

Université de Montréal

**Syndrome du QT long: étude clinique à l'Institut Cardiologique
de Montréal et recherche de nouvelles variantes causales par
séquençage à haut débit**

Par

Chaix Marie-Alexandre

Département de médecine

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en sciences biomédicales option générale

6 Décembre 2013

Copyright, CHAIX Marie-Alexandre, 2013

Université de Montréal
Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé:

Syndrome du QT long: étude clinique à l'Institut Cardiologique de Montréal et recherche de nouvelles variantes causales par séquençage à haut débit,

présenté par Marie-Alexandre Chaix,

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Andelfinger (président-rapporteur)

Dr Rioux (directeur de recherche)

Dr Deschepper (membre du jury)

Les données de ce mémoire sont confidentielles.

Sous embargo jusqu'à publication des données.

Résumé

Syndrome du QT long : étude clinique à l'Institut Cardiologique de Montréal (ICM) et recherche de nouvelles variantes causales par séquençage à haut débit.

Le syndrome du QT long (LQTS) est une canalopathie qui est caractérisée par un allongement de l'intervalle QT et est à l'origine d'arythmies ventriculaires, de syncopes et morts subites. À ce jour, 13 gènes ont été associés au LQTS. Chaque gène du LQTS définit une expression clinique particulière de la maladie avec cependant une grande variabilité phénotypique. Ces gènes codent soit pour des canaux ioniques, soit pour des protéines qui interagissent avec ces canaux. Le dépistage génétique des individus identifie typiquement des variantes génétiques causales dans 50-70 % des cas, suggérant l'implication d'autres gènes dans la maladie. Dans notre étude, nous avons évalué 50 patients avec un diagnostic de LQTS à l'ICM pour préciser leurs caractéristiques par rapport à la littérature, et établir des relations entre les génotypes et les phénotypes. Parmi ceux-ci, nous avons recruté 12 patients diagnostiqués LQTS (basé sur le score de diagnostic clinique de Schwartz), mais avec un diagnostic génétique négatif après séquençage des gènes connus à l'ICM. Un séquençage à haut débit de l'ensemble des exons a été réalisé pour ces 12 patients afin de mettre en évidence de nouvelles variantes causales. Nous avons développé une approche analytique par étapes qui se concentre sur (1) les gènes de LQTS connus, (2) les gènes dans des loci identifiés par des études d'association réalisées sur la longueur de l'intervalle QT normal, et (3) les gènes montrant la même variante chez plusieurs patients. Dans notre étude, les phénotypes des patients avec un génotype négatif sont globalement comparables avec ceux avec un génotype positif, la seule différence étant qu'ils présentent plus de syncopes et d'arrêts cardiaques ($p < 0,05$). L'analyse génétique a permis d'identifier de nouvelles variantes dans des gènes connus du LQTS incluant KCNJ2, ANK2 et AKAP9. Une variante a été identifiée dans NOS1AP, un gène mis en évidence dans les études d'association sur la variation de l'intervalle QT normal. Deux patientes avec des caractéristiques phénotypiques très semblables présentent la même variante à l'état homozygote dans TECRL, un nouveau gène candidat dont le rôle dans le LQTS est inconnu à ce jour, mais qui pourrait être lié à un déséquilibre du métabolisme lipidique. Cette étude vise à améliorer la prise en charge des patients et des familles actuellement sans diagnostic génétique après recherche dans les gènes connus.

Mots-clés : syndrome du QT long, séquençage haut débit, variantes rares, phénotype, génotype

Abstract

Long QT syndrome : clinical study in Montreal Heart Institute and identification (MHI) of new causal variants by whole exome sequencing.

Long QT syndrome (LQTS) is a channelopathy, characterized by an elongation of the QT interval, and is a cause of ventricular arrhythmias, syncope and sudden death. To date, 13 genes have been associated with LQTS risk. The different LQTS genes have been associated with differing clinical expression of the disease but with a high phenotypic variability; all implicate ion channel or accessory proteins interacting with them. Genetic testing of individuals identifies causal genetic variants in up to 50-70% of cases, suggesting that additional genes may be involved in this disease. In the current study, we have identified 50 patients with a diagnosis of Long QT syndrome at the MHI in order to compare the characteristics of our patient population with those described in the literature and to evaluate the link between phenotype and genotype. We have also recruited 12 patients with elevated disease risk (based on the **Schwartz's** clinical diagnostic score) for LQTS, but reported negative for clinical testing of mutations in the known LQTS loci, and have used a whole-exome next generation DNA sequencing approach in order to identify new variants and candidate genes in LQTS. We have developed a stepwise analytic approach that focuses on (1) the known LQTS genes, (2) the genes in loci identified in genome-wide association studies of normal QT-interval, and (3) the loci showing variants across multiple patients. In our study, we observe that patients with a genotype negative have a comparable phenotype than patients who are genotype positive except they have higher rate of syncope and sudden death ($p < 0,05$). Our approach identified new variants in known LQTS genes KCNJ2, ANK2 and AKAP9, and in NOS1AP, a gene highlighted by genome-wide association studies of QT interval. We also identify 2 patients with a very similar phenotype with a homozygous variant in TECRL, an novel candidate gene with an unknown role in LQTS to date, but TECRL could be related to LQTS by a disorder of lipid metabolism. This approach should improve clinical diagnosis of patients and families that are currently reported as negative for the known LQTS loci.

Keywords : Long QT syndrome, Next-gen sequencing, whole exome, rare variants, ph enotype, genotype.

Table des matières :

Liste des tableaux :	viii
Liste des figures :	ix
Liste des abréviations :	x
1-Introduction :	1
Quelques concepts de base sur la génétique des maladies monogéniques et complexes :	1
I-Clinique et recherche dans les pathologies cardiaques monogéniques :	3
I-1 L’historique de la génétique dans les pathologies cardiaques monogéniques :	3
I-2 L’évaluation génétique dans les maladies monogéniques cardiaques, un essentiel dans la pratique cardiologique :	3
I-3 La découverte de nouvelles variantes dans les maladies monogéniques par le séquençage à haut débit :	7
II-Le syndrome du QT long, une maladie monogénique avec un diagnostic génétique incomplet :	9
II-1 La physiopathologie du LQTS, de la génétique aux troubles du rythme cardiaque :	9
II-2 Aspects génétiques et épidémiologie du LQTS :	12
II-3 Aspects Cliniques et diagnostiques du LQTS :	14
II-4 Le diagnostic génétique dans le LQTS :	21
2- Matériels et Méthodes :	23
2-1 Identification des patients « cas index » diagnostiqués LQTS à l’ICM :	23
2-2 Recueil du phénotype des patients « cas index » diagnostiqués LQTS :	24
2-3 Identification et recueil du phénotype des membres de famille des patients diagnostiqués LQTS :	25
2-4 Diagnostic génétique à l’ICM pour le LQTS :	25
2-5 Critères d’inclusions et d’exclusions pour l’étude phénotypique des patients diagnostiqués LQTS :	26
2-6 Critères d’inclusions et d’exclusions pour l’étude génétique par séquençage à haut débit de l’ensemble des exons :	26
2-7 Analyses phénotypiques des patients diagnostiqués LQTS à l’ICM et des membres de leurs familles :	27
2-8 Protocole expérimental de séquençage à haut débit de l’ensemble des exons par HiSeq2000 :	29

2-9	Alignement des séquences, nomination, annotation et filtration des variantes :.....	31
2-10	Identification, validation et caractérisation des nouveaux gènes et variantes impliqués dans le LQTS :	34
3-Résultats	:	39
3-1	Identification des patients diagnostiqués LQTS à l'ICM et sélection de la population pour l'étude de séquençage à haut débit :	39
3-1-1	Identification des patients diagnostiqués LQTS à l'ICM :	39
3-1-2	Recrutement des patients LQTS pour le séquençage de l'ensemble des exons :.....	45
3-2	Analyses phénotypes-génotypes :	48
3-3	Résultats de l'alignement des séquences, nomination, annotation, filtration et validation des variantes :.....	52
3-4	Variante mise en évidence dans les gènes connus du LQTS non testés par la clinique de génétique :.....	54
3-5	Variante mise en évidence dans un locus des études d'associations pangénomiques QTGEN et QTSCD, le gène NOS1AP :.....	62
3-6	Variante mise en évidence dans TECRL, gène identifié par la présence d'une variante à l'état homozygote chez deux patientes :.....	65
4-Discussion	:	71
4-1	Étude de la population diagnostiquée LQTS à l'ICM :.....	71
4-2	Identification de nouvelles variantes potentiellement causales du LQTS par séquençage haut débit :	74
4-3	Nouvelles orientations de notre étude :	79
Bibliographie	:	82
APPENDICE	:	xii

Liste des tableaux :

<i>Tableau I.I</i> : Les normes de l'intervalle de QTc en fonction de l'âge et du sexe définies par Goldenberg et Moss. [58].	14
<i>Tableau I.II</i> : Les génotypes et phénotypes du Syndrome du QT Long	16
<i>Tableau I.III</i> : Définition des phénotypes LQTS1, 2 et 3.	19
<i>Tableau I.IV</i> : Score de diagnostic clinique actuel de Schwartz (2011) [65].	20
<i>Tableau M.I</i> : Les différents algorithmes de dbNSFP.	33
<i>Tableau M.II</i> : Paramètres de contrôles réalisés par les différents logiciels.	34
<i>Tableau M.III</i> : Outils utilisés pour évaluer un rôle potentiel dans le LQTS.	38
<i>Tableau R.I</i> : Phénotype des cas index diagnostiqués LQTS à l'ICM.	42
<i>Tableau R.II</i> : Membres de familles (MF) testés pour la mutation familiale.	43
<i>Tableau R.III</i> : Caractéristiques phénotypiques de 17 membres de famille avec génotype positif.	44
<i>Tableau R.IV</i> : Population recrutée à l'ICM pour le séquençage à haut débit : profil clinique, histoire familiale, score de diagnostic clinique.	47
<i>Tableau R.V</i> : Comparaison des phénotypes pour les patients LQTS génotype positif/négatif.	50
<i>Tableau R.VI</i> : Mutations et catégorisation des patients avec un génotype positif de LQTS à l'ICM.	51
<i>Tableau R.VII</i> : Répartition du caractère symptomatique et asymptomatique en fonction de la catégorisation des mutations chez un total de 33 patients (cas index et membres de familles).	52
<i>Tableau R.VIII</i> : Comparaison des caractéristiques phénotypiques de notre « patiente 1 » aux 33 patients avec mutation KCNJ2 de l'étude de Delannoy et al. et aux données de la littérature complémentaires.	56
<i>Tableau R.IX</i> : Comparaison des phénotypes de la patiente 7 et 11.	67

Liste des figures :

Figure 1.1 : Le potentiel d'action myocardique normal et dans le LQTS.	10
Figure I.2 : ECG de surface et mesure de l'intervalle QT.	11
Figure M.1 : Plan de l'étude de séquençage à haut débit de l'ensemble des exons	28
Figure M.2 : Préparation de bibliothèques selon le protocole « Low Throughput » d'Illumina pour HiSeq2000.	29
Figure M.3 : Enrichissement en exons selon le protocole « Truseq exome enrichment » d'Illumina pour HiSeq2000.	30
Figure M.4 : Les différentes étapes de l'analyse séquentielle pour l'identification de gènes candidats.	35
Figure R.1 : Identification des patients « cas index » diagnostiqués LQTS à l'ICM.	40
Figure R.2 : Filtration des variantes issues des données de séquençage.	54
Figure R.3 : Kir 2.1 codé par KCNJ2, profil d'expression et variantes connues.	57
Figure R.4 : Profil d'expression tissulaire de ANK2 et variantes connues dans ANK2.	60
Figure R.5 : Interactions entre l'isoforme YOTIAO et KCNQ1, et localisation sur YOTIA de la variante S1570L, seule variante associée à ce jour au LQTS 11.	62
Figure R.6 : Profil d'expression tissulaire de NOS1AP.	64
Figure R.7 : Profil d'expression tissulaire de TECRL.	68
Figure R.8 : Famille des 5 alpha-stéroïdes réductases.	69
Figure R.9 : Élongation des acides gras à chaînes très longues.	70

Liste des abréviations :

aa :acide-aminé

ATS : Syndrome d'Andersen-Tawil

BAV : Bloc Auriculo-Ventriculaire

BAM : Format informatique, Binary Alignment Map Format

BB- : Béta-Bloquants

BWA : Logiciel Burrows-Wheeler Alignment tool

DAI : Défibrillateur Automatique Implantable

DADS : Extrasystoles tardives ou « Delayed After Depolarization »

dbSNP138 : Base de données de polymorphismes nucléotidiques ou « database of single nucleotide polymorphism »

EADS : Extrasystoles précoces ou « Early After Depolarization »

ECG : Electrocardiogramme

ESA : Extrasystole Auriculaire

ESV : Extrasystole Ventriculaire

ESP6500 : Projet de séquençage à haut débit des exons issus de 6500 exomes ou « Exome Sequencing Project from 6500 exomes »

FEVG : Fraction d'éjection du ventricule gauche

FV : Fibrillation Ventriculaire

GATK : Outil d'analyses informatiques, Genome Analysis Toolkit

GERP : Genomic Evolutionary Rate Profiling

GWAS : Étude d'association pangénomique ou « Genome Wide Association Studies »

HapMap : Haplotype Map

ICM : Institut Cardiologique de Montréal

Indel : Mutation type insertion-délétion

LQTS : Syndrome du QT long

LRT : Likelihood Ratio test

MAF : Fréquence allélique minimale

MHI : Montreal Heart Institute

MF : Membre de la Famille

NGS : Séquençage de nouvelle génération ou « Next Generation Sequencing »

PA : Potentiel d'Action

Pb : paire de bases

PCR : Réaction en chaîne par polymérase ou « Polymerase Chain Reaction »

PDZ domaine : acronyme combinant les 3 premières lettres de 3 protéines, la première est post synaptic density protein (PSD95), la deuxième est Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), et la troisième est zonula occludens-1 protein (zo-1)

PMK : Pacemaker

PR : intervalle sur l'ECG entre le début de l'onde P et le début de l'onde Q

RWS : Syndrome de Romano Ward

SIFT : Sorting Intolerant From Tolerant

SNP : Polymorphisme nucléotidique ou « Single Nucléotide Polymorphism »

SV : Variation structurelle ou « Structural Variation »

TdP : Torsades de Pointes

TVNS : Tachycardie Ventriculaire Non Soutenue

TV : Tachycardie Ventriculaire

VCF : Format informatique, Variant Call Format

WES : Whole Exome Sequencing

WGS : Whole Genome Sequencing

1-Introduction :

La pratique cardiologique est aujourd'hui confrontée aux maladies génétiques que ce soit des maladies monogéniques liées à un gène, ou des maladies complexes liées à la susceptibilité provenant de plusieurs gènes combinés. La recherche a permis de découvrir plusieurs gènes impliqués dans les maladies cardiaques tant monogéniques tels le syndrome du QT long, la cardiomyopathie dilatée et hypertrophique, que complexes comme l'hypertension artérielle et l'athérosclérose. Rort rapports entre le phénotype et le génotype ont été décrits permettant de connaître, en fonction des gènes et des mutations impliqués, la gravité, les facteurs déclenchants, et la conduite à tenir thérapeutique. Mais pour ces pathologies aussi bien monogéniques que complexes, de nombreux gènes restent inconnus. Il est donc important de découvrir ces gènes, afin de permettre une prise en charge plus optimale de ces patients et de leurs familles.

Quelques concepts de base sur la génétique des maladies monogéniques et complexes :

Les variantes génétiques se définissent comme des modifications dans la séquence du génome d'un être vivant. Ces variantes peuvent toucher l'ensemble du génome tant à l'extérieur qu'à l'intérieur des gènes. À l'intérieur des gènes, elles peuvent survenir au niveau des exons comprenant les parties codantes et non codantes de l'ARN messager transcrit, ou des introns, régions non codantes et non transcrites du gène [1]. Ces variantes peuvent prendre plusieurs formes [2]: les plus communes, les SNPs (polymorphisme nucléotidique ou Single Nucleotide Polymorphisme) ou SNVs (variation nucléotidique ou Single Nucleotide Variation), les indels (insertion ou délétions), les CNVs (variation du nombre de copies ou Copy Number Variants) et les réarrangements complexes. Les CNVs correspondent à un nombre variable de copies d'un gène ou d'un segment chromosomique dans le génome entre les individus d'une même espèce. Dans les parties codantes du génome, les SNPs peuvent être soit synonymes (ne causant pas de changement de la séquence d'acide aminé de la protéine traduite, par redondance du code génétique) ou non synonymes (causant une modification de la séquence d'acide aminé de la protéine traduite).

Bien que la division soit arbitraire, les variantes sont souvent classifiées en variantes rares et communes [3]. Les variantes rares ont une fréquence inférieure à 1 % dans la population générale, et sont souvent responsables d'un effet intermédiaire à majeur sur le phénotype. Par opposition, les variantes

communes sont fréquentes dans la population générale et sont souvent responsables d'un effet modeste sur le phénotype. Deux notions s'associent pour déterminer le phénotype d'un individu porteur d'une variante causale : la pénétrance et l'expressivité. La pénétrance correspond à la proportion d'individus possédant un génotype donné qui exprime le phénotype correspondant. L'expressivité correspond à la variabilité des manifestations phénotypiques liées à un génotype donné en général en terme de gravité. Ainsi, les variantes génétiques peuvent induire un phénotype variable selon les individus du fait d'une pénétrance le plus souvent incomplète et d'une expressivité variable qui dépendent de l'interaction avec d'autres gènes et avec l'environnement [4, 5].

Les maladies génétiques sont divisées classiquement en 2 grands groupes [6], le premier, celui des maladies monogéniques regroupe les maladies dont la cause est souvent la conséquence d'une variante rare avec un effet causal majeur dans un gène. À ce jour, la plupart des variantes connues dans les maladies monogéniques sont des SNPs dans la partie codante des exons [7], modifiant la séquence de la protéine traduite du gène atteint. Une variante rare, à l'origine d'un effet causal certain sur le phénotype, sera nommée mutation (fréquence $< 1\%$). Les maladies monogéniques ont une hérédité mendélienne, soit autosomique dominante, soit récessive ou liée au chromosome X. Elles peuvent aussi apparaître de novo. Des variantes dans des gènes différents peuvent causer le même phénotype, correspondant à l'hétérogénéité génétique pour un phénotype. Par exemple, 13 gènes sont impliqués dans le syndrome du QT long (LQTS) [8], et plus de 20 dans la cardiomyopathie dilatée [9]. L'hétérogénéité allélique est définie par l'existence de plusieurs variantes causales dans un même gène [1].

Le second groupe, celui des maladies complexes (polygéniques), regroupe les maladies dont la cause est la conséquence de l'association de plusieurs variantes génétiques fréquentes ayant un effet faible. L'environnement joue un rôle important et les variantes génétiques sont décrites comme des facteurs de prédisposition à la maladie. Dans les maladies complexes, les patients, avec une même expression phénotypique, peuvent présenter des associations de variantes différentes, tandis que des patients porteurs des mêmes variantes génétiques peuvent présenter une expression phénotypique différente. L'hérédité ne suit pas une hérédité mendélienne, les parents vont transmettre à leurs enfants certaines variantes constituant des facteurs de prédisposition. Cette division des maladies monogéniques et complexes n'est pas si simple. Un même phénotype, comme la mort subite par fibrillation ventriculaire, peut correspondre au modèle d'une maladie monogénique avec une variante rare dans un gène, ou à

celui d'une maladie complexe avec des variantes plus communes dans différents gènes. De plus, dans un même gène, certaines variantes peuvent causer un phénotype particulier tandis que d'autres favorisent une simple susceptibilité génétique.

I-Clinique et recherche dans les pathologies cardiaques monogéniques :

I-1 L'historique de la génétique dans les pathologies cardiaques monogéniques :

Le XX^{ème} siècle [4] est marqué par une révolution dans l'analyse génétique, avec la découverte de la double hélice d'ADN en 1953, le premier séquençage de l'ADN de type Sanger en 1977. L'étude fondamentale, de l'équipe québécoise Paré et al. en 1961 [10], a apporté la première preuve de l'origine génétique d'une pathologie cardiaque. Les auteurs décrivent l'histoire familiale d'un patient décédé, d'origine canadienne-française, présentant une cardiomyopathie hypertrophique diagnostiquée sur l'autopsie. Trente des membres de la famille de cet homme (sur 87 membres au total) ont un diagnostic de cardiomyopathie hypertrophique sur 5 générations différentes, cette famille est le premier exemple de transmission autosomique dominante dans les pathologies cardiaques. Le premier gène découvert dans les pathologies cardiaques est un gène codant pour le récepteur du LDL-cholestérol, à l'origine de l'hypercholestorémie. Cette découverte des années 1973-1975 précède la découverte de la technique de séquençage par Sanger, elle est basée sur des essais fonctionnels [12, 13]. Par la suite, de nombreux gènes sont mis en évidence comme les gènes de susceptibilité aux arythmies cardiaques, en particulier avec les analyses génétiques dans des familles présentant un LQTS. Le séquençage de type Sanger fut utilisé pour le premier séquençage du génome humain en 2001 (« the Human Genome Project »). Après 13 ans de travail et pour un coût de 2,7 milliards de dollars, environ 20000 gènes sont mis en évidence [14-16]. En 2008, le génome humain est séquencé en 5 mois pour 1,5 million de dollars. De nos jours, des techniques de séquençage à haut débit permettent le séquençage de l'ensemble du génome en quelques jours, pour des sommes plus petites. Ces études mettent en évidence des variantes rares avec un effet causal important [17] [18], de nombreux gènes ont été découverts grâce à ces nouvelles technologies [19-21].

