in forensic medicine, particularly in France, in order to enable molecular autopsy studies when histopathological and toxicological analyses are negative.

#### Key points

1. The detection of variants on *RyR2* gene potentially implicated in CPVT is an important area of interest in postmortem genetic investigations of sudden unexplained death.
2. This manuscript examines the application of SNP genotyping with Sequenom's iPLEX Gold and MassARRAY technology on *RyR2* gene and compares for the first time the results between FFPE samples and fresh frozen specimens simultaneously obtained from the same case in a cohort of twelve SUD cases.
3. With a discordance of less than 6% observed between frozen and FFPE samples, this technology coupled with targeted sequencing of regions with artefact sequences can be used for accurate SNPs genotyping of *RyR2* gene on FFPE samples when they are the only source available.
4. Despite the failure to detect SNPs whose positions in the sequence are too close to permit the design of SBE primers, this technology is cheaper and easier than large scale sequence analysis and allowed to incorporate new mutations in subsequent updates of the genotyping strategy.

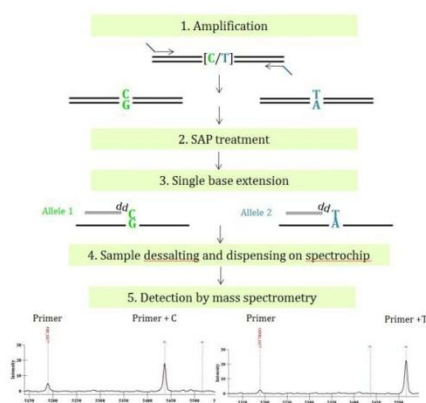
#### References

1. Beckmann BM, Pfeufer A, Kaab S. Inherited cardiac arrhythmias: diagnosis, treatment, and prevention. *Dtsch Arztebl Int.* 2011;108(37):623-33; quiz 34.
2. Doolan A, Langlois N, Semsarian C. Causes of sudden cardiac death in young Australians. *Med J Aust.* 2004;180(3):110-2.
3. Tester DJ, Ackerman MJ. The role of molecular autopsy in unexplained sudden cardiac death. *Curr Opin Cardiol.* 2006;21(3):166-72.
4. Maron BJ, Shirani J, Poliac LC, Mathenge R, Roberts WC, Mueller FO. Sudden death in young competitive athletes. Clinical, demographic, and pathological profiles. *Jama.* 1996;276(3):199-204.
5. Ackerman MJ, Tester DJ, Driscoll DJ. Molecular autopsy of sudden unexplained death in the young. *Am J Forensic Med Pathol.* 2001;22(2):105-11.
6. Chugh SS, Senashova O, Watts A, Tran PT, Zhou Z, Gong Q et al. Postmortem molecular screening in unexplained sudden death. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43(9):1625-9.

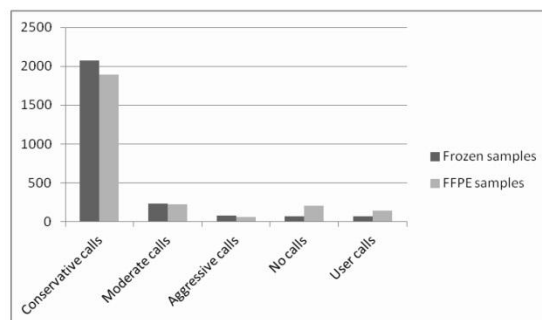
7. Doolan A, Langlois N, Chiu C, Ingles J, Lind JM, Semsarian C. Postmortem molecular analysis of KCNQ1 and SCN5A genes in sudden unexplained death in young Australians. *Int J Cardiol.* 2008;127(1):138-41.
8. Tester DJ, Spoon DB, Valdivia HH, Makielski JC, Ackerman MJ. Targeted mutational analysis of the RyR2-encoded cardiac ryanodine receptor in sudden unexplained death: a molecular autopsy of 49 medical examiner/coroner's cases. *Mayo Clin Proc.* 2004;79(11):1380-4.
9. Leenhardt A, Lucet V, Denjoy I, Grau F, Ngoc DD, Coumel P. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in children. A 7-year follow-up of 21 patients. *Circulation.* 1995;91(5):1512-9.
10. Liu N, Ruan Y, Priori SG. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Prog Cardiovasc Dis.* 2008;51(1):23-30.
11. Priori SG, Napolitano C, Memmi M, Colombi B, Drago F, Gasparini M et al. Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation.* 2002;106(1):69-74.
12. Tester DJ, Dura M, Carturan E, Reiken S, Wronska A, Marks AR et al. A mechanism for sudden infant death syndrome (SIDS): stress-induced leak via ryanodine receptors. *Heart Rhythm.* 2007;4(6):733-9.
13. Allouis M, Probst V, Jaafar P, Schott JJ, Le Marec H. Unusual clinical presentation in a family with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia due to a G14876A ryanodine receptor gene mutation. *Am J Cardiol.* 2005;95(5):700-2.
14. Tester DJ, Kopplin LJ, Will ML, Ackerman MJ. Spectrum and prevalence of cardiac ryanodine receptor (RyR2) mutations in a cohort of unrelated patients referred explicitly for long QT syndrome genetic testing. *Heart Rhythm.* 2005;2(10):1099-105.
15. Marks AR. Ryanodine receptors/calcium release channels in heart failure and sudden cardiac death. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33(4):615-24.
16. Laitinen PJ, Brown KM, Piippo K, Swan H, Devaney JM, Brahmabhatt B et al. Mutations of the cardiac ryanodine receptor (RyR2) gene in familial polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation.* 2001;103(4):485-90.
17. Postma AV, Denjoy I, Hoorntje TM, Lupoglazoff JM, Da Costa A, Sebillon P et al. Absence of calsequestrin 2 causes severe forms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res.* 2002;91(8):e21-6.
18. Tester DJ, Ackerman MJ. Postmortem long QT syndrome genetic testing for sudden unexplained death in the young. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(2):240-6.
19. Di Paolo M, Luchini D, Bloise R, Priori SG. Postmortem molecular analysis in victims of sudden unexplained death. *Am J Forensic Med Pathol.* 2004;25(2):182-4.
20. Nishio H, Iwata M, Suzuki K. Postmortem molecular screening for cardiac ryanodine receptor type 2 mutations in sudden unexplained death: R420W mutated case with characteristics of status thymico-lymphatics. *Circ J.* 2006;70(11):1402-6.
21. Creighton W, Virmani R, Kutys R, Burke A. Identification of novel missense mutations of cardiac ryanodine receptor gene in exercise-induced sudden death at autopsy. *J Mol Diagn.* 2006;8(1):62-7.
22. Carturan E, Tester DJ, Brost BC, Basso C, Thiene G, Ackerman MJ. Postmortem genetic testing for conventional autopsy-negative sudden unexplained death: an evaluation of different DNA extraction protocols and the feasibility of mutational analysis from archival paraffin-embedded heart tissue. *Am J Clin Pathol.* 2008;129(3):391-7.
23. Wong CH, Koo SH, She GQ, Chui P, Lee EJ. Genetic variability of RyR2 and CASQ2 genes in an Asian population. *Forensic Sci Int.* 2009;192(1-3):53-5.
24. Gladding PA, Evans CA, Crawford J, Chung SK, Vaughan A, Webster D et al. Posthumous diagnosis of long QT syndrome from neonatal screening cards. *Heart Rhythm.* 2010;7(4):481-6.
25. Tester DJ, Medeiros-Domingo A, Will ML, Ackerman MJ. Unexplained drownings and the cardiac channelopathies: a molecular autopsy series. *Mayo Clin Proc.* 2011;86(10):941-7.
26. Skinner JR, Crawford J, Smith W, Aitken A, Heaven D, Evans CA et al. Prospective, population-based long QT molecular autopsy study of post-mortem negative sudden death in 1-40 year olds. *Heart Rhythm.* 2011;8(3):412-9.
27. Edelmann J, Schumann S, Nastainczyk M, Husser-Bollmann D, Lessig R. Long QT syndrome mutation detection by SNaPshot technique. *Int J Legal Med.* 2011.
28. Allegue C, Gil R, Blanco-Verea A, Santori M, Rodriguez-Calvo M, Concheiro L et al. Prevalence of HCM and long QT syndrome mutations in young sudden cardiac death-related cases. *Int J Legal Med.* 2011;125(4):565-72.
29. Larsen MK, Berge KE, Leren TP, Nissen PH, Hansen J, Kristensen IB et al. Postmortem genetic testing of the ryanodine receptor 2 (RYR2) gene in a cohort of sudden unexplained death cases. *Int J Legal Med.* 2012. doi:DOI 10.1007/s00414-011-0658-2.
30. Tester DJ, Medeiros-Domingo A, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ. Cardiac channel molecular autopsy: insights from 173 consecutive cases of autopsy-negative sudden unexplained death referred for postmortem genetic testing. *Mayo Clin Proc.* 2012;87(6):524-39.