I-2 L'évaluation génétique dans les maladies monogéniques cardiaques, un essentiel dans la pratique cardiologique :

Face à certains phénotypes évoquant une maladie génétique, une collaboration est nécessaire entre cardiologues, généticiens, conseillers génétiques, et biologistes [22, 23]. Les 4 parties principales de

cette évaluation génétique cardiologique sont l'expertise médicale, le test génétique, son interprétation, et le conseil génétique [1, 24].

L'expertise médicale évalue la possibilité d'une étiologie génétique et élimine les autres étiologies [25]. L'interrogatoire doit insister sur l'histoire familiale, les liens familiaux et les phénotypes de chaque membre de la famille [26] avec l'établissement d'un arbre généalogique [9]. Ce dernier est un bon moyen de visualiser la maladie familiale (la pénétrance, l'âge moyen d'apparition, les facteurs environnementaux précipitants, et la létalité [9]), ainsi que de connaître le mode d'hérédité et les patients à dépister. À la fin de l'expertise médicale, le médecin propose un test génétique spécifique pour le membre de la famille le plus atteint [25], en général le cas index consultant, afin d'augmenter les chances de trouver la variante responsable du phénotype [22] [27]. En cas de décès d'un patient sans antécédents particuliers, l'autopsie est une aide précieuse au diagnostic, mais celle-ci n'est pas toujours réalisée. Dans ce dernier cas, il faudra procéder à une enquête clinique parmi les membres de la famille pour rechercher une pathologie cardiaque familiale génétique.

Le test génétique est réalisé à partir d'un prélèvement sanguin, après consentement éclairé. Les informations génétiques sont privées [28]. En cas de résultat génétique positif, un patient peut faire le choix d'informer ou non sa famille de ses résultats pour permettre un dépistage génétique familial. Les membres de la famille du premier degré seront les premiers à être investigués avec un examen clinique cardiologique et une recherche génétique de la mutation familiale. Dans les maladies à pénétrance et expressivité variable, il est recommandé de rechercher la mutation familiale chez tous les membres de la famille même asymptomatiques. Un patient asymptomatique peut être porteur de la mutation, avec un risque de transmission à ses enfants et de développement de symptômes tardifs. Les dépistages génétiques parmi les membres de la famille asymptomatiques se font en général sur les parents en premier, pour éviter de tester l'ensemble des enfants alors que le parent n'est pas porteur. Si le test génétique ne peut pas être réalisé chez le cas index comme certaines fois en cas de décès, le test sera réalisé chez le membre de famille le plus atteint après l'enquête clinique familiale. Dans le cas où un diagnostic a été porté chez le cas index décédé sans possibilité de test génétique et l'enquête familiale reste négative, des tests génétiques peuvent être réalisés chez les deux parents pour la maladie diagnostiquée afin d'identifier celui qui est porteur asymptomatique en cas de transmission

autosomique dominante. En l'absence de diagnostic clinique possible chez le cas index décédé et d'une enquête clinique familiale restant négative, il ne sera pas possible de réaliser de tests génétiques.

Deux types d'analyses génétiques sont possibles en fonction des pathologies : l'analyse ciblée ou l'analyse de l'ensemble de la partie codante du gène. L'analyse peut être ciblée sur des variantes connues dans certains gènes [22], par séquençage, PCR ou enzymes de restriction, les résultats de l'analyse sont en général rapidement obtenus. Mais la plupart du temps, il est nécessaire de séquencer l'ensemble de la séquence codante du gène et des séquences de liaison intron/exon (zones d'épissage) [1] car dans les maladies monogéniques cardiaques, il existe de très nombreuses variantes rares dans un même gène [29]. Dans ce cas, les gènes connus responsables d'une maladie monogénique (en général les plus fréquemment impliqués dans la maladie) [22] sont séquencés selon un séquençage classique automatisé de type Sanger [30]. En conclusion, pour un cas index, la recherche d'une variante responsable peut se faire par les deux types de tests ciblés ou non en fonction de la maladie. Par contre lors de l'enquête familiale, la recherche de la mutation familiale sera faite par un test ciblé sur la mutation familiale connue. On parle de test génétique positif lorsqu'une variante a été mise en évidence et par opposition de test génétique négatif lorsqu'aucune variante n'a été mise en évidence.

L'interprétation d'un test génétique : lorsqu'une variante est mise en évidence, il est nécessaire d'évaluer son pouvoir causal c'est-à-dire de déterminer si elle est responsable du phénotype. En pratique clinique, cette évaluation se fait par la catégorisation de la variante en général sur 3 critères :

(1) l'évaluation de la **pathogénicité moléculaire** de la variante, entraîne-t-elle un changement d'acide aminé, a-t-elle un retentissement sur la fonction de la protéine ?

(2) la **revue de la littérature**, cette variante a-t-elle déjà été décrite dans ce même phénotype chez d'autres individus ?

(3) **l'enquête familiale** en recherchant une co-ségrégation de la variante et du phénotype malade dans la famille, c'est-à-dire des membres de la famille malades porteurs de la variante mise en évidence chez le cas index.

Le résultat du test génétique va être déterminant dans la prise en charge du patient et de sa famille. Un test génétique positif va permettre un diagnostic chez le patient et la mise en place si possible d'une thérapeutique adaptée au gène responsable. Pour les membres de la famille, une enquête génétique pour la mutation familiale pourra être menée. En cas de test génétique positif chez un membre de la famille, un suivi régulier, plus ou moins associé à une thérapeutique préventive, et un conseil génétique seront

mis en place. Un membre de la famille avec un résultat négatif pour la mutation familiale ne nécessitera aucun suivi additionnel [22]. Un test génétique négatif chez le cas index, pour les pathologies cardiaques monogéniques, ne remettra pas en cause le diagnostic, car seulement un certain nombre de gènes sont connus comme responsables de ces pathologies. Il faut prendre en considération que des gènes restent inconnus à ce jour. Ce résultat négatif empêchera une prise en charge thérapeutique optimale pour le cas index et le dépistage génétique présymptomatique des membres de la famille. Le dépistage parmi les membres de famille ne sera que clinique, et le risque sera lié aux membres de la famille asymptomatiques à risque de développer des symptômes. Ces patients sont souvent peu suivis du fait de l'absence de preuve génétique et d'une mauvaise prise de conscience par le patient et son médecin des risques présents.

Dans certains cas, l'interprétation d'un test génétique est difficile, par exemple lorsque la causalité d'une variante n'est pas évidente ou lorsque plusieurs variantes sont mises en évidence dans différents gènes. Les variantes, dont la causalité est incertaine, posent un réel problème de prise en charge en particulier pour le dépistage des membres de la famille asymptomatiques, à risque de développer des symptômes. Si la variante n'est au final pas la variante causale, les conséquences sont importantes avec le risque de faux positifs (membres de la famille asymptomatiques porteurs de la variante, mais sans risque de développer la maladie) et de faux négatifs (membres de la famille asymptomatiques non porteurs de la variante, pour lesquels on écarte le diagnostic mais à risque de développer des symptômes).

Le conseil génétique est nécessaire avant et après le résultat du test génétique, pour expliquer au patient le risque de transmission à la descendance et les conséquences de la découverte d'une variante causale pour lui et sa famille.

Bien que la pratique de la génétique ait nettement progressé, il reste encore des défis liés :

- (1) **au sous-diagnostic** clinique des pathologies génétiques. Le diagnostic génétique est en général évoqué devant une histoire familiale et un phénotype très suggestif.
- (2) **à l'interprétation de la causalité d'une variante** nécessitant le développement d'études fonctionnelles.
- (3) **et au test génétique négatif** après analyse des gènes connus, n'expliquant pas 100 % des étiologies, [25], **d'où la nécessité de rechercher ces nouveaux gènes.**

Le diagnostique génétique a un impact certain sur les décisions médicales pour les membres de la famille, et de plus en plus pour les cas index. Il est ainsi nécessaire d'identifier les gènes chez les familles avec un génotype à ce jour négatif. Les technologies de séquençage à haut débit peuvent permettre d'identifier ces nouveaux gènes, et ainsi permettre les enquêtes génétiques familiales.

I-3 La découverte de nouvelles variantes dans les maladies monogéniques par le séquençage à haut débit :

L'identification traditionnelle des variantes génétiques par séquençage Sanger est très fiable, mais difficile pour investiguer un grand nombre de gènes, puisqu'elle serait trop longue et trop coûteuse [31]. Les méthodes de séquençage à haut débit sont plus en mesure de rechercher de nouvelles variantes génétiques, par un séquençage massif en parallèle de plusieurs échantillons à partir de séquences amplifiées (2^{ème} génération), ou d'une seule molécule d'ADN (3^{ème} génération) [4]. La taille du génome humain étant de 3,2 milliards de paires de bases (pb) et l'ensemble des exons formant 30 millions de pb, il est nécessaire d'utiliser des plateformes à haut débit [32]. Ces plateformes permettent un séquençage de plus de 600 milliards de pb par cycle contrairement à 1000 pb pour le séquençage de type Sanger [33]. De plus, elles sont moins coûteuses pour le séquençage d'un grand nombre de gènes. Le séquençage à haut débit peut être réalisé soit sur l'ensemble du génome (whole-genome WGS), ou être ciblé sur les exons (whole-exome WES) incluant les séquences UTR, les séquences exoniques, et les séquences introniques adjacentes aux exons. Le WES est actuellement le plus utilisé, car dans les maladies monogéniques, 85% des variantes connues sont présentes dans les exons, soit environ 100 000 variantes réparties dans 3700 gènes [34]. Le WES couvre environ 21 000 gènes codants pour 180 000 protéines [35]. Contrairement au WES, une étude de WGS permet la recherche de variantes dans les introns, les séquences régulatrices et les séquences intergéniques. Mais le WGS est plus long, plus fastidieux en terme d'analyses, et plus important en terme de stockage de données et de coût. Le WES engendre un coût moins important que le WGS, ainsi qu'une quantité de données à stocker moindre. Le WGS est souvent utilisé pour l'analyse des génomes plus petits que le génome humain : les virus, bactéries <5Mbp [36, 37] ou de petits échantillons de génome humain comme les jumeaux [38, 39]. De plus, le fait de se concentrer sur les exons, soit 1,5 % du génome, permet de séquencer un plus grand nombre d'individus sur un même cycle avec une couverture satisfaisante. Le nombre de variantes mises en évidence sera plus petit que dans un WGS [31].

Le WES a déjà permis de découvrir plusieurs nouveaux gènes dans les maladies cardio-vasculaires mendéliennes, contrairement au WGS [32]. Dans la cardiomyopathie dilatée, des variantes ont été

retrouvées dans TTN (protéine sarcomérique, étude ciblée des exons du gène sur 312 individus) [40], BAG3 (protéine chaperonne, étude ciblée des exons du gène sur 311 individus) [41], et GATAD1 (zinc finger, étude familiale sur l'ensemble des exons) [41, 42]. Une étude de WES, sur une famille de 4 enfants, a permis de découvrir le gène MRPL3 mitochondrial (impliqué dans l'assemblage de la chaîne respiratoire) responsable du développement de cardiomyopathies hypertrophiques [43]. Le gène MYH6 [42], qui intervient dans la formation des myofibrilles sarcomériques, est responsable du développement de communications cardiaques congénitales anormales. Les anévrismes thoraciques aortiques ont été associés au gène SMAD3 responsable de la transduction du TGF-béata [44].

Ces études de WES suivent généralement trois grandes étapes majeures : le recrutement des individus, l'étape de préparation des échantillons incluant le séquençage, puis l'étape d'analyse des données.

Pour le recrutement des individus, les études de WES visent à étudier des phénotypes précis. Le but est de limiter l'hétérogénéité clinique dans une population d'étude, qui est un frein à la découverte de mutations en particulier en cas d'hétérogénéité génétique [31]. Il existe plusieurs plateformes technologiques de WES dont les principales sont Genome Sequencer FLX System de la compagnie Roche, SOLiD next generation sequencing de Life Technologies et HiSeq2000 d'Illumina [30, 45]. L'identification de variantes causales par le WES nécessite une succession d'étapes comme le plan utilisé dans notre étude (*cf. tableau M.1*). Premièrement, la préparation des échantillons d'ADN suit des étapes essentielles selon un protocole défini par chaque compagnie, ces échantillons d'ADN préparés sont appelés des « librairies d'ADNs ». Comme le WES ne séquence que les exons, des sondes complémentaires aux exons sont fournies par les compagnies, afin d'enrichir les séquences exoniques par hybridation dans les librairies préparées. Le séquençage est automatisé dans les plateformes par technique de ligation, soit par une simple lecture « single read » (chaque brin est séquencé une fois dans un sens) soit par un séquençage des 2 extrémités des fragments d'une librairie « paired end » (chaque brin d'ADN est séquencé à partir des 2 extrémités sur une longueur de 100bp, les séquences sont rarement complémentaires mais il existe un recouvrement avec le reste des fragments.)

L'étape d'analyse des données permet de mettre en évidence les variantes causales. En premier, il est nécessaire d'aligner les séquences issues du WES au génome de référence. Cet alignement permet de reconstruire la séquence d'ADN d'un individu à partir des brins d'ADN fragmentés, et d'établir les variations par rapport au génome de référence définissant les variantes génétiques [34, 46]. La

difficulté majeure du WES est d'identifier des variantes causales parmi le grand nombre de variantes mises en évidence par le séquençage [47], d'où l'utilisation d'algorithmes précis d'analyses des données. Les études de WES suivent en générale deux grandes étapes, la filtration puis la priorisation des variantes. La filtration des variantes [34] est basée sur la fréquence allélique minimum (MAF) afin d'exclure les variantes communes [48], permettant de diminuer le nombre de variantes d'environ 90 %. Un autre moyen de filtration est de conserver seulement les variantes avec un retentissement fonctionnel sur l'acide aminé (non-sens, faux-sens, décalage du cadre de lecture). La priorisation des variantes consiste à hiérarchiser les variantes, pour mettre en évidence celles avec un potentiel pouvoir causal dans le phénotype. Les méthodes sont diverses, comme l'utilisation de la prédiction de la pathogénicité des SNPs non synonymes sur la protéine, de l'expression et de la fonction du gène [34, 47-49].

II-Le syndrome du QT long, une maladie monogénique avec un diagnostic génétique incomplet :

Le syndrome du QT long héréditaire appartient au groupe des maladies monogéniques à pénétrance variable, prédisposant à la survenue de troubles du rythme ventriculaire entraînant des syncopes et des morts subites cardiaques. Ce syndrome est lié à un allongement de la repolarisation des cardiomyocytes, se traduisant sur l'électrocardiogramme (ECG) par un allongement de l'intervalle QTc.

II-1 La physiopathologie du LQTS, de la génétique aux troubles du rythme cardiaque :

Le LQTS est une canalopathie, correspondant à une dysfonction des canaux ioniques intervenant dans le potentiel d'action des cardiomyocytes. Le potentiel d'action correspond à la dépolarisation suivie de la repolarisation de la cellule, liées à un échange d'ions à travers la membrane plasmique par l'intermédiaire des canaux ioniques. Ces échanges sont décrits dans la *Figure 1.1*. Le potentiel membranaire correspond à la différence de potentiel électrique entre les secteurs intracellulaire et extracellulaire, liée à la répartition différente des ions de part et d'autre de la membrane cellulaire. La dépolarisation cellulaire va permettre l'ouverture des canaux calciques, et l'activation du canal RYR2 (Ryanodine Receptor 2) relarguant le calcium à l'origine du déclenchement de la contraction de chaque cardiomyocyte. Après la dépolarisation, les cellules présentent une période où elles sont réfractaires à toute stimulation, correspondant à une période où il est impossible de déclencher à nouveau un

potentiel d'action, car tous les canaux sodiques sont inactivés. La repolarisation cellulaire permet de rétablir un potentiel membranaire de base, et s'en suit une nouvelle dépolarisation.

Le LQTS est lié à des mutations dans les canaux ioniques responsables du potentiel d'action des cardiomyocytes, ou dans les protéines interagissant avec ces canaux ioniques. Ces mutations provoquent des dysfonctions des canaux ioniques à l'origine de l'allongement de la période de repolarisation. Ceci est lié soit à une diminution du courant potassique (diminution de la fonction des canaux potassiques), soit à une augmentation du courant sodique ou calcique (augmentation de la fonction des canaux sodiques et calciques) (cf. **Figure I.1**) se traduisant sur l'ECG par un allongement de l'intervalle QT (cf. **Figure I.2**).

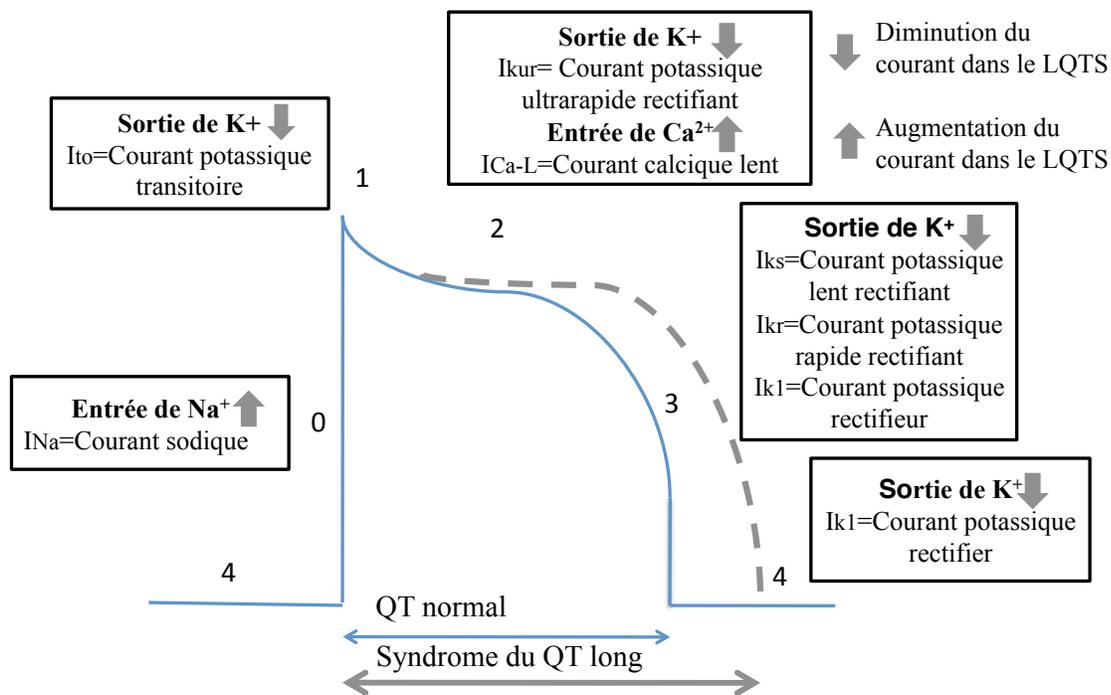


Figure I.1 : Le potentiel d'action myocardique normal et dans le LQTS.

Le potentiel d'action normal est représenté en bleu avec 4 phases, phase 0 : dépolarisation liée à une entrée de courant sodique dans la cellule, phase 1 : repolarisation initiale liée à une sortie initiale de potassium de la cellule, phase 2 : phase de plateau liée à un équilibre entre la sortie de potassium de la cellule et l'entrée de calcium, phase 3 : repolarisation par la sortie de potassium, phase 4 : potentiel membranaire de repos maintenu par le courant I_{k1} . La repolarisation allongée dans le LQTS est représentée en gris pointillé. Les flèches grises dans les encadrés indiquent les variations des courants à l'origine de l'allongement de l'intervalle de la repolarisation dans le LQTS.

La mesure de l'intervalle QT sur l'ECG est le reflet de la durée du début de la dépolarisation à la fin de la repolarisation cellulaire, c'est-à-dire du début du QRS à la fin de l'onde T sur l'ECG, exprimé en

millisecondes. La fin de l'onde T est définie par l'intersection entre une ligne tangente à la pente la plus raide de la branche descendante de l'onde T et la ligne isoélectrique [50]. Le QT est fortement dépendant de la fréquence cardiaque, donc les analyses se font sur l'intervalle QTc, corrigé en fonction de la fréquence cardiaque selon la formule de Bazett. L'intervalle QTm est une moyenne des mesures réalisées sur au moins 3 complexes. L'intervalle RR est l'intervalle entre 2 complexes QRS.

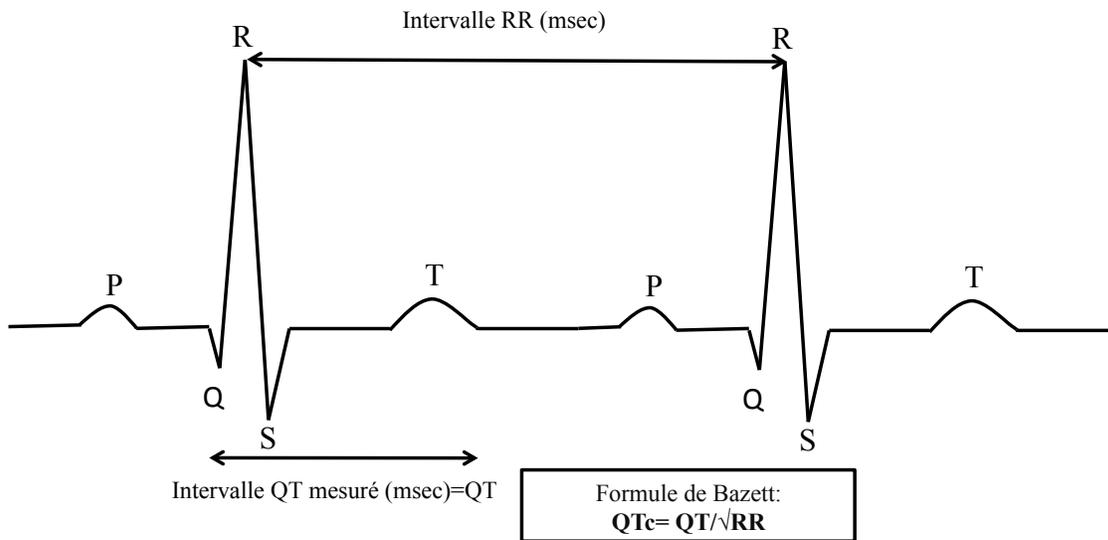


Figure I.2 : ECG de surface et mesure de l'intervalle QT.

L'ECG de surface est l'enregistrement sur un support papier standard de l'activité électrique du cœur par des électrodes. L'onde P correspond à la dépolarisation de l'oreillette, le QRS à la dépolarisation ventriculaire, et l'intervalle QT correspond à la durée entre le début de la dépolarisation et la fin de la repolarisation, il est exprimé en millisecondes.

Les arythmies dans le LQTS sont expliquées par la combinaison de 3 facteurs détaillés dans le triangle de Coumel [51].

1-Le substrat électrophysiologique est lié à un allongement de la repolarisation. Dans un cœur normal, les cellules des 3 couches c'est à dire l'endocarde, le myocarde et l'épicarde présentent une répartition différente des canaux ioniques, à l'origine de repolarisations de durées légèrement différentes, ce qui est nommée la dispersion de la repolarisation myocardique. Dans le LQTS, cette dispersion est accentuée du fait de la dysfonction des canaux ioniques. De façon simple, à un temps t, les cellules cardiaques se retrouvent à des moments différents de leur potentiel d'action. Certaines sortent de période réfractaire avant d'autres, créant ainsi un possible circuit pour la propagation d'une

dépolarisation par boucle de réentrée, telles que les torsades de pointe, le trouble du rythme le plus fréquent dans le LQTS [52-55].

2-Les évènements déclencheurs de ces troubles du rythme sont les extrasystoles ventriculaires [56], correspondant à un potentiel d'action survenant plus tôt qu'un potentiel d'action normal, provenant d'un foyer électrique ventriculaire anormal. Les EADs (early after depolarization ou extrasystoles précoces) surviennent à la phase 2 ou 3 du potentiel d'action, et les DADs (delayed after depolarization ou extrasystoles tardives) en phase 4. Du fait de l'allongement de la repolarisation cellulaire, les canaux sodiques sont réactivés avant le retour à un potentiel membranaire de base, et l'entrée d'un courant sodique positif dans la cellule peut déclencher un nouveau potentiel d'action. Ce potentiel d'action se traduit sur l'ECG par une extrasystole ventriculaire de type EAD, car elle survient pendant la phase 2 ou 3 du potentiel d'action, avant le retour à un potentiel membranaire de base [57].

3-Les modulateurs correspondent aux facteurs environnementaux, à l'activité sympathique comme un stress émotif majeur, et aux troubles ioniques.

Une extrasystole survenant dans un substrat électrophysiologique de dispersion majorée de la repolarisation, va pouvoir être conduit de proche en proche par un phénomène de rentrée correspondant à une torsade de pointe, qui va ensuite se disperser dans tout le ventricule et provoquer un arrêt cardiaque par fibrillation ventriculaire.

II-2 Aspects génétiques et épidémiologie du LQTS :

Le LQTS a été décrit la première fois en 1957 par Anton Jervell et Fred Lange-Nielsen sur une famille Norvégienne [58] : 4 des 10 enfants présentaient une surdité congénitale, des syncopes récurrentes durant l'effort ou lors d'émotion, et un allongement du QTc [59] [60]. Ce phénotype est lié à une mutation homozygote dans le gène KCNQ1, codant pour un canal potassique intervenant dans la repolarisation des cardiomyocytes. Romano (en 1963), puis Ward (en 1964), décrivent plusieurs familles avec un même phénotype, associant syncopes, morts subites et allongement du QTc, sans surdité congénitale mais avec une transmission autosomique dominante, définissant le syndrome de Romano-Ward (RWS). Entre 1995 et 1996, des mutations sont retrouvées dans les trois gènes les plus fréquemment impliqués dans le LQTS [61], c'est à dire KCNQ1 [56], KCNH2 [62] et SCN5A[63] respectivement pour les syndromes LQTS1, 2, et 3. Actuellement, 13 gènes sont connus comme impliqués dans le LQTS (*cf. Tableau I.II*) [8]. Parmi les patients avec un génotype positif, la fréquence relative de l'implication de ces 13 gènes n'est pas complètement déterminée. Les 3 gènes KCNQ1,

KCNH2 et SCN5A sont les plus fréquemment impliqués dans la forme classique de Romano Ward du LQTS, soit environ 60 % pour KCNQ1, 35 % pour KCNH2 et 5 % pour SCN5A [8]. KCNE1 et KCNE2 seraient à l'origine de 1 % des cas de LQTS. L'implication d'autres gènes est très rare, avec dans certains cas un seul cas publié comme pour les gènes SNTA1, SCN4B (*cf. Tableau I.II*). Le LQTS présente une hétérogénéité génétique et allélique, avec de nombreuses variantes différentes dans chaque gène. Dans la plupart des cas, les variantes sont dites « privées », c'est-à-dire partagées seulement par les membres d'une même famille.

La prévalence du syndrome clinique du QT long a été estimée à 1:2000 (en 2009) dans une étude sur la population d'origine caucasienne recherchant l'allongement du QTc sur 44596 nouveaux-nés (43080 d'origine caucasienne), recrutés dans 18 maternités [64]. La prévalence est plus importante aujourd'hui [65] qu'en 2008 (1:5000 [58]), et qu'en 2002 (1:7000 [60]), ceci s'expliquant par la meilleure connaissance du phénotype permettant un diagnostic plus facilement. Les données, issues du registre international du LQTS, montrent une prédominance féminine de la maladie non expliquée [66]. Les événements cardiaques sont plus fréquents dans l'enfance pour les individus de sexe masculin, et après l'adolescence pour les individus de sexe féminin.

L'intervalle QTc normal est très variable, avec des longueurs considérées comme normales de 350 à 450 msec pour les hommes, et de 360 à 460 msec pour les femmes. L'intervalle QTc est plus long chez les femmes que les hommes, en raison des flux ioniques différents et l'influence des hormones sexuelles féminines [67]. Il existe une variation de longueur du QT à travers les populations, les femmes asiatiques ayant un QTc plus long que les femmes caucasiennes [67]. Une étude sur 1415 individus d'origines diverses vivant à Hawaii montre des QTc normaux plus courts chez les patients d'origine portugaise, et plus longs chez les patients d'origine japonaise [68]. Par contre, l'étude récente sur la population MESA (Multi ethnic Study of Atherosclerosis) ne montre aucune différence significative sur la moyenne de l'intervalle QTc pour les différentes ethnies [69]. Le LQTS touche l'ensemble des populations, mais il n'y a pas, à ce jour, d'études comparant la prévalence entre les différentes populations caucasiennes, africaines, asiatiques, et hispaniques. Des mutations fondatrices ont été retrouvées avec une prévalence plus importante dans certaines populations, comme en Finlande où 1/250 personnes sont porteuses d'une mutation du LQTS.

II-3 Aspects Cliniques et diagnostiques du LQTS :

Nous allons définir dans ce chapitre les caractéristiques cliniques du LQTS.

Histoire de la maladie du patient : Un patient, présentant un allongement de l'intervalle QTc, peut développer des symptômes ou rester totalement asymptomatique. Les symptômes vont se traduire soit par des syncopes, lorsque les troubles du rythme ventriculaire cessent de manière spontanée, soit par un arrêt cardiaque lorsque ces troubles du rythme ventriculaire évoluent en fibrillation ventriculaire [60]. Les palpitations rapportées par certaines personnes peuvent être liées à des extrasystoles ventriculaires ou des arythmies associées. Les symptômes se manifestent principalement chez les sujets jeunes, le LQTS étant une des premières causes de mort subite chez les sujets de moins de 20 ans [70].

Histoire familiale : Bien que les antécédents familiaux ne soient pas toujours évidents, des syncopes à répétitions et des morts subites inexplicables chez des sujets jeunes sont très en faveur du diagnostic. Mais une histoire familiale peut être négative en cas de pénétrance faible de la mutation, ou de mutation de novo.

ECG : (*cf. figure I.2*) Il faut éliminer en premier lieu une cause réversible d'allongement de l'intervalle QT (ischémie myocardique, hypokaliémie, hypomagnésémie, hypothermie, médicaments, drogues). L'intervalle QTc est très variable chez un même individu, ce qui rend le diagnostic plus difficile. Les limites normales de l'intervalle QTc sont définies en fonction de l'âge et du sexe (*cf. Tableau I.I*). Il existe un chevauchement de longueur de l'intervalle QT entre des patients avec QTc borderline non atteints du LQTS, et les patients atteints d'un LQTS, d'où la difficulté du diagnostic. En plus de la longueur de l'intervalle QTc, il faut prendre en compte la morphologie de l'onde T qui est souvent anormale dans le LQTS, et qui peut se modifier dans le temps.

Tableau I.I : Les normes de l'intervalle de QTc en fonction de l'âge et du sexe définies par Goldenberg et Moss. [58].

	1-15 ans	Homme>15 ans	Femme>15 ans
normal	440 msec	430msec	450msec
borderline	440-460msec	430-450msec	450-470msec
prolongé	460msec	450msec	470msec

Examens paracliniques : Le Holter ECG est un enregistrement de l'ECG effectué sur 24h ou plus. Cet examen peut mettre en évidence un allongement du QTc, survenant de manière inopinée dans le temps. L'épreuve d'effort recherche un allongement du QTc à l'effort ou lors de la récupération, et l'apparition de troubles du rythme cardiaque à l'effort. Le test à l'épinéphrine peut aider à distinguer le LQTS1 des autres LQTS, l'épinéphrine allongeant l'intervalle QTc dans le type 1 seulement [71].

Les deux grands syndromes du LQTS sont 1) le Romano Ward et 2) le Lange Jerwell Nielson.

Le Romano-Ward est un syndrome regroupant des syncopes et arrêts cardiaques liés aux troubles du rythme ventriculaire. La transmission est autosomique dominante, un patient porteur du gène ayant 50% de chance de le transmettre à son enfant. Du fait de la pénétrance incomplète, être porteur ne signifie pas être symptomatique. Il est le plus fréquent. À ce jour, selon les gènes mutés, on peut décrire des subtilités dans le syndrome de Romano Ward.

En opposition au syndrome de Romano-Ward, le syndrome de Lange Jerwell Nielson est très rare. Les patients présentent les mêmes symptômes que dans le Romano Ward, mais associé à une surdité congénitale. La transmission est autosomique récessive avec une mutation homozygote.

Deux autres syndromes représentent des entités distinctes du syndrome de Romano-Ward: le syndrome d'Andersen-Tawil et le syndrome de Timothy.

Le syndrome d'Andersen-Tawil est une maladie rare caractérisée par des signes dysmorphiques, des paralysies périodiques, et une prédisposition aux arythmies ventriculaires. L'intervalle QTc est souvent normal, l'allongement prédominant au niveau de l'intervalle QUc (apparition d'une nouvelle onde après l'onde T nommée onde U).

Le syndrome de Timothy est un des syndromes les plus graves, et est associé à un taux de mortalité important. Les patients présentent un allongement du QTc, un risque de troubles du rythme ventriculaire (en particulier dans les cas d'hypoglycémies et de sepsis), des anomalies structurelles cardiaques (comme par exemple, une communication inter-ventriculaire), des signes dysmorphiques, des infections récurrentes, et des hypoglycémies.

Tableau I.III : Les génotypes et phénotypes du Syndrome du QT Long

LQTS	Gène	Fréquence RWS	Position Chromosomique	Protéine	Altération de la fonction protéique	Transmission	Phénotype
1	KCNQ1	≈60%	1p15.5	Sous unité α du canal potassique KvLQT1, courant IKs	↘ IKs	AD AR	RWS Syndrome de Lange Jerwell Nielson
2	KCNH2	≈35%	7q35-36	Sous unité α du canal potassique HERG, courant IKr	↘ IKr	AD	RWS
3	SCN5A	≈5%	3p21-24	Sous unité α du canal sodique SCN5A, courant INa	↘ INa	AD	RWS
4	ANK2	N/A	4q25-27	Protéine d'ancrage Ankyrine B	↗Ca intra cellulaire	AD	Arrythmies auriculaires et ventriculaires; allongement du QTc inconstant
5	KCNE1	rare	21q22.1-22.2	Sous Unité β du canal potassique KvLQT1: MirK, courant IKs	↘ IKs	AD AR	RWS Syndrome de Lange Jerwell Nielson
6	KCNE2	rare	21q22.1-22.2	Sous Unité β du canal potassique HERG: MiRP1, courant IKr	↘ IKr	AD	RWS
7	KCNJ2	N/A	17q24.3	Sous unité du canal potassique Kir2.1	↘ IK1	AD	Syndrome d'Andersen-Tawil
8	CACNA1C	N/A	12q13.3	Sous unité α du canal calcique type L	↗ICa	AD	Syndrome de Timothy
9	CAV3	rare	3p25.3	Protéine membranaire calvéoline interagissant avec SCN5A	↗ INa	AD	Allongement du QTc
10	SCN4B	1 cas	11q23.3	Sous unité β de plusieurs canaux sodiques	↗ INa	AD	Allongement du QTc (712 msec) et BAV 2/1
11	AKAP9	1 famille	7q21-22	Protéine interagissant avec KCNQ1 en facilitant son action avec PKA	↘ IKs	AD	Allongement du QTc
12	SNTA1	1 cas	20q11.21	Protéine α -1-syntrophine interagissant avec SCN5A	↗ INa	AD	Syncope et allongement du QTc
13	KCNJ5	1 famille	11q24	Sous unité du canal potassique Kir 3.4	↘ IK1	AD	Syncope, mort subite et allongement du QTc.

Légende Tableau I.II : Les génotypes et phénotypes du Syndrome du QT Long

- 1^{ère} colonne : numéro défini du LQTS correspondant à l'ordre chronologique de découverte des gènes
2^{ème} colonne : la couleur bleue correspond aux canaux potassiques, violette aux canaux calciques, orange aux canaux sodiques, rouge aux protéines interagissant avec les canaux ioniques.
3^{ème} colonne : pourcentage de cas de RWS parmi les patients avec un génotype positif (Romano Ward Syndrome) attribuables aux variantes dans le gène de la colonne 2
4^{ème} colonne : la position chromosomique des gènes impliqués dans le LQTS
5^{ème} colonne : les protéines codées par les gènes et leur fonctions
6^{ème} colonne : conséquences des variantes sur les courants ioniques responsables du LQTS
7^{ème} colonne : transmission AD : autosomique dominant, AR : autosomique récessif
8^{ème} colonne : phénotype décrit dans la littérature des patients atteints du LQTS1 à 13. (BAV : bloc auriculo-ventriculaire, RWS : Romano Ward syndrome)

Chacun des 13 gènes présente des particularités syndromiques. Pour certains gènes, il est difficile de définir un syndrome du fait de leur relative rareté (*cf. Tableau I.II*) [58, 72]. Pour chacun des syndromes les plus fréquents de LQTS, les caractéristiques, plus particulières du syndrome de Romano-Ward correspondant, ont été résumées dans le *Tableau I.III*. Cette description permet de montrer des facteurs déclenchants bien différents selon les types de LQTS : l'effort pour le LQTS1, l'émotion et le stimulus sonore pour le LQTS2, le sommeil pour le LQTS3. Ainsi, l'épreuve d'effort va permettre de différencier le LQTS1 d'un autre LQTS, par l'allongement du QTc à l'effort. L'ECG montre des particularités pour chaque type de syndrome, mais il peut également varier à l'intérieur d'une famille présentant la même mutation [73-76]. Le phénotype LQTS5 impliquant le gène KCNE1 (sous unité bêta de KvLQT1) ressemble au LQTS1. De même, le LQTS6, lié à une mutation dans le gène codant pour la sous-unité bêta de canal HerG, a un phénotype ressemblant au LQTS2.

La plupart des mutations, identifiées dans les pathologies humaines, sont des mutations à type de perte de fonction, car la mutation introduit au hasard un changement d'acide-aminé modifiant la séquence protéique. Dans le LQTS, les mutations retrouvées dans le canal sodique, codé par SCN5A, et le canal calcique, codé par CACNA1C, sont des mutations à type de gain de fonction, ce qui est plus rare. Les conséquences différentes de la mutation sur la fonction protéique expliquent que les gènes, impliqués dans le LQTS, sont à l'origine de d'autres phénotypes, ce phénomène est appelé la pléiotropie.

Des mutations dans les gènes KCNQ1, KCNH2, et KCNJ2 codant pour des canaux potassiques, sont à l'origine du phénotype de LQTS par un mécanisme de perte de fonction de ces canaux ioniques, c'est-à-dire une diminution du courant potassique. Des mutations à type de gain de fonction dans ces mêmes gènes sont associées au syndrome du QT court, syndrome entraînant des arythmies ventriculaires par

raccourcissement de l'intervalle QTc [77, 78]. La fibrillation auriculaire familiale est aussi liée à des mutations à type de gain de fonction dans KCNQ1, KCNH2, KCNE2 et KCNJ2 [79, 80]. Des études ont décrit des phénotypes associant le LQTS et la fibrillation auriculaire, secondaires à une même mutation dans KCNQ1 [81, 82]; ces mutations sont complexes, et à l'origine à la fois d'une perte et d'un gain de fonction qui varieraient en fonction du potentiel transmembranaire de la cellule.

De même pour le gène SCN5A, les conséquences de la mutation vont être déterminantes pour le phénotype. Une mutation à l'origine d'un gain de fonction va entraîner un LQTS, mais une perte de fonction est associée à d'autres pathologies comme le syndrome de Brugada (pathologie héréditaire à risque de troubles du rythme ventriculaire), ou des pathologies de la conduction intracardiaque (pauses sinusales, bloc de branche et bloc auriculo-ventriculaire) [83]. Il existe des mutations à l'origine à la fois d'un gain et d'une perte de fonction qui varieraient selon le potentiel transmembranaire de la cellule, expliquant des syndromes de chevauchement associant LQTS et syndrome de Brugada, ou LQTS et troubles de la conduction intracardiaque [80, 84].

L'ensemble des phénotypes liés aux mutations dans les gènes du LQTS sont dans la plupart du temps, des pathologies sans anomalies structurelles du muscle cardiaque. Mais un des gènes du LQTS SCN5A a été associé à un phénotype structurel cardiaque. Les mutations T220I et D1275N [85, 86] dans ce gène sont responsables d'un phénotype regroupant cardiomyopathie dilatée, anomalies de la conduction intracardiaque, fibrillation auriculaire, et dysfonctions du noeud sinusal sans allongement du QTc. Il existe des phénotypes syndromiques complexes, avec des anomalies structurelles du muscle cardiaque associés à un QTc allongé, codés par d'autres gènes que les 13 gènes connus à ce jour, comme le gène DNAJC19 responsable syndrome « 3-methylglutaconic aciduria » [87].