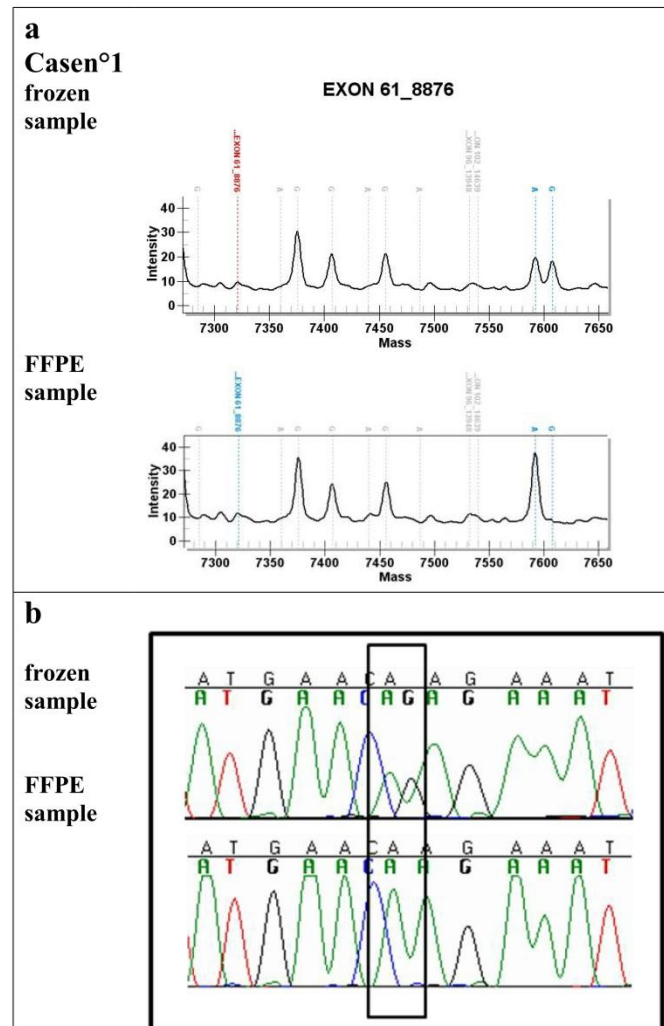
31. Postma AV, Denjoy I, Kamblock J, Alders M, Lupoglazoff JM, Vaksman G et al. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: RYR2 mutations, bradycardia, and follow up of the patients. *J Med Genet.* 2005;42(11):863-70.
32. Medeiros-Domingo A, Bhuiyan ZA, Tester DJ, Hofman N, Bikker H, van Tintelen JP et al. The RYR2-encoded ryanodine receptor/calcium release channel in patients diagnosed previously with either catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia or genotype negative, exercise-induced long QT syndrome: a comprehensive open reading frame mutational analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54(22):2065-74.
33. Mendisco F, Keyser C, Hollard C, Seldes V, Nielsen AE, Crubezy E et al. Application of the iPLEX Gold SNP genotyping method for the analysis of Amerindian ancient DNA samples: benefits for ancient population studies. *Electrophoresis.* 2011;32(3-4):386-93.
34. Allegue C, Gil R, Sanchez-Diz P, Torres M, Quintela I, Carracedo A et al. A new approach to long QT syndrome mutation detection by Sequenom MassARRAY system. *Electrophoresis.* 2010;31(10):1648-55.
35. Basso C, Burke M, Fornes P, Gallagher PJ, de Gouveia RH, Sheppard M et al. Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death. *Virchows Arch.* 2008;452(1):11-8.
36. Kaufenstein S, Kiehne N, Erkapic D, Schmidt J, Hamm CW, Bratzke H et al. A novel mutation in the cardiac ryanodine receptor gene (RyR2) in a patient with an unequivocal LQTS. *Int J Cardiol.* 2011;146(2):249-50.
37. Farrugia A, Keyser C, Ludes B. Efficiency evaluation of a DNA extraction and purification protocol on archival formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. *Forensic Sci Int.* 2010;194(1-3):e25-e8.
38. Laitinen P, Fodstad H, Piippo K, Swan H, Toivonen L, Viitasalo M et al. Survey of the coding region of the HERG gene in long QT syndrome reveals six novel mutations and an amino acid polymorphism with possible phenotypic effects. *Hum Mutat.* 2000;15(6):580-1.
39. Milting H, Lukas N, Klauke B, Korfer R, Perrot A, Osterziel KJ et al. Composite polymorphisms in the ryanodine receptor 2 gene associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Cardiovasc Res.* 2006;71(3):496-505.