Les cardiomyopathies sont des causes secondaires d'allongement de l'intervalle QTc, le QTc est très souvent allongé dans les cardiomyopathies dilatées, mais aussi dans le syndrome de Kawasaki et les myocardites. Les phénotypes de cardiomyopathies hypertrophiques sont associés à un prolongement de l'intervalle QTc, dépendant du degré d'hypertrophie cardiaque [88]. Les gènes impliqués sont différents des 13 gènes connus dans le LQTS.

Tableau I.III : Définition des phénotypes LQTS1, 2 et 3.

	LQTS1	LQTS2	LQTS3
Gène	KCNQ1	KCNH2	SCN5A
Fonction	Courant I_{ks} Les récepteurs Béta-sympathiques stimulent KCNQ1 pour raccourcir le temps du flux I _{ks} (donc la repolarisation) lorsque la fréquence cardiaque augmente.	Courant I_{kr} Pas de modification à l'effort du flux I _{kr} .	Courant I_{Na} Au repos: allongement du QT en particulier la nuit par bradycardie nocturne (fréquence cardiaque < 50/min).
Conséquences de la mutation	Diminution du courant I_{ks}. Les mutants KCNQ1 ne peuvent pas raccourcir leur temps de flux à l'effort du fait d'une diminution d'activité. Pas de raccourcissement de la repolarisation à l'effort donc allongement QTc à l'effort.	Diminution du courant I_{kr} par diminution de l'activité du canal KCNH2.	Augmentation du courant I_{Na} par augmentation d'activité du canal SCN5A.
Facteur déclenchant	Effort ++ (natation, plongée) stress émotionnel	Stress émotionnel ++ , Stimulation sonore soudaine, sommeil	Sommeil
Onde T sur l'ECG	Elargissement de l'onde T	Onde T de petite amplitude, souvent bifide	Intervalle QT isoélectrique suivie d'onde T étroite
ECG au début de l'arythmie	Pas de pause	Pause au début de l'arythmie	Non défini
Epreuve d'effort: ECG à l'effort	Pas de raccourcissement du QT à l'effort donc augmentation QTc	Pas de modification à l'effort. Allongement du QTc à la récupération.	Supranormal
Réponse aux bêta-bloquants	Bonne réponse	Bonne réponse mais inférieure au LQTS 1	Réponse incertaine

Le LQTS est un diagnostic difficile en raison de symptômes cliniques peu spécifiques, et de profils variables de l'ECG avec parfois des QTc sub-normaux. Ainsi, l'équipe de Schwartz a mis en place un **score de diagnostic clinique** permettant d'obtenir une probabilité pour le diagnostic clinique de LQTS, et ainsi d'orienter le patient vers un test génétique. Ce score n'est pas adapté pour orienter les membres de la famille des patients atteints d'un LQTS vers le test génétique. Du fait de la pénétrance incomplète des mutations dans le LQTS, un membre de la famille d'un patient atteint de LQTS peut être porteur de la mutation, sans présenter d'allongement de l'intervalle QTc ou de symptômes cliniques. De nombreuses études ont montré l'impossibilité à diagnostiquer un LQTS chez les membres de la famille,

uniquement sur la base des signes cliniques [8, 89]. Un premier score diagnostique, mis en place par l'équipe de Schwartz en 1985, utilisait des critères majeurs et mineurs simples [90] (*cf. appendice I.1*). Le score diagnostique actuel a peu changé depuis 1993 : il regroupe des critères liés à l'ECG, à l'histoire clinique du patient, et à l'histoire familiale (*cf. Tableau I.IV*) [91]. En 2006, le score de haute probabilité clinique de LQTS a été modifié de 4 à 3,5 pour augmenter la sensibilité du diagnostic [61]. En 2011, Schwartz et al. modifient le score diagnostique, en ajoutant l'allongement de l'intervalle QTc ≥ 480 ms à 4 min de la récupération d'une épreuve d'effort [65]. Ce dernier ajout permet d'augmenter encore la sensibilité du score diagnostique, en particulier pour les patients borderline avec des QTc limites qui s'allongeraient à l'effort dans les LQTS1 [92]. Il n'existe pas de critères sur les différences fines phénotypiques des différents LQTS, car la clinique peut être très variable, de même que l'aspect morphologique de l'intervalle QT et de l'onde T sur l'ECG [65].

Tableau I.IV : Score de diagnostic clinique actuel de Schwartz (2011) [65].

Paramètres ECG	Points
A-QTc [°]	
≥480ms	3
460-479ms	2
450-459ms (chez les hommes)	1
B-QTc [°] ≥480ms à la 4 ^{ème} min de récupération d'une épreuve d'effort	1
C-Torsades de pointes*	2
D-Ondes T en alternance	1
E-Ondes T pointues sur 3 dérivations	1
F-Fréquence cardiaque basse pour l'âge [@]	0,5
Histoire clinique	
A-Syncope*	
Induite par stress	2
Sans stress	1
B-Surdité congénitale	0,5
Histoire familiale	
A-Antécédent de membre de famille avec un LQTS [§]	1
B-Mort subite cardiaque inexpliquée chez un membre de famille immédiat <30 ans [§]	0,5

Tous les critères ECG sont, en l'absence de cause aiguë comme des médicaments, [°] calculé selon la formule de Bazett, *exclusif mutuellement, [@] sous le 2^{ème} percentile pour l'âge, [§] Pas de possibilité d'associer ces 2 items

Score ≤ 1 : basse probabilité ; 1,5 à 3 points : probabilité intermédiaire ; $\geq 3,5$ points : haute probabilité.

La prise en charge des patients atteints d'un LQTS suit les recommandations européennes et américaines, résumées en **appendice I.2 [93]**. Cette prise en charge associe certaines règles de vie, et en fonction de la gravité, une thérapeutique médicamenteuse, et l'implantation d'un défibrillateur ou d'un pacemaker. Il est nécessaire de remettre la liste des médicaments contre-indiqués qui peuvent être responsables d'une majoration de l'allongement du QTc à l'ensemble des patients. L'activité sportive est contre-indiquée ou restreinte à une activité non compétitive. La thérapeutique médicamenteuse est basée sur le traitement anti-arythmique, diminuant la survenue d'extrasystoles ; les médicaments de référence sont les bêta-bloquants. Le défibrillateur est un dispositif permettant le traitement arythmies ventriculaires sévères par un choc électrique endocavitaire. Le Pacemaker est un dispositif permettant la stimulation cardiaque. La conduite à tenir thérapeutique va dépendre du type de LQTS, et des facteurs déclenchants correspondant à chaque LQTS (*cf. Tableau I.III*). Ainsi, le génotype va aider à la décision thérapeutique. Pour les patients avec un LQTS1, l'activité sportive sera contre-indiquée alors qu'elle peut être tolérée dans les cas de LQTS3 en dehors du sport de compétition. Le traitement par les bêta-bloquants est très efficace dans le LQTS1, contrairement au LQTS2 et 3. En présence d'un LQTS2 et 3, on aura plus tendance à implanter un défibrillateur.

II-4 Le diagnostic génétique dans le LQTS :

Après un diagnostic clinique de LQTS chez un cas index, il est nécessaire de proposer au patient un diagnostic génétique. La prise en charge thérapeutique doit débiter avant l'obtention des résultats génétiques, du fait de la longueur de ces analyses. Le diagnostic génétique correspond à la recherche de variantes génétiques causales par séquençage des exons dans les gènes connus du LQTS, en général les 5 les plus fréquemment impliqués dans le LQTS, c'est à dire KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, et KCNE2. En deuxième intention, certains laboratoires vont rechercher des variantes dans 6 autres gènes : ANK2, KCNJ2, CACNA1C, CAV3, SCN4B et AKAP9 [8].

Selon les études, le pourcentage de génotypes positifs varie en fonction des critères retenus pour le diagnostic clinique et du nombre de gènes testés. Tester et al. ont retrouvé un génotype positif dans 50% des cas après séquençage des gènes KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNE2 chez 541 patients LQTS non apparentés [94]. Dans cette même étude, pour les patients avec un score diagnostique de Schwartz supérieur à 4, le pourcentage de génotype positif s'élève à 72 % [94].

Bai et al. ont décrit un génotype positif dans 64% des cas sur 309 patients diagnostiqués LQTS avec un $QTc \geq 470$ msec après séquençage de KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNE2 [95]. Napolitan et al.

ont retrouvé, sur une population de 430 patients, 72 % de génotypes positifs, après séquençage des 6 gènes les plus communs, cependant les critères diagnostiques de LQTS et la longueur du QTc ne sont pas clairement définis dans cette étude [96]. Une récente étude sur 855 patients, avec diagnostic de LQTS retrouve, pour les patients avec un $QTc \geq 476$ msec, un génotype positif dans 72 % des cas après séquençage des gènes responsables du LQTS1 à 12 [97]. Wenstenkow et al. ont mis en évidence (chez 20 patients sur 252) deux variantes parmi les gènes connus du LQTS pour un même patient, à l'origine de formes plus graves [98] [99].

Dans 30 % à 50 % de cas, le diagnostic génétique reste négatif pour les patients atteints de LQTS. Le diagnostic génétique négatif ne remet pas en cause le diagnostic clinique. Dans ces cas, la génétique ne peut pas guider la prise en charge du patient. De plus, l'enquête génétique familiale est impossible, empêchant une prévention et une prise en charge des membres de la famille asymptomatiques à risque de manifester des symptômes.

Par conséquent, l'objectif principal de ce mémoire est de pouvoir identifier d'autres gènes responsables du LQTS, et d'aider à la prise en charge de ces familles avec un génotype négatif à ce jour.

2- Matériels et Méthodes :

Le syndrome du QT long (LQTS) héréditaire est une maladie monogénique, prédisposant au développement de troubles du rythme ventriculaire à l'origine de syncopes et morts subites. Afin de mieux comprendre ce syndrome, nous avons étudié le phénotype de tous les patients atteints de LQTS suivis à l'institut cardiologique de Montréal (ICM).

À ce jour, 13 gènes, codant pour des canaux ioniques exprimés dans les cardiomyocytes et des protéines interagissant avec ces canaux, sont connus comme responsables du LQTS. Cependant, dans 30 à 50 % des cas de LQTS, aucun diagnostic génétique n'est établi après le séquençage de ces gènes, suggérant l'existence de gènes encore non identifiés. L'absence de diagnostic génétique est un véritable manque dans la pratique clinique, de par l'incertitude sur la conduite thérapeutique et l'impossibilité de mener une enquête génétique familiale.

Notre **premier objectif** est de préciser les caractéristiques de notre population par rapport à la littérature, et d'établir des relations entre le phénotype et le génotype.

Le **second objectif** est de comparer les phénotypes des patients avec un diagnostic génétique positif et ceux avec un diagnostic génétique négatif, afin d'établir la présence ou non de différences au niveau de l'expression clinique de la maladie.

Le **troisième objectif** est de mettre en évidence de nouveaux gènes et nouvelles variantes causales rares, par séquençage à haut débit de l'ensemble des exons pour les patients diagnostiqués LQTS de l'ICM, avec un génotype négatif après un séquençage classique des gènes connus.

2-1 Identification des patients « cas index » diagnostiqués LQTS à l'ICM :

L'identification des patients « cas index » diagnostiqués LQTS à l'ICM a été réalisée par l'utilisation des bases de données informatiques disponibles à l'ICM. Le patient « cas index » correspond au 1^{er} membre diagnostiqué LQTS à l'ICM au sein d'une famille. Chaque patient peut être suivi au sein d'une clinique de spécialité différente. Nous avons fait une recherche parmi les 3 cliniques susceptibles de suivre les patients atteints de LQTS : la clinique de génétique (pour tous les patients ayant eu une enquête génétique), la clinique de pacemaker/défibrillateur (pour tous les patients appareillés), et la clinique d'arythmie (en particulier en cas d'hospitalisations). L'identification des cas index a été faite par les mots-clés : « syndrome du QT long » ou « QT long » dans les bases de données informatiques

de chaque clinique. Nous avons effectué une recherche supplémentaire à travers la base de données des archives par ces mêmes mots clés.

L'objectif de cette identification était d'être exhaustif, malgré le risque d'obtenir des résultats redondants et des faux positifs pour le diagnostic. Une première lecture générale des observations cliniques permettait d'exclure le patient, si le diagnostic retenu était un autre que le LQTS. Certains patients consultent à la clinique génétique pour la recherche d'une variante retrouvée dans un autre centre de génétique chez un membre de leur famille. Dans ce cas, ils ne peuvent pas être considérés comme des cas index mais plutôt comme des membres de famille.

2-2 Recueil du phénotype des patients « cas index » diagnostiqués LQTS :

Le recueil des informations phénotypiques concernant les « cas index » est anonyme et rétrospectif par une évaluation des dossiers cliniques demandés auprès des archives de l'ICM, et s'effectue pour chaque patient.

La première étape est une relecture de l'ensemble des données d'un dossier clinique avec recueil de l'histoire de la maladie du patient, des antécédents personnels et familiaux, des événements cliniques, des hospitalisations, des diagnostics envisagés, des examens paracliniques réalisés et des traitements. Les ECGs disponibles dans le dossier sont examinés pour relever les intervalles QT et QTc (*l'ensemble des mesures ECGs ont été détaillées en introduction partie II-1*). La mesure du QT correspond à une moyenne de mesure sur 3 complexes différents (QTmoyen ou QTm). Le QTc (QT corrigé) est calculé par la formule de Bazett à partir du QTm et de l'intervalle RRm (moyenne du RR sur 3 complexes) : $QTc = QTm / \sqrt{RRm}$. L'ensemble des items est disponible en **appendice M.1**. Les données recueillies regroupent des données phénotypiques, génétiques, électrocardiographiques avec la mesure du QTc la plus longue à partir des ECGs disponibles, ainsi que le détail du score de diagnostic clinique de Schwartz (*cf. partie introduction*). À l'issue de cette collecte d'informations, un électrophysiologiste sénior (le Dr Talajic) a réévalué l'ensemble des données afin de confirmer les diagnostics de LQTS et d'exclure de l'étude les faux positifs.

Les patients avec un LQTS confirmé ont (1) soit un diagnostic génétique positif réalisé suite au diagnostic clinique de LQTS (génotype positif), (2) soit un diagnostic génétique négatif après recherche parmi les gènes connus (génotype négatif), ou un diagnostic génétique non effectué, mais une clinique et un score de Schwartz compatible avec le LQTS (score $\geq 1,5$ probabilité intermédiaire à élevée).

Les faux positifs ont un génotype négatif ou un diagnostic génétique non effectué, avec une clinique et un score de Schwartz définissant un diagnostic clinique peu probable de LQTS (score $< 1,5$).

2-3 Identification et recueil du phénotype des membres de famille des patients diagnostiqués LQTS :

L'identification des membres de famille a été faite par le biais du cas index, les membres de familles étant l'ensemble des individus apparentés génétiquement aux cas index diagnostiqués LQTS. Lors du diagnostic chez un cas index, l'ensemble des membres de la famille sont investigués cliniquement, et l'enquête génétique est proposée si la mutation familiale est connue, même en l'absence de signes phénotypiques.

Les dossiers-familles disponibles à la clinique génétique permettent d'identifier tous les membres de familles, chacun étant référencé à partir du nom du cas index. Ces dossiers regroupent les données cliniques principales et les investigations génétiques du cas index, et des différents membres de familles suivis. Un arbre familial génétique établit la relation entre chacun. Une fois les membres de familles identifiés, les dossiers cliniques ont pu être demandés aux archives pour l'évaluation. Le recueil des données phénotypiques suit le même protocole que pour les cas index.

2-4 Diagnostic génétique à l'ICM pour le LQTS :

Le diagnostic génétique à l'ICM pour le LQTS est proposé à chaque cas index après un diagnostic clinique de LQTS. Ces patients sont orientés vers la clinique génétique pour l'exploration génétique. Le laboratoire clinique de biologie moléculaire de l'ICM séquence, par la méthode classique de type Sanger, l'ensemble des exons, des régions UTR, et des régions introniques adjacentes aux exons des gènes les plus fréquemment responsables du LQTS : KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, et KCNE2. Dans certaines circonstances où le phénotype orientant vers un LQTS de type 7, le gène KCNJ2 est également séquencé. Chaque variante mise en évidence est classée pour évaluer son pouvoir causal en catégorie 1 à 6. La catégorisation est détaillée en *appendice M.2*. Seules les variantes avec un pouvoir causal (catégorie 1 à 4) sont retenues comme étant responsables de la maladie. Un génotype positif est défini par une variante causale dans un des 5 gènes, ou du gène KCNJ2 en cas de phénotype particulier. Un génotype négatif est caractérisé par l'absence de variante causale dans les 5 gènes. Pour l'enquête génétique des membres de famille, le laboratoire va seulement rechercher la mutation mise en évidence chez le cas index.

2-5 Critères d'inclusions et d'exclusions pour l'étude phénotypique des patients diagnostiqués LQTS :

Les critères d'inclusions dans l'étude phénotypique sont les patients suivis à l'ICM, avec un diagnostic confirmé de LQTS. Ce diagnostic confirmé est défini soit par un génotype positif, soit par un génotype négatif ou non effectué, avec une clinique et un score de Schwartz compatible avec le LQTS (score \geq 1,5). Les membres de la famille des patients suivis à l'ICM, répondant aux critères d'inclusions ci-dessus, sont inclus dans l'étude.

Les critères d'exclusions sont les patients identifiés comme faux positifs pour le diagnostic de LQTS. Le diagnostic de faux positif pour le LQTS est défini par un génotype négatif ou non effectué, avec une clinique et un score de Schwartz définissant un diagnostic clinique de LQTS peu probable (score $<$ 1,5).

2-6 Critères d'inclusions et d'exclusions pour l'étude génétique par séquençage à haut débit de l'ensemble des exons :

Les patients inclus dans l'étude génétique sont suivis à l'ICM et présentent un diagnostic confirmé de LQTS après revue des données cliniques, un score de Schwartz de probabilité intermédiaire ou élevé (score \geq 1,5), et un diagnostic génétique négatif après séquençage des 5 gènes (+/-KCNJ2) du LQTS à l'ICM. Le critère d'inclusion pour les membres de la famille est d'être apparenté génétiquement à un patient répondant aux critères d'inclusions ci-dessus. Un diagnostic génétique positif ou le refus de participer à l'étude sont des critères d'exclusions.

Le recrutement des patients cas index s'est déroulé lors d'un entretien individuel à la clinique génétique, nécessitant un déplacement volontaire du patient. L'entretien individuel comportait : l'explication de l'étude, le consentement au projet et la signature du formulaire de consentement (*appendice M.3 : formulaire de consentement des cas index*). À l'issue de cet entretien, en cas de consentement à participer à l'étude, un prélèvement sanguin a été réalisé. L'identité de chaque participant a été codée pour garder l'anonymat des analyses génétiques. Nous n'avons pas contacté directement les membres de la famille, mais les cas index recrutés dans l'étude avaient le choix de proposer l'étude à leurs apparentés. Ceux qui étaient intéressés ont pris contact avec la clinique génétique pour un entretien individuel (*appendice M.4 formulaire de consentement des membres de familles*). Les patients avaient le choix d'être informés ou non de leurs résultats génétiques.

2-7 Analyses phénotypiques des patients diagnostiqués LQTS à l'ICM et des membres de leurs familles :

Nous avons procédé à plusieurs analyses à partir du recueil des données sur les cas index et leurs membres de famille. Les premières analyses portent sur les cas index diagnostiqués LQTS avec un génotype positif, négatif, ou non investigué. Les phénotypes des cas index avec un génotype positif et ceux avec un génotype négatif sont comparés par t-test (pour les moyennes), chi-carré test (pour les variables nominales), et test de Fisher (pour des valeurs inférieures à 5), en utilisant le seuil de significativité $p < 0,05$. L'objectif est de connaître la présence ou non de différences au niveau de l'expression clinique de la maladie entre les patients avec un génotype positif, et ceux avec un génotype négatif.

Les analyses suivantes portent sur les membres de la famille des cas index diagnostiqués LQTS. Pour chaque famille, nous évaluerons le nombre de membres avec un diagnostic génétique positif ou négatif, et les phénotypes de ces membres de famille. L'évaluation phénotypique des membres de famille n'a été possible qu'en cas de données médicales suffisantes.

Nous avons étudié l'ensemble des cas index et des membres de familles avec un diagnostic génétique positif pour évaluer les relations entre le phénotype et le génotype, en particulier la relation entre la gravité du phénotype et le pouvoir causal attribué à la mutation par le laboratoire (*appendice 2 : catégorisation des mutations*).