40. Oeth P, del Mistro G, Marnellos G, Shi T, van den Boom D. Qualitative and quantitative genotyping using single base primer extension coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MassARRAY). *Methods Mol Biol.* 2009;578:307-43. doi:10.1007/978-1-60327-411-1\_20.
41. Schaeffeler E, Zanger UM, Eichelbaum M, Asante-Poku S, Shin JG, Schwab M. Highly multiplexed genotyping of thiopurine s-methyltransferase variants using MALDI-TOF mass spectrometry: reliable genotyping in different ethnic groups. *Clin Chem.* 2008;54(10):1637-47.
42. Koop A, Goldmann P, Chen SR, Thieleczek R, Varsanyi M. ARVC-related mutations in divergent region 3 alter functional properties of the cardiac ryanodine receptor. *Biophys J.* 2008;94(12):4668-77.
43. Tiso N, Stephan DA, Nava A, Bagattin A, Devaney JM, Stanchi F et al. Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2). *Hum Mol Genet.* 2001;10(3):189-94.
44. Horn H, Pott C, Kalla J, Dreyling M, Rosenwald A, Ott G et al. A multiplex MALDI-TOF MS approach facilitates genotyping of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tumour specimens. *Pharmacogenet Genomics.* 2010;20(10):598-604.
45. Quach N, Goodman MF, Shibata D. In vitro mutation artifacts after formalin fixation and error prone translesion synthesis during PCR. *BMC Clin Pathol.* 2004;4(1):1.
46. Do H, Dobrovic A. Dramatic reduction of sequence artefacts from DNA isolated from formalin-fixed cancer biopsies by treatment with uracil-DNA glycosylase. *Oncotarget.* 2012;3(5):546-58.
47. Hansen A, Willerslev E, Wiuf C, Mourier T, Arctander P. Statistical evidence for miscoding lesions in ancient DNA templates. *Mol Biol Evol.* 2001;18(2):262-5.
48. Hofreiter M, Jaenicke V, Serre D, Haeseler Av A, Paabo S. DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(23):4793-9.
49. Brion M, Allegue C, Santori M, Gil R, Blanco-Verea A, Haas C et al. Sarcomeric gene mutations in sudden infant death syndrome (SIDS). *Forensic Sci Int.* 2012;219(1-3):278-81.
50. Roux-Buisson N, Cacheux M, Fourest-Lieuvin A, Fauconnier J, Brocard J, Denjoy I et al. Absence of triadin, a protein of the calcium release complex, is responsible for cardiac arrhythmia with sudden death in human. *Hum Mol Genet.* 2012;21(12):2759-67.