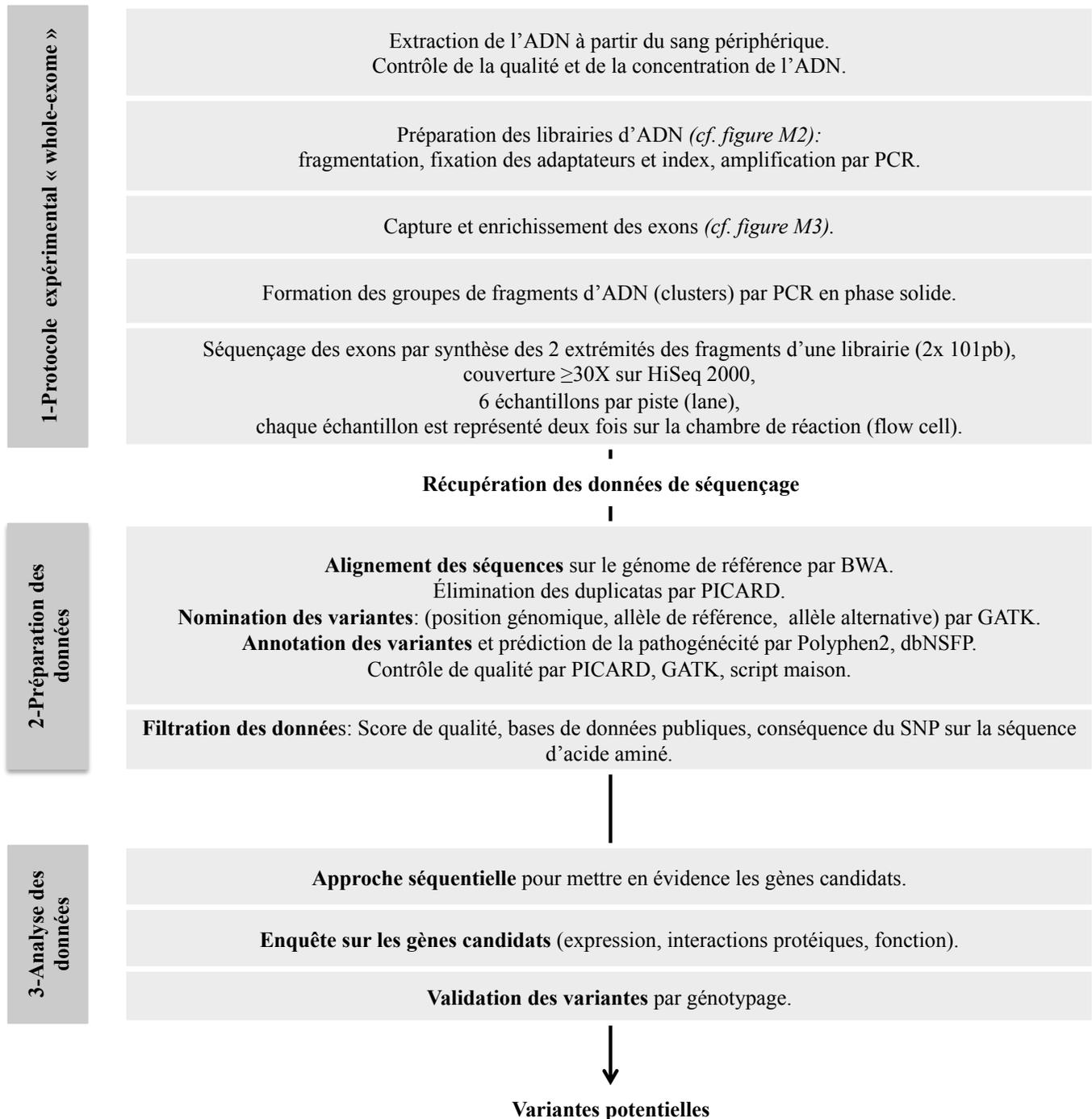


Figure M.1 : Plan de l'étude de séquençage à haut débit de l'ensemble des exons

L'objectif est d'identifier de nouveaux gènes et variantes potentiels, responsables du LQTS chez les patients avec un génotype négatif. Le protocole est divisé en 3 étapes : partie expérimentale, partie préparation des données et analyses de données.

2-8 Protocole expérimental de séquençage à haut débit de l'ensemble des exons par HiSeq2000 :

Le protocole expérimental de séquençage à haut débit de l'ensemble des exons regroupe la préparation des librairies, l'enrichissement en exons, et le séquençage par HiSeq2000 résumés dans *la partie 1 de la figure M.1*. Les mots avec une astérisque* sont définis en *appendice M.4*.

Après extraction des ADNs à partir du sang périphérique, nous avons estimé leurs qualités par Agilent 2100 Bioanalyser (protocole Agilent DNA 1000) et mesuré leurs concentrations par PicoGreen.

Les librairies d'ADNs sont préparées selon le « **Protocole Low Throughput d'Illumina** » pour HiSeq2000, décrit dans *la figure M.2*, avec le kit « TruSeq DNA sample preparation V2 ». Les index ou adaptateurs* sont liés aux extrémités 3' et 5' des fragments d'ADNs pour identifier les séquences d'un individu. Les librairies sont amplifiées par PCR, mais avec seulement un quart de la quantité d'ADN conseillée par illumina afin de diminuer le taux de duplicatas. La qualité et la concentration des librairies sont mesurées respectivement par Agilent 2100 Bioanalyser (protocole « Agilent High Sensitivity DNA Assay ») et par Picogreen. Les librairies sont regroupées par groupes de 6 librairies.

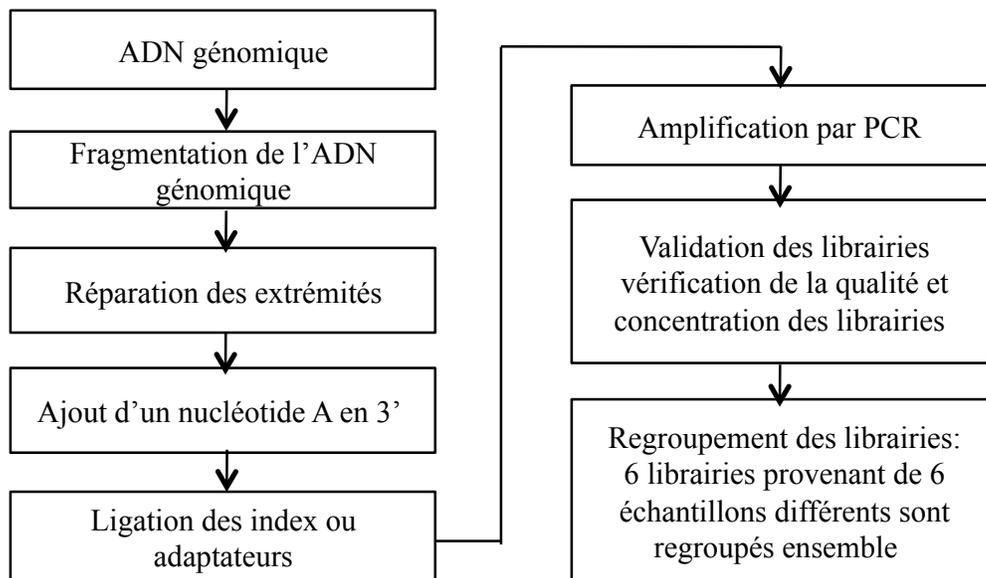


Figure M.2 : Préparation de librairies selon le protocole « Low Throughput » d'Illumina pour HiSeq2000.

L'enrichissement en exons sélectionne l'ensemble des exons par des sondes complémentaires prédéfinies selon le « **Protocole Truseq exome enrichment d'Illumina** », décrit dans la *figure M.3*.

Le kit « Truseq exome enrichment » d'Illumina, formé sur le génome humain de référence NCBI37/hg19, contient les sondes pour sélectionner plus de 200 000 exons, les régions UTR, et les promoteurs pour 20 794 gènes. Après une amplification par PCR, les concentrations des librairies d'ADNs sont évaluées par qPCR.

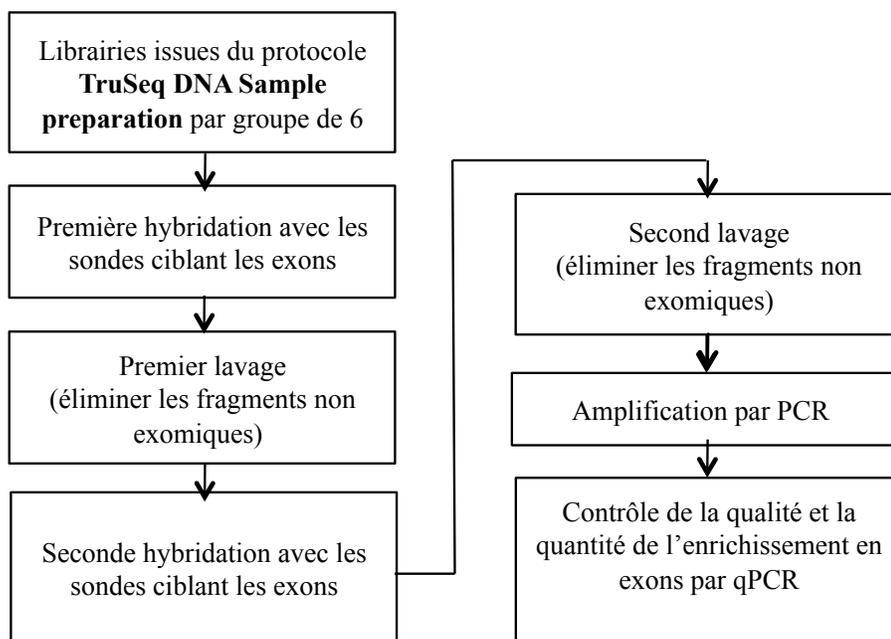


Figure M.3 : Enrichissement en exons selon le protocole « Truseq exome enrichment » d'Illumina pour HiSeq2000.

Pour le séquençage, les librairies d'ADNs et les réactifs sont préparés selon les protocoles « **Truseq PE Cluster kit V3** » et « **Truseq SBS Kit V3 (200 Cycles) Reagent preparation guide** ». Un appareil fourni par Illumina nommé c-bot va disposer de manière automatique les échantillons sur la chambre de réaction* (« flow cell»), chaque groupe de 6 échantillons est représenté deux fois sur 2 pistes (« lanes ») différentes. Les groupes de fragments d'ADN* (« clusters») sont générés à partir d'un brin d'ADN par la technique de PCR en ponts sur la chambre de réaction.

HiSeq2000, plateforme de 2nd génération, permet un séquençage par synthèse à partir des 2 extrémités d'un fragment d'ADN 2×101bp* (« paire-end ») avec 1000 millions de lectures par série d'expériences (« run ») [4, 100]. Le choix de la plateforme HiSeq2000 est lié à sa disponibilité et aux bons résultats antérieurs à l'ICM.

Nous avons utilisé le « First base report *» généré dès la première série d'expériences, et les données générées par le logiciel « Sequencing Analysis viewer *» comme contrôle du bon déroulement des premières étapes du séquençage. Nous n'avons pas utilisé le contrôle PhiX174 car il n'est pas indispensable pour nos analyses ultérieures.

2-9 Alignement des séquences, nomination, annotation et filtration des variantes :

La préparation des données issues du séquençage comprend l'alignement des séquences, de même que la nomination, l'annotation et la filtration des variantes résumées dans *la partie 2 de la figure M.1* et décrits ci-dessous.

L'alignement par le logiciel « Burrows-Wheeler Alignment tool » (BWA) [101] est une étape importante. Comme les séquences générées par HiSeq2000 sont courtes (environ 100bp), il est nécessaire de lier ces séquences entre elles pour analyser le génome de chaque individu. Ceci est réalisé en alignant les courtes séquences de chaque individu sur le génome de référence.

Notre projet est basé sur la version Hg.19 du génome de référence. Le logiciel BWA accepte les fichiers FASTQ, format de fichiers comprenant les séquences nucléiques et les scores de qualités associés, et donne ses résultats dans un fichier BAM (Binary Alignment Map Format). Le logiciel BWA correspond à celui offrant le meilleur compromis entre le temps d'alignement nécessaire et le taux d'erreurs [101].

Lors de la préparation des bibliothèques et de l'enrichissement en exons, l'amplification par PCR peut être à l'origine de duplicatas. Il est important, après l'alignement, d'éliminer ces séquences dupliquées, car elles influencent la fréquence allélique. Pour cela, nous avons utilisé le logiciel PICARD. Le logiciel GATK (« Genome Analysis Toolkit ») [46, 102] va analyser les fichiers BAM issus de BWA, et procéder à un réalignement local plus fin en particulier au niveau des délétions ou insertions. Une recalibration du génome est réalisée à partir du score de qualité des bases (Qscore). Le séquenceur Illumina donne un score empirique d'environ Q25 ; en recalibrant, GATK va permettre de détecter les zones avec un score inadapté.

La nomination des variantes ou « variant calling » est réalisée en comparant les séquences nucléotidiques des génomes de nos échantillons au génome de référence. Le logiciel GATK définit (1) le type de variante, soit des SNPs (polymorphismes nucléotidiques), soit des indels (insertions et délétions), ou des SV (Variation Structurale), ainsi que (2) les paramètres correspondant à leur position

chromosomique, à l'allèle de référence et l'allèle alternatif pour chaque SNP. À la fin, le logiciel donne un score de qualité qui va déterminer si la variante est une « vraie variante », ou une « variante secondaire à une erreur de séquençage ». Seules les variantes avec un score de qualité élevé sont conservées. Le fichier généré par GATK est un fichier classique VCF (« Variant Call Format ») regroupant toutes les variantes mises en évidence après l'alignement. Les analyses suivantes sont concentrées uniquement sur les SNPs, car la sensibilité et la spécificité du séquençage à haut débit sont encore mauvaises pour la détection des indels et des SV.

L'annotation des variantes est réalisée par un script maison regroupant plusieurs informations :

- (1) le gène,
- (2) le nom du SNP (si le variant est déjà répertorié dans les bases de données publiques (rs#)),
- (3) la fréquence du SNP dans les bases de données publiques dbSNP138*, 1Kgenome*, HapMap* et ESP6500*,
- (4) l'impact du changement nucléotidique au niveau de l'acide aminé soit un SNP synonyme, soit un SNP non-synonyme à l'origine d'une modification faux-sens, non-sens, ou d'une modification des zones d'épissages,
- (5) l'identification du changement de la séquence protéique,
- (6) le code de l'individu ou les codes des individus porteurs du SNP.

La prédiction de la pathogénicité des SNPs non-synonymes en terme de retentissement sur la fonction protéique est obtenue à partir de deux bases de données publiques: Polyphen2 [103] et dbNSFP (database for non synonymous SNPs' fonctionnal predictions) [104]. dbNSFP est une compilation de quatre algorithmes de prédiction (*cf. tableau M.I*) : soit (1) polyphen2, (2) SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) [105], (3) LRT (Likelihood Ratio Test) [104], et (4) Mutation Taster [106] ainsi que de deux scores de conservation (1) PhyloP et (2) GERP (Genomic Evolutionary Rate Profiling)[107]. La plupart des algorithmes utilisent l'homologie de séquence qui représente une analyse de la conservation d'un acide aminé parmi les espèces ; l'hypothèse est basée sur le fait que les positions fonctionnellement importantes sont conservées lors de l'évolution, et que la substitution de celles-ci peut d'autant plus affecter la fonction de la protéine.

Tableau M.I : Les différents algorithmes de dbNSFP.

Algorithme	Méthodologie de l'algorithme	Prédiction de l'effet du SNP non synonyme sur la fonction protéique selon les algorithmes
SIFT	Homologie de séquence (conservation parmi les espèces)	Effet dommageable « D » score < 0,05 Effet neutre « T » score > 0,05
LRT	Homologie de séquence (conservation parmi les mammifères placentaires)	Effet délétère Effet neutre
Mutation Taster	Analyse de la conservation de séquence, des sites d'épissages, des possibles pertes des caractéristiques de la protéine, et de la quantité d'ARNm	Effet délétère automatique (codon STOP) Effet délétère Effet neutre Polymorphisme automatique
Polyphen2	Analyse de séquence (homologie, alignement...) et de structure de l'aa modifié.	Effet délétère, score >0.85, Effet possiblement délétère, score entre 0,85 et 0,15 Effet bénin, score <0,15
PhyloP	Analyse de la conservation des loci à travers les espèces	SNP conservé score >0,95 SNP non conservé score <0,95
GERP		SNP conservée score >5,82 SNP non conservé score <5,82

La filtration des variantes est faite en trois étapes majeures :

- (1) La première étape vise à conserver seulement les SNPs ayant un score de qualité et un niveau de couverture élevé.
- (2) La deuxième étape consiste en l'élimination des variantes communes telles que celles retrouvées dans les bases de données publiques : dbSNP138, 1Kgenome, HapMap et ESP6500. Le LQTS est une maladie rare (prévalence de 1/2500), avec une très haute hétérogénéité génétique familiale. Les variantes connues sont principalement des variantes privées, sauf pour certains gènes plus fréquemment responsables du LQTS comme KCNQ1, KCNH2, et SCN5A. Dans notre étude, nous recherchons donc principalement des variantes dans des gènes encore inconnus, et donc avec une forte probabilité d'être des variantes privées. C'est pour cette raison que nous avons choisi d'éliminer tous les SNPs présents dans les bases de données publiques.

(3) La troisième étape est de conserver seulement les variantes affectant la séquence d'acides aminés, telles les variantes faux-sens, non-sens, ou modifiant les zones d'épissages. Les variantes synonymes sont éliminées ainsi que les variantes des régions 3' et 5' UTR.

Les logiciels utilisés lors de ces étapes génèrent des paramètres de contrôles de qualité (*cf. tableau M.II*).

Tableau M.II : Paramètres de contrôles réalisés par les différents logiciels.

PICARD	Nombre de lectures brut par échantillon Taux de duplication
GATK	Estimation de la taille de la librairie Moyenne de couverture: pourcentage de bases avec une couverture supérieure à 20x
SCRIPT MAISON	Estimation de l'efficacité de l'enrichissement en exons: proportion des séquences lues correspondant aux régions ciblées

2-10 Identification, validation et caractérisation des nouveaux gènes et variantes impliqués dans le LQTS :

L'identification de nouveaux gènes impliqués dans le LQTS se fait selon une approche par gènes candidats en 3 étapes séquentielles décrites dans la *figure M.4*.

La première étape se concentre sur les variantes dans les gènes connus du LQTS1 à 13. Pour les gènes séquencés lors de l'évaluation génétique en clinique, nous ne devrions pas retrouver de variantes chez les individus. Pour les gènes connus, mais non séquencés en clinique, on recherche si toute nouvelle variante identifiée a été répertoriée dans les bases de données publiques telles que (1) LVOD database [98] (données disponibles pour LQTS 1 à 12), (2) Gene Connection for the Heart, base de données italienne et new-yorkaise (données disponibles pour les gènes du LQTS 1 à 10), ou publiée dans la littérature à travers pubmed.

La deuxième étape consiste en l'énumération des variantes dans les gènes de régions génomiques associées aux extrêmes de la variation normale de l'intervalle QT, provenant de 2 études d'associations pangénomiques ou « GWAS » (Genome Wide association Studies): QTSCD [108] et QTGEN[109]. Il existe une variation de l'intervalle QT dans la population générale entre 350 à 450msec pour les hommes, et 360 à 460msec pour les femmes définissant les limites d'un intervalle QT normal. Les

études QTSCD et QTGEN ont identifié des variantes communes associées aux valeurs extrêmes des intervalles QTc dans une population générale. Shah et al. [99] soulignent que l'on peut relier le LQTS monogénique, avec le caractère complexe du trait d'« allongement du QT », déterminé par de nombreux loci. Des variantes rares dans les gènes des régions identifiées pourraient ainsi être responsables du LQTS. L'étude **QTSCD** [108] met en évidence 10 loci indépendants détaillés en *appendice M.5*, définis par 10 SNPs montrant une association forte avec l'allongement du QTc. Quatre de ces loci correspondent à des gènes déjà associés au LQTS : SCN5A, KCNH2, KCNQ1, KCNJ2. L'étude **QTGEN** [109] met en évidence 9 loci indépendants détaillés *en appendice M.5*. Pour ces 2 études, les loci sont pour la plupart les mêmes.

La troisième étape est l'étude de gènes spécifiques déterminés suite à l'analyse de l'ensemble des variantes. Plus spécifiquement, nous nous sommes concentrés sur les gènes dans lesquels une même variante ou plusieurs variantes différentes sont retrouvées dans le même gène chez plus d'un individu. La présence d'une même variante rare chez plus d'un individu oriente vers la possibilité d'un gène candidat, d'autant plus que les membres de notre population sont principalement d'origine canadienne française.