**Fig. 1** Principle of SNP analysis by using iPLEX Technology (Sequenom): after the amplification of the target regions where the SNPs of interest are located (step 1), unincorporated ddNTPs are deactivated by Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) treatment (step 2). The primer extension (iPLEX) reaction is performed with mass-modified ddNTPs (step 3). After treating the extended primers with resin to optimize the detection and then spotting them into a spectrochip (step 4), the resulting products are analyzed by MALDI TOF MS (step 5)



**Fig. 2** Comparison of genotyping call rate in differently processed DNA samples (frozen versus FFPE). The quality level depicted within the x-axis is given by the MassArray Typer software ranging from “conservative” (high degree of confidence) to “aggressive” (low degree of confidence). The item “no call” implies the failure of automated genotyping. The item “usercall” indicates manual genotyping when automated genotyping failed.



**Fig. 3** Detection of an artefact sequence in FFPE sample. **a** Corresponding MassARRAY spectrums of frozen and FFPE samples are shown. For the SNP 61\_8876 (corresponding to p.Q2958R, a common polymorphism described in the literature), the case n<sup>o</sup>1 is heterozygote AG on frozen sample and homozygote AA on FFPE sample. **b** Sequencing results (only Forward sequences are shown). The sequencing confirmed the G>A base transition in FFPE sample corresponding to an artefact sequence

**Table 1** Series of postmortem genetic identification of mutations in cardiac ion channel genes in young adult

Reference	N	Interval time	Age range (years)	Ratio M/F	Gene investigated	Genetic Analyses	Samples	N variant gene (% yield)
Chugh et al, 2004	12	1984-1996	n.a.	n.a.	KCNQ1,KCNH2,KCNE1, KCNE2, SCN5A	SSCP	FF-PET (myocardial tissue)	2 KCNH2 (17)
Di Paolo et al, 2004	10	1996-2004	13-29	1	LQTS genes	SSCP	FF-PET	2 KCNQ1 (20)
Nishio et al, 2006	18	During 9y	2-42	2.6	RyR2 (targeted analysis of 24 exons)	HRM	Autopsy blood	2 RyR2 (11)
Tester et al, 2004 and 2007	49	1998-2004	1-43	1.7	KCNQ1,KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNE2, KCNJ2 RyR2 (targeted analysis of 18 exons)	DHPLC	Frozen tissue or autopsy blood	5 KCNQ1 (10) 3 KCNH2 (6) 2 SCN5A (4) 7 RyR2 (14)
Creighton et al, 2006	14	n.a.	1-43	1.3	KCNQ1,KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNE2, RyR2 (targeted analysis of 36 exons)	DS	Frozen tissue	3 RyR2 (21) 1 KCNQ1 (7)
Carturan et al, 2008	35	n.a.	n.a.	n.a.	RyR2(targeted analysis of 25 exons)	DHPLC	FF-PET (myocardial tissue)	0 (0)
Doolan et al, 2008	59	1994-2002	1-35	1.8	KCNQ1,SCN5A	DHPLC	FF-PET (liver and spleen)	0 (0)
Wong et al, 2009	28	n.a.	1-35	n.a.	RyR2 (targeted analysis of 54 exons) CASQ2	DHPLC DS	Autopsy blood or frozen heart	2RyR2 (7) 3CASQ2 (3)
Gladding et al, 2010	21	n.a.	0-34	1.3	KCNQ1,KCNH2, SCN5A,KCNE1, KCNE2	DHPLC or DS	Guthrie (blood spot) card	4 KCNQ1 (21) 4 KCNH2 (21) 1 KCNE1 (4)
Tester et al, 2011	35	1998-2010	4-69	1.9	KCNQ1,KCNH2, SCN5A, RyR2 (targeted analysis of 64 exons)	DHPLC	Frozen tissue or autopsy blood	3 KCNQ1 (8) 6 RyR2 (17)
Skinner et al, 2011	33	2006-2008	1-40	2.6	KCNQ1,KCNH2, SCN5A, AnkB,KCNE1, KCNE2, KCNJ2	DHPLC or DS	Autopsy blood or tissue	1 KCNQ1 (3) 1 KCNH2 (3) 1 SCN5A (3) 2 KCNE1 (6)
Edelmann et al, 2011	35	n.a.	n.a.	n.a.	KCNQ1,KCNH2	SNaPshot minisequencing	Fresh or dried blood samples	1 KCNQ1 (2.5)
Allegue et al, 2011	14	n.a.	1-43	n.a.	KCNQ1,KCNH2,SCN5A	Mass spectrometry in Sequenom Massarray genotyping platform	Frozen or FF-PET or blood	1 KCNQ1 (7)
Larsen et al, 2012	74	1998-2007	0-40	1.5	RyR2 (targeted analysis of 29 exons)	DS	Frozen autopsy blood	7 RyR2 (9.5)
Tester et al, 2012	173	1998-2010	1-69	1.6	KCNQ1,KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNE2, RyR2 (targeted analysis)	DHPLC	Not available in preview article	

N number of negative autopsy with structurally normal heart included in the study, SSCP single-stranded conformational polymorphism, AS automated sequencing, na not available, DS direct sequencing, TDS targeted direct sequencing, HRM high resolution melting

**Table 2** Characteristics of the cohort

Case	sex	age	Time of formalin fixation (days)	Circumstances of death
1	F	4 m	17	Discovered in back sleep position
2	M	20 yrs	7	Discovered in his bathroom
3	M	2 m	11	Discovered in side sleep position
4	F	3 yrs	16	During sleep in the arms of her mother
5	M	20 yrs	4	During physical activity
6	F	16 yrs	11	Sensation of cardiac palpitations preceding a syncope
7	F	8 d	16	Full time delivery
8	M	3 m	6	During sleep
9	F	3yrs	20	During sleep
10	M	2yrs	22	Bout of vomiting without dehydration symptoms
11	F	6m	10	During sleep
12	M	7 m	7	Discovered in side sleep position by his mother

F, female; M, Male; m, months; yrs, years; d, days

**Table 3** Genetic Variants found in this study

AA change (dbSNP rs) NP_001026.2	Nucleotide change NM_001035.2	Gene position	Number of mutated samples	Case number	Previous report
V507I	c.1519 G>A	Exon 16	1ht	10	Medeiros et al. 2009
G1885E (rs 41315858)	c.5654 G>A	Exon 37	1ht	9	Tiso et al. 2001, Milting et al. 2006, Koop et al. 2008, Wong et al. 2009
G1886S (rs 3766871)	c.5656 G>A	Exon 37	1ht	1	Milting et al.2006, Koop et al. 2008, Wong et al.2009
Q2958R (rs 34967813)	c.8876 A>G	Exon 61	8 ht	1, 2, 4-9	Laitinen et al. 2001, Tiso et al. 2001, Meideiros et al. 2009

dbSNP <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>. ht heterozygote

## Résumé/Abstract

### Investigations moléculaires dans la mort subite du sujet de moins de 35 ans

Les canalopathies cardiaques congénitales constituent la principale hypothèse diagnostique dans les cas de mort subite inexpliquée chez les sujets de moins de 35 ans. Afin d'identifier la cause éventuelle du décès et de mettre en place des mesures de dépistage et de prévention chez les apparentés du défunt, nous avons cherché à mettre au point une stratégie de détection post-mortem des mutations sur les gènes connus pour être impliqués dans les canalopathies cardiaques, applicable en routine, à partir de la principale source d'ADN post-mortem disponible en France à savoir les prélèvements fixés au formol et inclus en paraffine (FFIP).

Les analyses moléculaires ont porté sur 12 cas de mort subite inexpliquée autopsiés à l'Institut de médecine légale de Strasbourg, inclus de manière prospective de 2008 à 2011 selon un protocole défini, pour lesquels nous disposions de prélèvements tissulaires FFIP et congelés. Deux techniques de détection de variants génétiques ont été évaluées, une technique de criblage par l'analyse des courbes de fusion haute résolution ou technique High Résolution Melt (HRM) et une technique de génotypage par spectrométrie de masse MALDI-TOF, respectivement sur le gène *KCNQ1* et le gène *RyR2*.

Nos travaux ont permis de valider un protocole d'extraction-purification d'ADN associant le phénol-chloroforme au kit QIAamp DNA mini® qui n'avait encore jamais été décrit dans la littérature sur des prélèvements FFIP. Les résultats des analyses génétiques ont démontré que la technique de génotypage par spectrométrie de masse MALDI-TOF est adaptée pour la détection de variants génétiques sur le gène *RyR2* à partir d'ADN extrait de prélèvements FFIP à condition de réaliser les expériences en duplicat. Par comparaison avec la technique HRM, la spectrométrie de masse MALDI-TOF nécessite beaucoup moins de temps et de manipulation pour optimiser les réactions mais présente comme principale limite la possibilité de détecter uniquement des mutations connues, sous réserve que leur position sur la séquence soit suffisamment éloignée afin de ne pas limiter le dessin des amorces simple base. La technique HRM couplée au séquençage ciblé nécessite une optimisation plus laborieuse et aléatoire que la technique précédente mais présente comme principaux avantages de pouvoir détecter à la fois les mutations connues et non connues et d'être plus économique que le séquençage systématique de l'ensemble du gène *KCNQ1* et ce même lors de l'exploitation de prélèvements FFIP. Enfin, quelle que soit la technique utilisée, il n'est pas possible de s'affranchir du séquençage de type Sanger afin d'explorer les séquences d'intérêts qui n'ont pu être optimisées avec l'une ou l'autre des méthodes à la fois sur les prélèvements congelés et FFIP. C'est pourquoi l'arrivée des séquenceurs de nouvelles générations ouvre de nouvelles perspectives en matière de diagnostic post-mortem des canalopathies cardiaques.