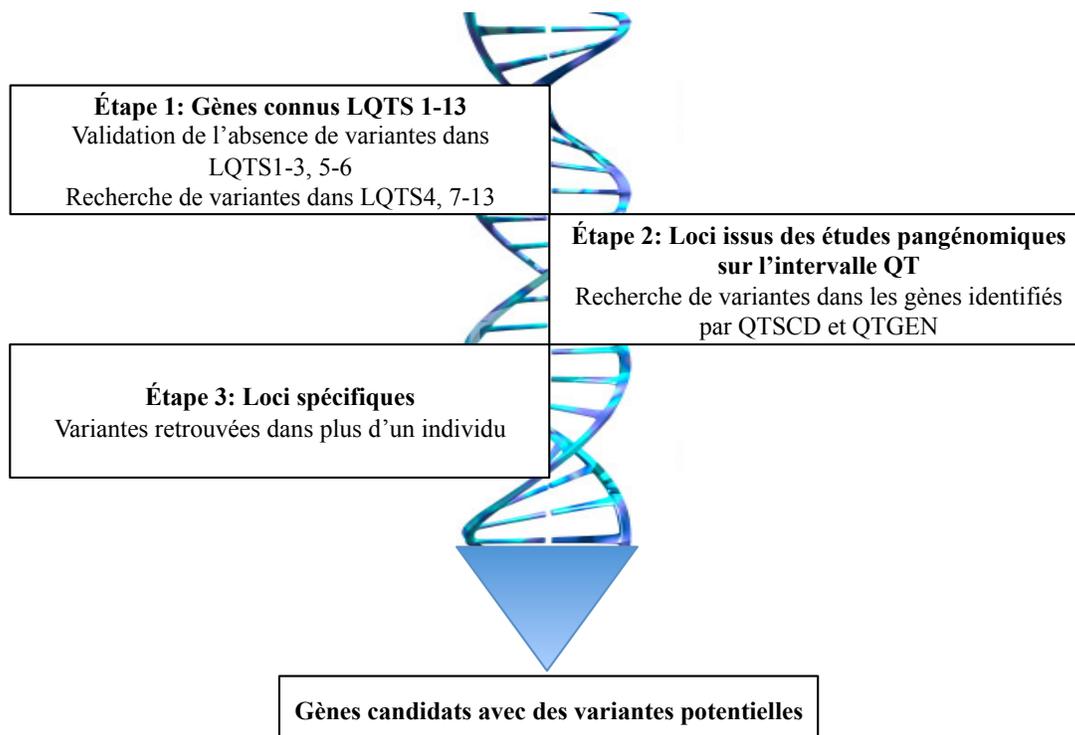


Figure M.4 : Les différentes étapes de l'analyse séquentielle pour l'identification de gènes candidats

La validation des nouvelles variantes identifiées par séquençage à haut débit a été réalisée par génotypage ciblé, en utilisant la plateforme Sequenom Mass Array. Le génotypage est réalisé pour les variantes des gènes candidats dans l'ensemble des individus recrutés pour le séquençage haut débit, les membres de familles, et 540 contrôles (270 contrôles d'origine canadienne francophone et 270 d'origine canadienne anglophone de la région de Toronto). Les oligos utilisés pour le génotypage sont synthétisés par l'entreprise « Integrated DNA Technologies ». Les SNPs sont génotypés par groupes de 25 à 36 d'après le modèle du logiciel « AssayDesigner v.3.1 ».

Les conditions de validation pour une variante sont (1) la mise en évidence de cette variante chez le même individu par génotypage afin d'éliminer les erreurs du séquençage à haut débit, et (2) l'absence de cette variante dans les individus contrôles après génotypage pour éliminer les polymorphismes communs.

La caractérisation des gènes candidats suit deux étapes principales :

La première étape a pour objectif de nous guider sur la probable implication de ces gènes candidats dans le LQTS. Nous avons effectué pour chacun de ces gènes une **recherche à travers la littérature et les bases de données publiques détaillées dans le *tableau M.III***. Cette étape a pour objectif, dans les limites des données déjà connues, de mieux comprendre la fonction du gène candidat, en évaluant son niveau d'expression tissulaire (BioGPS[110], TIGER[111]), ses interactions protéiques, les phénotypes connus liés à des mutations connues dans ce gène, les phénotypes de modèles animaux existant pour ce gène, et les voies de signalisation potentiellement impliquées pour ce gène.

La deuxième étape est l'étude systématique de l'expression tissulaire dans un panel de tissus humains de tous les gènes candidats identifiés par des variantes génétiques dans notre étude. Le premier objectif est de déterminer l'expression cardiaque de ces gènes. Le deuxième est de réaliser une comparaison de l'expression de ces gènes dans les différents tissus humains, en particulier pour savoir si son expression est spécifique au cœur. Le troisième objectif de cette étude est de déterminer dans quels modèles cellulaires les gènes sont exprimés, pour les futures études fonctionnelles. L'expression tissulaire de l'ARN des gènes candidats est étudiée par hybridation avec une micropuce d'ADN sur-mesure, synthétisée par la compagnie Agilent. La micropuce est personnalisée par des sondes d'oligonucléotides indépendantes pour chaque exon des gènes candidats de notre étude. L'expression des gènes est testée dans un panel d'ARNs totaux de différents tissus humains et de lignées cellulaires : moelle épinière, cœur, muscle squelettique, utérus, foie, foie fœtal, rate, thymus, prostate, cerveau,

poumon, intestin grêle, colon, HTC15, HT29, Caco, Caco différenciées, HEK, K562, JURKAT, JURKAT différenciées (6h), HL60, THP1, et THP1 différenciées. Un échantillon d'ARN de référence est inclus correspondant à un mélange égal de 10 tissus humains. Avant de commencer l'expérience, il est nécessaire d'évaluer la quantité et la qualité d'ARN par Agilent 2100 Bioanalyzer en utilisant le kit «RNA Nano 6000 kit» (Agilent Technologies). La technologie Agilent évalue le RIN (« RNA integrity number »), reflet de l'intégrité de l'ARN total des échantillons, le seuil de RIN retenu pour cette expérience est de 7. Les ARNc (ARN complémentaires) sont synthétisés à partir des ARNs totaux en utilisant le kit « Low Input Quick Amp WT labelling » selon le protocole décrit par Agilent. La qualité et la quantité des ARNc sont mesurées par spectrophotomètre « Nano Drop UV-VIS ». Les ARNc sont hybridés avec les sondes spécifiques fixées sur la micropuce d'expression selon le protocole d'Agilent. L'hybridation de l'ARNc aux sondes spécifiques d'un gène témoigne de l'expression de ce gène dans le tissu d'où provient l'échantillon d'ARNc. La micropuce est ensuite scannée par le « Sure Scan Microarray Scanner » pour détecter les hybridations. La valeur d'expression d'un gène est obtenue en calculant la moyenne géométrique d'expression, et la déviation standard de toutes les sondes à l'intérieur d'un gène à partir d'au moins 3 mesures indépendantes pour chaque tissu. La médiane de normalisation de l'ensemble des gènes testés dans la micropuce est calculée pour réduire les variations artéfactuelles, et permettre de mettre l'emphase sur les variations biologiques.

Tableau M.III : Outils utilisés pour évaluer un rôle potentiel dans le LQTS.

Vue d'ensemble	GeneCards http://www.genecards.org/
Fonction	Unitprot http://www.uniprot.org/
Expression	Niveau ARN BioGPS http://biogps.org/#goto=welcome TIGER http://bioinfo.wilmer.jhu.edu/tiger/ GEO Gene Expression Omnibus http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/ Niveau protéique Protein Atlas http://www.proteinatlas.org/
Interactions protéiques	STRING http://string-db.org/ BOND http://bond.unleashedinformatics.com/ UniHi http://193.136.227.168/UniHI/pages/unihiSearch.jsf Gene distilller2 http://www.genedistiller.org/
Phénotype connu	OMIN http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim Genopedia http://hugenavigator.net/HuGENavigator/startPagePedia.do
Littérature	Pubmed/NCBI
Modèles animaux	Souris: Mouse Genome Informatics http://www.informatics.jax.org/ et Genepaint http://genepaint.org/Frameset.html Zebrafish: ZFIN http://zfin.org/
Voies de signalisation	GSEA http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp KEGG http://www.genome.jp/kegg/

3-Résultats :

3-1 Identification des patients diagnostiqués LQTS à l'ICM et sélection de la population pour l'étude de séquençage à haut débit :

3-1-1 Identification des patients diagnostiqués LQTS à l'ICM :

Une première recherche exhaustive des dossiers de l'ICM a identifié 61 cas index potentiels de LQTS, répertoriés dans les bases de données en Octobre 2011. Après la révision des dossiers médicaux, 11 d'entre eux n'ont pas été retenus pour notre étude devant des faux diagnostics de LQTS (*cf. Figure R.1*). Au total, 50 cas index avec un diagnostic de LQTS confirmé ont été retenus. Parmi ceux-ci, 27 montrent un génotype positif (54%), 17 montrent un génotype négatif (34%), et 6 n'ont pas reçu d'évaluation génétique (12%).

Parmi les patients ayant eu une recherche génétique, le pourcentage de génotype positif est de 57% après séquençage des 5 gènes les plus fréquemment impliqués dans la maladie (KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, et KCNE2), et de 61% lorsque le gène KCNJ2 est inclus dans l'évaluation génétique basée sur l'orientation clinique. Ces résultats sont comparables à ceux de la littérature, avec un pourcentage de génotype positif de 50 à 64% après séquençage des 5 gènes (KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, et KCNE2) [94, 95]. La réparation des gènes impliqués dans les LQTS pour les patients de l'ICM est globalement comparable à celle décrite dans la littérature. Les variantes de KCNQ1 et KCNH2, les plus fréquemment observées dans notre population de patients, correspondent aux résultats décrits de la littérature [8].

Cependant, un nombre relativement important de patients avec des mutations rares dans SCN5A, KCNE2, et KCNJ2, sont mis en évidence par rapport à ceux porteurs de mutations KCNQ1 et KCNH2. Les variantes identifiées dans les gènes SCN5A, KCNE2 et KCNJ2 sont différentes pour chaque patient. Le séquençage de KCNJ2 a été réalisé pour ces 2 patientes devant un phénotype suggestif de syndrome d'Andersen Tawil (*cf. figure R.1*).

Certains patients présentent des mutations multiples soit 2 mutations retrouvées de manière non attendue, après le séquençage classique des 5 gènes les plus impliqués dans le LQTS; pour l'un KCNH2 p.Leu955Val et KCNE1 p.Asp85Asn, et pour l'autre KCNQ1 p.Ile567Thr et SCN5A p.Ser1787Asn. Le laboratoire a retenu la causalité des deux mutations après évaluation dans la littérature, et ségrégation du phénotype dans la famille lors de la présence des 2 mutations.

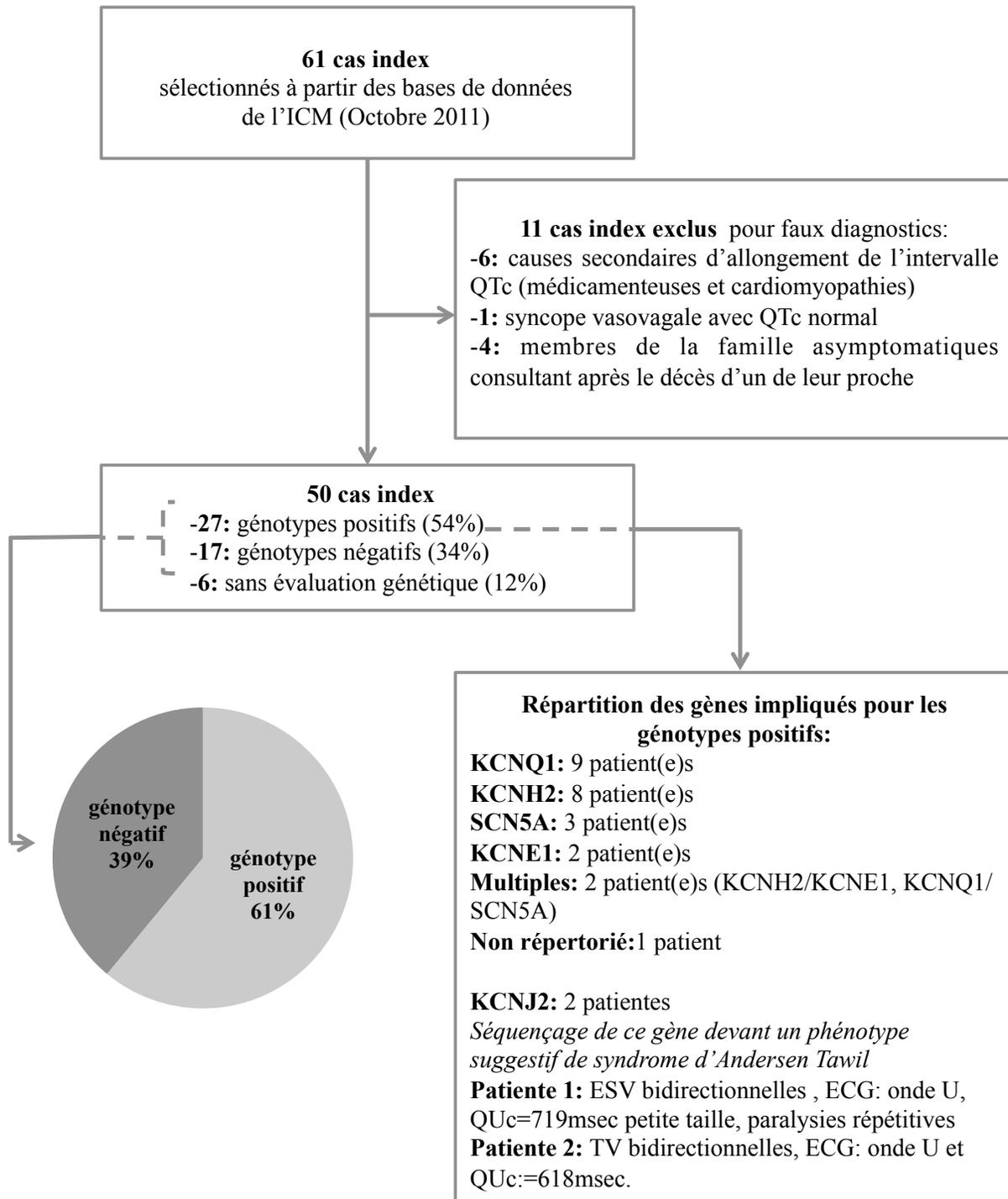


Figure R.1 : Identification des patients « cas index » diagnostiqués LQTS à l'ICM.

Les données phénotypiques pour les 50 cas index sont regroupées dans le **tableau R.1**. La moyenne d'âge des cas index en Octobre 2011 (au moment du recueil des données) est de 44 ans (médiane=41 ans). Un grand nombre d'individus ont été diagnostiqués à l'âge adulte. La prédominance féminine de 72 % dans notre étude est comparable aux données d'une étude de 1998 sur 479 individus [66].

Vingt cinq des cas index avec un diagnostic de LQTS (soit 50% des cas) ont une histoire familiale rapportée de symptômes, pouvant être associés au LQTS.

Dans notre population, 5 patients présentent des longueurs normales d'intervalles QTc, mais respectent les critères d'inclusion de diagnostic de LQTS avec un score de Schwartz définissant une probabilité intermédiaire à élevée de LQTS (*cf. Tableau R.1*).

Dans notre étude, 90% des patients ont un intervalle QTc allongé, avec 62% montrant un QTc >480msec (31 cas index sur 50) et 28% (14 cas index sur 50) présentant un QTc entre 460 et 479 msec. En comparaison, dans la cohorte de Tester et al., 46% des patients présentent un QTc >480msec [94].

Un certain nombre de patients (soit 18%) présentent des symptômes autres que les symptômes classiques (syncope, torsades de pointe), telles des arythmies de type extrasystoles ventriculaires (ESV), et tachycardies ventriculaires non soutenues, pouvant provoquer des palpitations et des lipothymies.

Dans notre population, 8 patients (16%) sont asymptomatiques. L'allongement de l'intervalle QTc a été découvert de façon fortuite par des ECGs de routine ou de suivi. Les 8 ont un génotype positif pour le LQTS. Ces 8 patients sont de sexe féminin, la moyenne d'âge est de 41 ans, et seulement 3 ont moins de 30 ans. L'absence de symptômes avant l'âge de 18 ans diminue le risque d'évènements cardiaques graves plus tardifs, mais ces patientes, en particulier celles de moins de 30 ans, restent tout de même à risque.

Tous les patients LQTS de notre population ont une probabilité « intermédiaire à élevée » selon le score de diagnostic de Schwartz, sauf pour les 2 patientes avec un LQTS7. Sur nos 50 patients, 44 patients (dont les 8 asymptomatiques) sont traités par Béta-Bloquants (BB-). Un défibrillateur a été posé chez 21 patients, les indications sont décrites dans le tableau R.1.

Tableau R.I : Phénotype des cas index diagnostiqués LQTS à l'ICM.

Caractéristiques :		
Nombre de cas index	50	
Moyenne d'âge	44	
Minimum-Maximum (âge)	17-79	
Médiane	41	
Sexe (féminin/masculin) (%)	36 (72%) /14 (28%)	
Histoire familiale (%)	25 (50%) soit: -7 (14%): apparenté avec un LQTS clinique défini par un SD>3,5 -18 (36%): antécédent de mort subite dans la famille 1 ^{er} ou 2eme degré.	
Moyenne âge de diagnostique	36	
Minimum-Maximum (âge) /	1-79	
Médiane	33,5	
Phénotype :		
QTc≥480 msec	31 (62%)	
	QTc allongé*	QTc normal**
Répartition (%)	45 (90%)	5 (10%)
Syncope (avec TdP°)	14 (5)	3 (1) soit: -1: LQTS7, mutation dans KCNJ2 -1: suspicion LQTS 7, génétique en cours. - 1:TdP° à répétition, QTc allongés mais ECG non disponibles à l'ICM (non pris en compte pour des raisons méthodologiques)
Arrêt cardiaque (avec TdP°)	5 (2)	
Arrêt cardiaque et syncope (avec TdP°)	6 (1)	1: mutations KCNH2 et KCNE1
Palpitations / ESV§/ TVNS§ / TV§ bidirectionnelle/ lipothymie	9	1: LQTS 7, mutation dans KCNJ2
TdP° non ressentie	3	
Asymptomatique	8 (1:ACFA)	
Traitement :		
Béta-bloquants (%)	44 (88%)	
Défibrillateur (%)	21 (42%)	
Indications des défibrillateurs	11: arrêt cardiaque récupéré 8: syncopes sous traitement béta-bloquants 1: TVNS répétitives/ 1: TdP non ressenties	
Pas de traitement (%)	3 (6%) 1: traitement anti-arythmique autre , 1: défibrillateur sans traitement, 1: pas d'informations sur le traitement.	
Score Diagnostique de Schwartz (SD):		
SD<ou égal à 1 probabilité basse de LQTS	2 (2: LQTS 7) (4%)	
SD> 1 à 3 probabilité intermédiaire de LQTS	24 (48%)	
SD≥3.5 haute probabilité de LQTS	24 (48%)	

° TdP: Torsades de pointes

* QTc allongé correspond à un QTc ≥460msec pour les femmes ou ≥450msec pour les hommes

**QTc normal correspond à QTc<460msec pour les femmes et <450msec pour les hommes

§ ESV : Extrasystole ventriculaire, TVNS=Tachycardie ventriculaire non soutenue, TV : tachycardie ventriculaire

Après le diagnostic de LQTS chez le cas index, une enquête familiale est mise en place. Seulement 12 cas index sur les 27 ayant un génotype positif ont eu une enquête familiale, soit seulement 44%. Nous n'avons pas pu réaliser une analyse de ségrégation exhaustive des mutations parmi les différents membres des familles car nous n'avons pas à disposition l'ensemble des dossiers. Ce chiffre paraît bas en sachant qu'une enquête familiale est recommandée pour tout patient diagnostiqué LQTS, les causes ne sont pas connues, mais nous abordons dans la discussion plusieurs hypothèses. Au total, sur les 12 familles investiguées, 56 membres de familles ont été testés pour la mutation familiale : 30 membres de familles (soit 54%) sont positifs pour la mutation familiale, et 26 (soit 46%) sont négatifs pour la mutation familiale. Cette répartition à peu près égale de résultats positifs et négatifs correspond à celle attendue pour une transmission autosomique dominante. Le **tableau R.II** ci-dessous répertorie l'ensemble des apparentés dans les différentes familles. A noter que dans ce tableau, ne sont représentées que les familles pour lesquelles l'enquête génétique a pu être menée.

Tableau R.II : Membres de familles (MF) testés pour la mutation familiale.