Aucune mutation potentiellement pathogène n'a été mise en évidence au sein de notre population d'étude sur les gènes *KCNQ1* et *RyR2* et dès lors aucune mesure de dépistage clinique ou génétique n'est actuellement justifiée auprès des apparentés du défunt. Cependant, la taille extrêmement réduite de notre cohorte ainsi que le nombre restreint de gènes étudiés constituent les principales limites de ce travail. De nouvelles investigations sur les autres gènes impliqués dans les canalopathies cardiaques seront nécessaires pour compléter cette première étape et seront réalisées à l'aide des séquenceurs de nouvelles générations. A l'heure de la post-génomique, cette future stratégie de diagnostic génétique post-mortem permettra de se consacrer au véritable enjeu actuel qui est d'établir un lien entre le génotype identifié et le phénotype du patient décédé.

### Molecular investigations of sudden death in people younger than 35 years old

The congenital cardiac channelopathies constitute the principal diagnostic hypothesis in autopsy-negative sudden unexplained death concerning people younger than 35 years old. In order to identify the potential cause of death and to implement screening and prevention measures for the deceased person's relatives, the present study aimed to develop a strategy of mutations detection on known genes implicated in the cardiac channelopathies. This strategy of mutations detection had to be applicable to routine and has been studied on formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissues which are the principal DNA source available in France.

The molecular analyses focused on 12 cases of sudden unexplained death autopsied in the legal Institute of Strasbourg. These cases were prospectively included from 2008 to 2011 according to a defined protocol, for which we have FFPE and frozen tissues. Two technique of sequence variants detection were evaluated: the screening method of High Resolution Melt and the genotyping method based on a MALDI-TOF mass spectrometry, respectively on *KCNQ1* and *RyR2* genes.

In the present work, we validated an extraction-purification protocol using phenol-chloroform and the QIAamp DNA mini® kit that was not previously described on FFPE tissues in the literature. The results of the genetic investigations demonstrate that the MALDI-TOF mass spectrometry is adapted for the genetic variants detection on *RyR2* gene on DNA extracted from FFPE tissues, provided to perform the analyses in duplicate. Comparing to the HRM technology, the MALDI-TOF mass spectrometry needs less time and fewer manipulations to optimize the reactions. The main limit of MALDI-TOF mass spectrometry is the possibility to detect only known variants which positions are not too close together to permit the design of the single base extension primer. The HRM technology needs a more laborious optimization than the precedent method, but presents as main advantages to detect known and unknown variants and is less expensive than the direct sequencing of the entire *KCNQ1* gene, even with FFPE tissues. At least, whatever the technique, there is a necessity of resorting to the Sanger sequencing to explore the sequence of interest none optimized with one or the other technology both on FFPE and frozen tissues. That's why the next generation sequencing method should open new perspectives in the post-mortem diagnostic of cardiac channelopathies.

No pathogenic mutation was detected in our cohort on the *KCNQ1* and *RyR2* genes. Therefore, a clinical or genetic screening does not appear warranted at this time in the relatives of the deceased. However, the extremely reduced size of our cohort and the limited number of genes studied are the principal limits of this work. Further investigations on the other genes implicated in cardiac channelopathies have to be performed to complete this first step and will be realized with the next generation sequencing technology. In the post genomic era, this future strategy of post-mortem genetic diagnostic allowed to focus on the real issue which is to establish a relation between the identified genotype and the phenotype of the deceased.