Numéro de la famille	MF avec un génotype positif	MF avec un génotype négatif	MF avec un génotype en cours	Nombre total de MF	Mutation familiale recherchée
1	1	2		3	SCN5A p.Asn406Lys
2	1			1	KCNQ1 p.Gly306Arg
3	6\$	3	5	14	KCNH2 p.Leu955Val KCNE1p.Asp85Asn
4	1	1		2	KCNH2 p.Ile19Ser
5	2	7		9	KCNH2 p.Ala172Val
6	1	2		3	KCNH2 L532P
7	1			1	KCNH2 p.Trp705Cysfs*8
8	1	2		3	KCNQ1 p.Arg366Trp
9	6			6	KCNQ1 p.Arg555His
10	4	3		7	KCNQ1 p.Tyr522*
11	5	6		11	KCNQ1 p.Leu156Pro
12	1			1	KCNH2 p.His1151Glnfs*118

MF avec génotype positif = Membre de Famille porteur de la mutation familiale

MF avec génotype négatif = Membre de Famille non porteur de la mutation familiale

MF avec un génotype en cours = Membre de Famille en cours de génotypage pour la mutation familiale

\$ 6 MF dont 5 MF avec un génotype KCNH2 p.Leu955Val +/- KCNE1p.Asp85Asn et 1 MF avec un génotype KCNE1p.Asp85Asn

Parmi les 30 membres de famille avec un génotype positif, nous n'avons accès qu'à 17 phénotypes détaillés dans les dossiers médicaux (*cf. tableau R.III*).

L'analyse de ces 17 patients révèle une moyenne d'âge de 43 ans, l'enquête génétique s'adresse aussi bien aux enfants qu'aux parents des cas index adultes suivis à l'ICM. Parmi les membres de familles, treize sont asymptomatiques (soit 76%), avec dans 47% des cas un allongement de l'intervalle QTc, et dans 29% des cas un QTc normal. Quatre patients présentent des symptômes à type de syncope ou mort subite. On remarque que presque tous les patients sont traités par Béta-bloquants, même en l'absence de symptômes.

En ce qui concerne l'enquête clinique familiale des patients avec un génotype négatif, les données sont très hétérogènes car les patients ne nécessitaient pas d'avoir un dépistage génétique, et pouvaient consulter en dehors de la clinique génétique. Nous n'avons ainsi pas toutes les données.

Tableau R.III : Caractéristiques phénotypiques de 17 membres de famille avec génotype positif.

Membres de Familles	
Moyenne d'âge	43
Sexe (Féminin/Masculin)	10/7
Phénotype Clinique : (%)	
Asymptomatique (76%)	
Allongement intervalle QT	8 (47%)
QTc normal	5 (29%)
Syncope/Arrêt cardiaque (24%)	4 (24%)
Traitement : (%)	
Béta-bloquant	16 (94%)
Défibrillateur	3 (18%)
Score diagnostique de Schwartz : (%)	
SD<ou égal à 1 probabilité basse de LQTS	5 (29%)
SD> 1 à 3 probabilité intermédiaire de LQTS	9 (53%)
SD≥3.5 haute probabilité de LQTS	3 (18%)

3-1-2 Recrutement des patients LQTS pour le séquençage de l'ensemble des exons :

Le recrutement de la population pour le séquençage à haut débit des exons s'est déroulé à l'ICM. L'ensemble des cas index recrutés ont un score de diagnostic clinique de LQTS intermédiaire à élevé (score $\geq 1,5$), et un génotype négatif pour les 5 gènes testés (KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, et KCNE2).

Au total, nous avons recruté 18 patients, dont 13 cas index et 5 membres de famille. Après inclusion, nous avons seulement sélectionné les patients d'origine canadienne française. Les 5 membres de famille, étant asymptomatiques, n'ont pas été inclus dans le WES. Pour les 12 patients inclus dans l'étape de séquençage, nous avons réalisé un résumé de leur phénotype détaillé dans le **tableau R.IV**. Le détail des phénotypes et des arbres généalogiques pour ces patients sont disponibles en **appendice R.1**.

Concernant les patients recrutés, leurs origines sont homogènes, les quatre grands parents étant canadiens français pour 10 des 12 patients cas index. Deux patients (« patients 1 et 8 ») ont des grands parents d'origine belge et française, mais avec un minimum de deux grands parents d'origine canadienne française.

Sept patients sur les 12 ont une histoire familiale à type de mort subite inexplicée ou de syncope.

La moyenne du QTc dans notre population est de 483msec (médiane : 476msec, minimum-maximum : 463-571msec). Il faut rappeler que les QTc relevés sont les QTc les plus longs mesurés sur les différents ECGs disponibles sur le dossier. Pour certains patients, des antécédents de QTc allongés n'ont pas été pris en compte du fait de l'absence de ces ECGs dans le dossier.

Nous avons relevé la présence pour les patients du polymorphisme SCN5A H558R (rs18005124) en **appendice R.2**. Les patients 1, 2, 3, 4 et 12 définis selon le **tableau R.IV** sont porteurs du polymorphisme à l'état hétérozygote, et la patiente 10 est porteuse du polymorphisme à l'état homozygote.

Le rôle du SNP SCN5A H558R dans le LQTS n'est pas clair, et est encore controversé. En 2005, Aydin et al. [112], suivis de Gouas et al. [113], ont décrit une association entre H558R et l'allongement de l'intervalle QTc dans la population générale d'origine caucasienne, l'allèle C étant associé à un allongement du QTc. Mais en 2007, à partir d'une nouvelle étude d'association sur 200 individus, l'équipe de Gouas et al. ne retrouve plus cette association [114]. SCN5A H558R a été associé à des variations phénotypiques rapportées dans plusieurs études. Son effet atténuant sur les conséquences des

mutations SCN5A T512L et SCN5A P2006A, retrouvées dans le LQTS, a été décrit par Viswanathan et al. [115], et Shinlapawittayatorn et al. respectivement.

Ce polymorphisme aurait aussi un rôle modulateur sur l'effet des mutations présentes dans d'autres pathologies liées au gène SCN5A, comme le syndrome de Brugada ou les maladies du noeud sinusal. Gui et al. [116] concluent que le polymorphisme H558R a un effet spécifique sur les conséquences des mutations dans les maladies du nœud sinusal liées à SCN5A. Lizotte et al. [117] montrent que H558R a un effet modulateur sur l'expression phénotypique des patients porteurs de mutations SCN5A responsables d'un syndrome de Brugada, en particulier au niveau des signes électrocardiographiques. Aucun résultat n'a été significatif pour les syndromes de Brugada non liés à des mutations SCN5A. Ainsi il semblerait que l'effet modulateur du polymorphisme H558R soit principalement sur les mutations des gènes SCN5A, mutations non retrouvées chez les patients recrutés pour notre étude de séquençage des exons.

Tableau R.IV : Population recrutée à l'ICM pour le séquençage à haut débit : profil clinique, histoire familiale, score de diagnostic clinique.

Profil			Clinique		Histoire familiale		SD ^s
Sexe	Âge	Origine*	Histoire clinique #	QTc** (ms)			
1	F	37	Q/belge/Q/Q	Syncope, TdP, TVNS, QTc allongé	482	mort subite grand père maternelle 45 ans, mère ESV des 25 ans	5
2	F	42	Q/Q/Q/Q	Syncope TdP, TVNS, QTc allongé	469*	mort subite oncle maternel 60 ans et cousine 46 ans	2
3	F	55	Q/Q/Q/Q	Palpitations TVNS, QTc allongé	474	mort subite père 51 ans et cousine 26 ans, neveu: syncope et palpitations	2
4	M	59	Q/Q/Q/Q	Syncope en dormant, QTc allongé	571	mort subite père à 54 ans (coronarien), sœur 42 ans (maladie cérébrale ?)	5
5	F	23	Q/Q/Q/Q	Arrêt cardiaque récupéré (14 ans) sur FV, syncope, QTc allongé	464		3
6	F	47	Q/Q/Q/Q	Syncopes à répétition, TdP, QTc allongé	453	syncopes mère et sœur	2
7	F	36	Q/Q/Q/Q	Arrêt cardiaque récupéré, TdP, QTc allongé, TSV	470	mort subite cousine paternelle 34 ans	4
8	M	63	Belge/Français/Q/Q	Syncope, arrêt cardiaque récupéré sur FV, QTc allongé	490	mort subite cousine 46 ans	5
9	M	55	Q/Q/Q/Q	Arrêt cardiaque récupéré sur FV, QTc allongé	496		3
10	F	19	Q/Q/Q/Q	Palpitations, TSV, QTc allongé	494*		3
11	F	37	Q/Q/Q/Q	Syncopes à répétition, arrêt cardiaque récupéré, QTc allongé, TSV	464		4
12	F	20	Q/Q/Q/Q	Lipothymies, QTc allongé	463		2

Légende Tableau R.IV : Population recrutée à l'ICM : Profil clinique, histoire familiale, score de diagnostic clinique

*L'origine est décrite suivant l'ordre : grand-père maternel / grand-mère maternelle / grand-père paternel / grand-mère paternelle.

#TDP=Torsades de pointes, TVNS=tachycardie ventriculaire non soutenue, FV=fibrillation ventriculaire, TSV=tachycardie supra-ventriculaire

** QTc (ms) : espace QTc en millisecondes, la mesure du QTc présente est le QTc le plus long mesuré sur les différents ECG présents dans les dossiers.

& QTc mesurés chez des patients sous traitement (rythmol et sotalol) pouvant allonger le QTc, aucun ECGs n'étaient disponibles lorsque les patients étaient sans ces traitements.

\$ SD pour le score de diagnostic clinique de Schwartz décrit dans la *partie Introduction*.

3-2 Analyses phénotypes-génotypes :

Nous avons étudié les rapports entre phénotype et génotype en comparant les phénotypes des patients diagnostiqués LQTS avec un génotype positif et négatif, et en étudiant le caractère symptomatique en fonction de la catégorisation des mutations de LQTS à l'ICM (*la catégorisation est détaillée en appendice M2*).

Dans notre étude, 27 patients ont un génotype positif et 17 un génotype négatif après séquençage de KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, et KCNE2. Nous avons comparé les phénotypes des patients avec un diagnostic génétique positif et ceux avec un diagnostic génétique négatif, afin d'établir la présence ou non de différences au niveau de l'expression clinique de la maladie (*cf. Tableau R.V*). La comparaison de ces deux populations ne retrouve pas de différence significative pour la moyenne d'âge ($p=0,936$), la moyenne d'âge au diagnostic ($p=0,966$), la proportion de femmes par rapport aux hommes ($p=0,737$), et l'histoire familiale ($p=0,548$). Concernant le phénotype, il n'y a pas de différence significative concernant le nombre de patients présentant un $QTc > 480$ msec entre les deux groupes ($p=0,225$).

Les patients avec un génotype négatif présentent plus de symptômes de type syncopes, et/ou morts subites que ceux avec un génotype positif ($p=0,0226$). Cette différence de fréquence des symptômes est liée au fait, que les patients avec un génotype négatif et présentant des signes atypiques de LQTS (définissant un score clinique de Schwartz $< 1,5$) ont été exclus de l'étude pour augmenter les chances d'identifier de nouvelles variantes. Le fait de sélectionner les phénotypes extrêmes, c'est-à-dire les plus graves, permet d'exclure les faux positifs pour le diagnostic du LQTS et d'augmenter les possibilités de mettre en évidence de nouvelles variantes clairement délétères.

Nous n'avons pas retrouvé de différences en ce qui concerne la mise en place d'un traitement entre les patients avec génotype positif et génotype négatif ($p=0,55$). Le nombre de patients, avec un score de diagnostic clinique de Schwartz définissant une probabilité élevée de LQTS, n'est pas différent entre les deux groupes ($p=0,76$).

Tableau R.V : Comparaison des phénotypes pour les patients LQTS génotype positif /négatif.

Cohorte :	Génotype positif	Génotype négatif	p-value
Nombre de cas index	27	17	-
Moyenne d'âge (Minimum-Maximum / Médiane)	44 (17-79 / 40,5)	43 (19-73 / 42)	NS p=0,936
Sexe (féminin/masculin) (%)	19 (70%)/8 (30%)	13 (76%)/4 (24%)	NS p=0,734
Histoire familiale (%)	17 (63%)	7 (47%)	NS p=0,218
Moyenne âge de diagnostique (Minimum-Maximum / Médiane)	35 1-79 / 34	35 14-66 / 28	NS p=0,966
Phénotype :			
QTc\geq480 msec (%)	18 (67%)	8 (47%)	NS p=0,225
Syncope et/ou Mort subite (%)	12 (44%)	14 (82%)	p=0,026
Asymptomatique	7	0	-
Traitement :			
Béta-bloquants	24	14	-
Défibrillateur	10	10	-
Traitement/ Pas de traitement	26/1	15/2	NS p=0,55
Score Diagnostique ou SD de Schwartz (%) :			
SD\leq1 probabilité basse de LQTS	2 (7%)		-
SD> 1 à 3 probabilité intermédiaire de LQTS	14 (52%)	9 (53%)	-
SD\geq3.5 haute probabilité de LQTS	11(41%)	8 (47%)	NS p=0,76

Pour étudier le rapport entre le caractère symptomatique et la catégorisation des mutations, nous avons répertorié les 22 mutations différentes, présentes chez nos patients, et catégorisées selon la méthodologie utilisée à la clinique génétique de l'ICM, et détaillée en *appendice M.2*. Ces mutations correspondent aux mutations des 22 cas index pour lesquels nous avons accès aux comptes rendus génétiques, et à la catégorisation des mutations selon l'ICM (*cf. Tableau R.VI*).

Pour 3 cas index avec un génotype positif, nous n'avons pas eu accès au génotype détaillé ; de plus concernant les mutations dans KCNJ2 pArg218Trp et p.Ala755Thr, nous ne connaissons pas la catégorisation. Nous pouvons remarquer que la répartition des catégorisations n'est pas homogène avec 1 seule mutation de catégorie 1 (KCNQ1 p.Gly306Arg), 1 mutation de catégorie 2 (KCNH2 p.Leu955Val), et 16 mutations de catégorie 3 et 4. Le peu de mutations catégorisées 1 et 2 est lié à la grande hétérogénéité génétique et allélique du LQTS, avec des mutations très souvent privées intrafamiliales, donc non retrouvées dans la littérature.

Tableau R.VI : Mutations et catégorisation des patients avec un génotype positif de LQTS à l'ICM.

Gène	Mutation	Catégorie
KCNQ1		
	KCNQ1 p.Gly306Arg	1
	KCNQ1 p.Gly168Arg	3
	KCNQ1 p.Arg366Trp	3
	KCNQ1 p.Val80Ile	4
	KCNQ1 p.Gly350Val	3
	KCNQ1 p.Ile567Thr	3
	KCNQ1 p.Arg555His	3
	KCNQ1 p.Tyr522*	3
	KCNQ1 p.Pro73Thr	3
KCNH2		
	KCNH2 p.Leu955Val	2
	KCNH2 p.Ser818Leu	3
	KCNH2 p.Ser906Leu	3
	KCNH2 p.Ile19Ser	3
	KCNH2 p.Ala172Val	4
	KCNH2 p.Leu532Pro	3
	KCNH2 p.Trp705Cysfs*8	3
	KCNH2 p.His1151Glnfs*118	3
	KCNH2 p.Arg176Trp	3
SCN5A		
	SCN5A p.Arg1193Gln	4
	SCN5A p.Ser1103Tyr	3
	SCN5A p.Ser1787Asn	4
KCNE1		
	KCNE1 p.Asp85Asn	3

L'analyse du phénotype en fonction de la catégorisation des mutations n'a été possible que pour 33 cas index et membres de familles (*cf. tableau R.VII*). La répartition des mutations dans les différentes catégories ne semble pas être liée au caractère symptomatique ou non des patients : 79% des mutations sont catégorisées 3 aussi bien chez les patients symptomatiques que asymptomatiques.

Tableau R.VII : Répartition du caractère symptomatique et asymptomatique en fonction de la catégorisation des mutations chez un total de 33 patients (cas index et membres de familles).

	Symptomatique *	Asymptomatique**
catégorie 1	2/19	0
catégorie 2	1/19	0
catégorie 3	15/19 (79%)	11/14 (79%)
catégorie 4	1/19	3/14

Les catégories des mutations sont décrites dans l'appendice M2.

*Symptomatique : signes fonctionnels ressentis par le patient

**Asymptomatique : aucun signe fonctionnel (+/-QTc allongé)

Les patients présents dans ce tableau correspondent aux « cas index » et leurs membres de famille. On note qu'en catégorie 1, une seule mutation est décrite mais celle-ci est présente chez un cas index et un de ses membres de famille.

3-3 Résultats de l'alignement des séquences, nomination, annotation, filtration et validation des variantes :

Les mesures de contrôle de qualité obtenues aux différentes étapes du protocole expérimental de préparation des librairies étaient satisfaisantes, permettant ainsi de démarrer le protocole de séquençage. L'ensemble des résultats de contrôle de qualité et de concentration est disponible en *appendice R.3*. Les résultats du « First base report » (disponible en *appendice R.4*) et du « Sequencing Analysis viewer » sont dans les objectifs fixés par Illumina.

Les 12 librairies obtenues des échantillons d'ADN ont été séquencées deux fois lors de l'expérience (*cf. partie Méthodes*). Suite à l'alignement des séquences au génome de référence, nous avons évalué les paramètres de contrôles des différents logiciels (PICARD, GATK, et un script maison) suivant deux

méthodes (*cf. tableau M.II, partie méthodologie*). La première méthode combine les paires d'échantillons, c'est à dire les données issues du double séquençage de chaque échantillon. Pour cette méthode, la moyenne de duplication est de 17,6%, et la moyenne de couverture (pourcentage de bases avec une couverture supérieure à 20x) est de 77,8% (la cible conseillée par Illumina étant >70%). La proportion des séquences lues correspondant aux régions ciblées exoniques est de 64,43%. La deuxième méthode ne combine pas les paires d'échantillons, ceci permet de diminuer le taux de duplication de 17 à 10%, mais la moyenne de couverture diminue à 61,1%. Ce niveau de couverture est insuffisant, nous amenant à rejeter cette méthode d'analyse et à conserver l'analyse en combinant les paires d'échantillons.

L'alignement des séquences au génome de référence a permis de nommer, et d'annoter les variantes, et d'attribuer à chacune un score de probabilité (*cf. partie Matériels et méthodes*). Pour chaque variante identifiée, qu'elle soit connue ou non, un score de probabilité est calculé pour déterminer si cette variante est une vraie variante génétique, ou s'il s'agit d'un artefact de séquençage, ou de traitement des données. Ce score correspond à un logarithme de rapport de cotes (log odds ratio) calculé en utilisant un modèle de mélange gaussien (déterminé à partir de sites "réels" identifiés de HapMap 3, dbSNP et des sites polymorphiques sur la puce Omni 2,5M SNP array). Il permet d'attribuer un statut à chaque variante ("PASS" ou "FAIL"), et de les filtrer. Au total, 105064 variantes ont été mises en évidence, correspondant soit à des variantes de type insertion-délétion, soit à des aux SNPs.

La filtration des variantes selon la méthode décrite dans la partie *Matériels et méthodes* est résumée dans la **Figure R.2**. La première étape est d'éliminer toutes les variantes retrouvées dans les bases de données publiques : dbSNP138, 1Kgenome, HapMaP et ESP6500, soit 99562 variantes éliminées de notre analyse (95% des variantes). La deuxième étape consiste à conserver seulement les variantes affectant les acides aminés : indels, faux-sens, non sens et les variantes au niveau des zones d'épissages. Cette étape élimine 4186 variantes, soit 76% des variantes nouvellement identifiées. Le nombre total de variantes à analyser après filtration est de **1316 variantes** pour les 12 échantillons soit une moyenne de 109.7 variantes par individus (ce chiffre est approximatif car il ne prend pas en compte les variantes partagées entre 1 et plusieurs individus). Les **1316 variantes correspondent à 91 in/del, 1190 faux-sens, 28 non-sens, et 7 variantes de sites d'épissages**. La prédiction de la pathogénicité, par polyphen et les autres logiciels de dbNSFP, est possible pour les 1190 variantes faux-sens. Les

prédictions selon les logiciels, pouvant être discordantes, ne sont pas utilisées pour filtrer les données mais comme une aide pour déterminer l'impact d'une variante sur la fonction protéique. Le tableau disponible en *appendice R.5* résume pour chacun des 12 individus le nombre de variantes totales, et les caractéristiques de ces variantes.

La validation des variantes par génotypage a été réalisée pour les variantes sélectionnées par notre approche d'analyse séquentielle des gènes et variantes génétiques. Selon les critères de validation décrits dans la partie *Matériels et Méthodes*, sur 121 variantes génotypées, 73 variantes ont été validées comme étant des variantes causales potentielles (et non des polymorphismes) soit 59,5%.

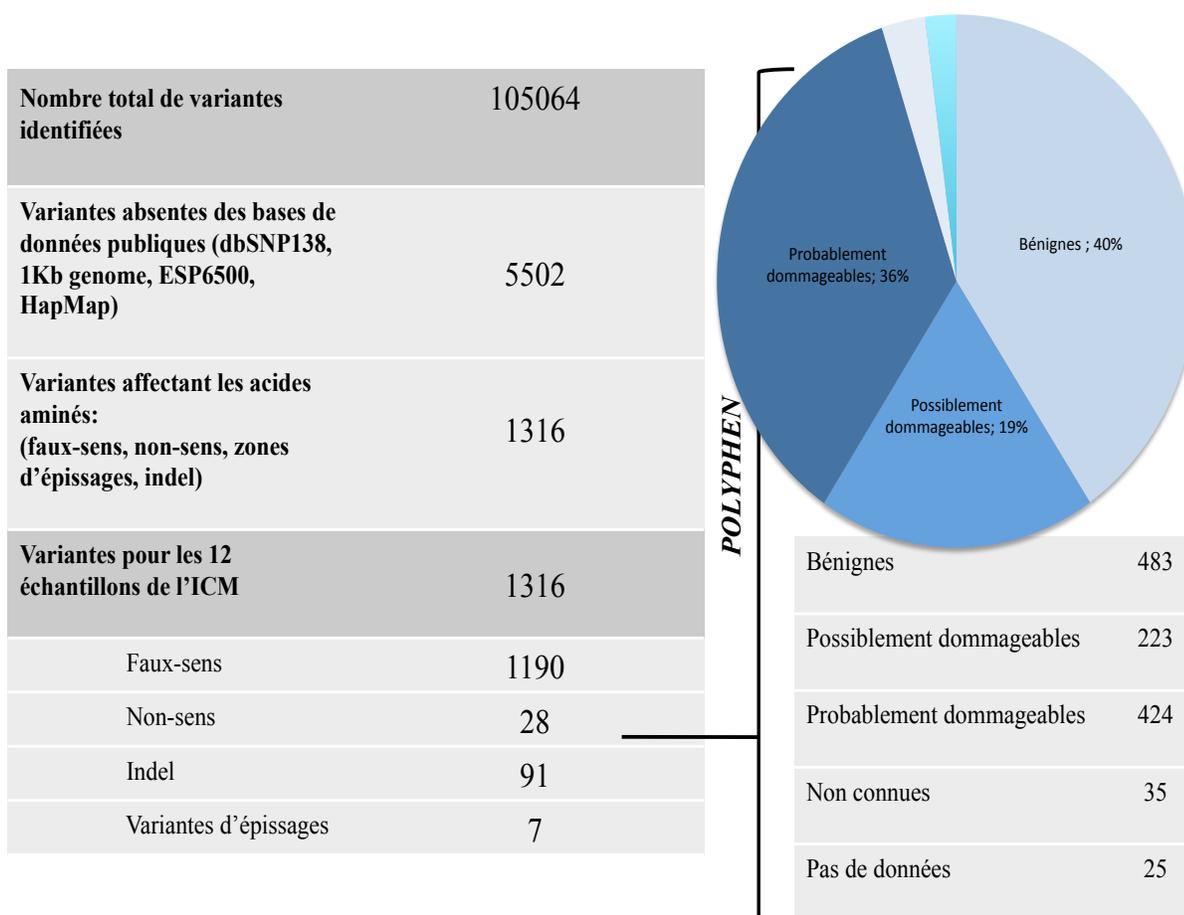


Figure R.2 : Filtration des variantes issues des données de séquençage.

3-4 Variantes mises en évidence dans les gènes connus du LQTS non testés par la clinique de génétique :

La première étape de notre analyse séquentielle est la recherche de variantes parmi les gènes connus du LQTS. Tel qu'attendu, nous n'avons pas retrouvé de variantes causales dans les gènes séquencés à la

clinique génétique (KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNE2). Nous avons cependant mis en évidence pour une patiente une nouvelle variante dans le gène KCNJ2, ce dernier n'avait pas été séquencé lors de l'analyse génétique de la patiente. Nous avons aussi identifié des nouvelles variantes dans les gènes ANK2 et AKAP9 non séquencés à la clinique génétique.

La première variante mise en évidence est dans le gène KCNJ2 responsable du LQTS de type 7.

Nous avons mis en évidence chez la « patiente 1 » (*tableau R.IV*), une nouvelle variante à l'état hétérozygote dans le gène **KCNJ2**, **p.Gly52Val**, au niveau du deuxième exon. Nous avons validé cette variante chez la patiente par génotypage (*cf. partie Matériels et méthodes*), et montré l'absence de celle-ci chez les 540 contrôles. Le gène KCNJ2 code pour la sous-unité alpha kir2.1 formant un canal potassique par co-assemblage de 4 sous-unités. Kir2.1 est le déterminant majeur du potentiel de repos de la membrane plasmique des cardiomyocytes (phase 4 du potentiel d'action).

Des mutations dans KCNJ2 sont associées au syndrome d'Andersen-Tawil (ATS, LQTS de type 7) qui correspond à une triade phénotypique composée de dysmorphies, arythmies ventriculaires et paralysies périodiques [118]. Des mutations dans KCNJ2 sont retrouvées dans 60% des cas de ce syndrome [119]. Une réévaluation du dossier médical de cette patiente, à la suite de la découverte de la mutation, confirme que les caractéristiques phénotypiques de celle-ci sont compatibles avec un syndrome d'Andersen-Tawil, les détails du phénotype sont disponibles *en appendice R.1*.

Nous avons comparé le phénotype de la patiente 1 aux phénotypes de ATS décrits dans une étude rétrospective française sur 33 patients avec une mutation KCNJ2 [120] et aux données de la littérature (*cf. tableau R.VIII*). L'ECG typique associe, comme chez la « patiente 1 », un allongement du QUc et une onde U proéminente [121]. Les données au niveau cardiologique sont très similaires aux phénotypes d'ATS décrits. Elle présente quelques signes de dysmorphie. Par contre, les paralysies périodiques sont absentes. La variabilité phénotypique importante décrite dans ATS peut expliquer chez la « patiente 1 » l'absence de paralysies et des signes de dysmorphies plus légers.

Il existe aussi une variabilité intrafamiliale pour la gravité de l'atteinte cardiaque sur 3 générations : le grand-père maternel a présenté une mort subite, la mère présente de simples extrasystoles ventriculaires, et la patiente 1 a présenté des syncopes et des troubles du rythme ventriculaire graves (arbre familial disponible en *appendice R.1*). L'étude de la ségrégation de la mutation KCNJ2 dans la famille est en cours.

Tableau R.VIII : Comparaison des caractéristiques phénotypiques de notre « patiente 1 » aux 33 patients avec mutation KCNJ2 de l'étude de Delannoy et al. et aux données de la littérature complémentaires.

	Phénotype Patiente 1	Phénotypes de 33 patients ATS avec variant dans KCNJ2 *	Phénotype complémentaire dans la littérature
Clinique ECG	Syncope à répétition depuis l'âge 28 ans QTc allongé 482 msec, QUc allongé 620 msec Onde U proéminente	Syncope dans 3,6% des cas Moyenne QTc 439+/-57msec Moyenne QUc 642msec+/-64msec.	Onde U proéminente et allongement de l'intervalle QUc
Aspects Cardiológicos		ESV nombreuses chez tous dont 25 bigémiques, ESV polymorphiques chez 22/36, Tachycardies ventriculaires polymorphiques non soutenues (70% des patients) Tachycardie polymorphique soutenue chez 6/33, TDP chez 1/36	
Holter ECG	Tachycardies ventriculaires non soutenues polymorphes TDP ?		
ETT	Normale FEVG normale	Normale chez tous	
Dysmorphie	Petite taille Menton hypoplasique	Non étudié	Petite taille, front large, hypertélorisme, petites fentes palpébrales, oreilles basses implantées, nez large, fines lèvres supérieures, palais en arche, visage triangulaire, avec possible asymétrie, microrétrognathie, éruption dentaire très disparate, petites mains et petits pieds clinodactyles, syndactyles des orteils
Paralysies périodiques	Non	Non étudiées	Plus chez les hommes.
Histoire familiale	Mort subite inexplicable grand père maternel 45 ans ESV nombreuses chez la mère depuis l'âge de 25 ans	Rare 1 seul arrêt cardiaque	Rare mais quelques cas rapportés

* Delannoy et al. [120], FEVG : Fraction d'éjection ventriculaire gauche, TDP : Torsades de pointes, ESV : Extrasystoles Ventriculaires

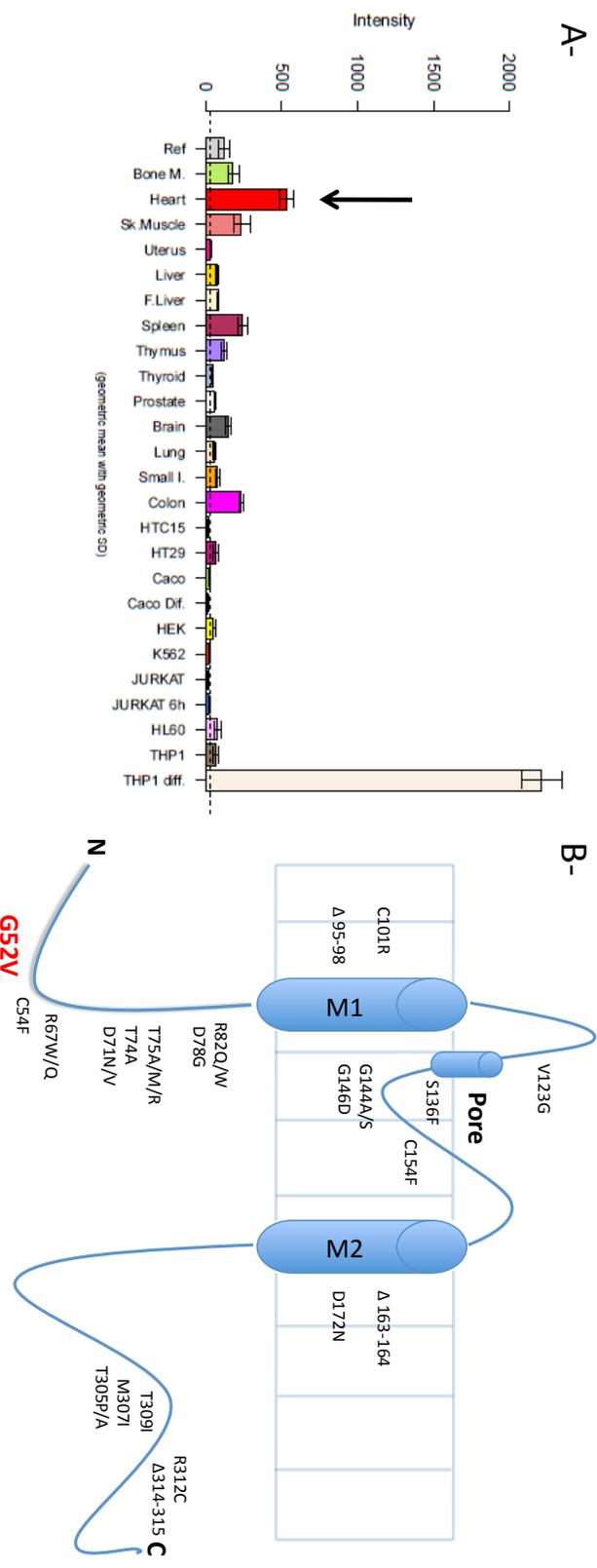


Figure R.3 : Kir 2.1 codé par KCNJ2, profil d'expression et variantes connues.

A- Le profil d'expression tissulaire de KCNJ2 au niveau des ARNm a été déterminé par micropuce. L'expression cardiaque est pointée par la flèche noire. L'expression de KCNJ2 est testée dans un panel d'ARNs totaux de différents tissus et lignées cellulaires humains (*cf. partie matériels et méthodes*). Un échantillon d'ARN de référence est inclus correspondant à un mélange égal de 10 tissus humains. Les valeurs d'intensités d'expression du gène dans chaque tissu correspondent à la moyenne géométrique d'expression et la déviation standard de 3 mesures indépendantes, chaque mesure représente la moyenne géométrique de toutes les sondes du gène corrigée par la médiane de normalisation de l'ensemble des gènes testés dans la micropuce. La ligne en pointillée indique le niveau seuil pour la détection d'une expression minimale. **B-** La représentation de Kir 2.1 avec les différentes variantes connues [121], la variante mise en évidence dans le projet est représentée en rouge.

La variante p.Gly52Val est prédite comme ayant un effet pathogène sur la fonction protéique par l'ensemble des algorithmes de dbNSFP. Elle est décrite comme probablement dommageable pour Polyphen, délétère par LRT, causale par Mutation Taster, non reconnue par Sift, et montre un score de 2,66 sur PhyloP (en faveur d'un site conservé). L'alignement des séquences protéiques des canaux kir 1.1 à 7.1 montre une conservation de l'acide aminé Glycine en position 52 [122]. Nous avons aussi confirmé que KCNJ2 a une expression plus forte dans le cœur que dans les autres tissus (*cf. figure R.3A*) (*cf. partie Matériel et méthodes*). Kir2.1 présente deux parties transmembranaires M1 et M2, 1 pore et une localisation cytoplasmique pour les extrémités C et N terminale. Des variantes associées à l'ATS ont été décrites dans les différentes parties de la protéine (*cf. figure R.3B*). La variante p.Gly52Val est présente au niveau de la zone N-terminale de kir2.1.

Les deuxième et troisième variantes mises en évidence sont dans le gène ANK2, responsable du LQTS4.

Nous avons mis en évidence la variante **p.Glu2107Gln** à l'état hétérozygote chez la «patient 3» (*tableau R.IV*), et **p.Arg1991Gln** à l'état hétérozygote chez le «patient 4» (*tableau R.IV*). Nous avons validé ces variantes chez nos deux patients par génotypage (*cf. partie Matériels et méthodes*), et montré l'absence de celles-ci chez les 540 contrôles. ANK2 code pour une protéine structurale de la famille des Ankyrines : l'Ankyrine B. Cette protéine interagit avec plusieurs canaux ioniques jouant un rôle dans le potentiel d'action des cardiomyocytes.

Des mutations dans ANK2 sont responsables du LQTS de type 4 ou syndrome Ankyrine [123]. Le phénotype LQTS4 associe des syncopes et des morts subites liées à des troubles du rythme ventriculaire, des bradycardies sinusales et des blocs sino-auriculaires, mais l'allongement de l'intervalle QTc n'est pas un signe constant. Le syndrome Ankyrine est considéré comme une entité à part des autres LQTS. Nous avons relevé les phénotypes décrits dans la littérature de patients avec une variante ANK2 (*cf. appendice R.5*). Les phénotypes sont très hétérogènes même à l'intérieur d'une même famille; la pénétrance est variable et les symptômes sont parfois très différents avec des signes à l'effort ou au repos, des troubles de la conduction ou du rythme différents dans une même famille ou pour des non-apparentés porteurs de la même mutation. La comparaison de ces phénotypes avec les phénotypes de nos patients est ainsi bien difficile.

La patiente 3 présentait des palpitations à répétition, le Holter ECG a mis en évidence des TVNS, des ESV et des ESA qui se sont exacerbées avec le temps. L'ECG de repos retrouve un allongement de

l'intervalle QTc à 474msec pour une fréquence cardiaque à 88, l'intervalle PR est à 150msec. Les symptômes sont améliorés par la prise de bêta-bloquants. Les ECGs (enregistrés sous traitement bêta-bloquants) révèlent une bradycardie modérée avec une fréquence cardiaque entre 50 et 60/min et des QTc normaux entre 405msec et 450msec. L'échographie cardiaque est normale. L'histoire familiale est suspecte avec une mort subite inexplicée de sa cousine à 26 ans, une mort subite au repos chez son père, coronarien connu, sans angor, et des syncopes et palpitations à répétition chez son neveu.

Le patient 4 a présenté une syncope pendant son sommeil décrite par sa femme par un arrêt respiratoire et un retour spontané à la conscience. L'ECG de repos retrouve un QTc à 460msec pour une fréquence cardiaque à 71 motivant la réalisation d'un Holter ECG retrouvant un allongement du QTc à 571msec pour une fréquence cardiaque moyenne de 83, l'absence de troubles du rythme et de la conduction. L'échographie cardiaque trans-thoracique est normale. Une scintigraphie myocardique ne retrouve aucun signe d'ischémie. L'histoire familiale retrouve de nombreuses morts subites avec des étiologies floues : un père décédé 3 mois après avoir eu un pontage aorto-coronarien, 2 oncles avec des morts subites sur infarctus du myocarde que nous ne savons pas si la cause a été confirmée, une sœur avec une mort subite à 42 ans étiquetée sur maladie cérébrale. Pour cette dernière, le diagnostic de rupture d'anévrisme intracrânien est possible, mais nous ne pouvons pas éliminer une étiologie cardiaque. Il est dans ce cas difficile de conclure si ces morts subites peuvent être attribuées au syndrome de LQTS4.

Les différents algorithmes de prédiction de la pathogénicité sont discordants : la variante p.Glu2107Gln est décrite comme étant possiblement dommageable par polyphen, neutre par LRT, en faveur d'un site conservé pour PhyloP (score de 2,65). La variante p.Arg1991Gln est décrite comme étant probablement dommageable par polyphen, neutre par LRT, en faveur d'un site non-conservé pour PhyloP (score à 0,92). Nous avons aussi confirmé que ANK2 a une expression principalement cérébrale, cardiaque et musculaire (*cf. figure R.4A*).

ANK2 présente plusieurs domaines [124] (*cf. figure R.4B*), la région régulatrice comprend la fin du domaine de liaison à la spectrine, le DD ou domaine de mort (« death domain »), et la région C-terminale. Cette région régulatrice contrôle les interactions de Ankyrin B avec les canaux ioniques et le cytosquelette [125]. Les mutations connues dans la littérature comme responsables du LQTS 4 sont localisées dans la région régulatrice, en particulier dans la partie C-terminale, zone où sont localisées les 2 variantes mises en évidence dans notre étude.

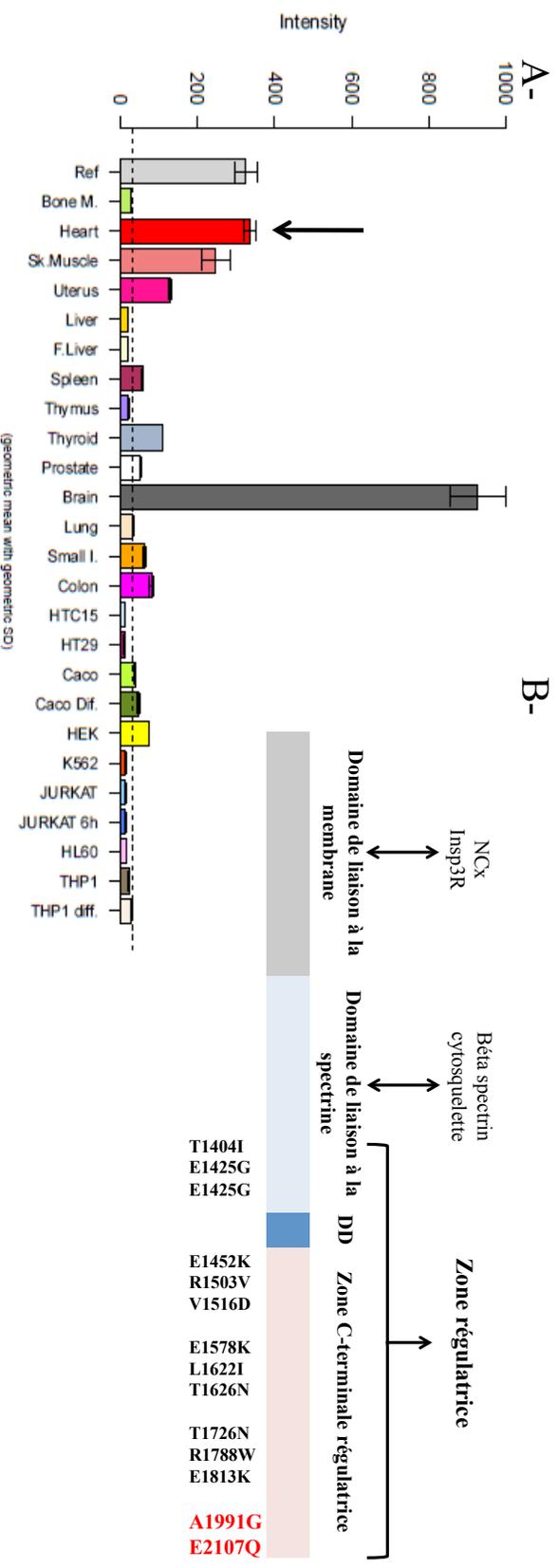


Figure R.4 : Profil d'expression tissulaire de ANK2 et variantes connues dans ANK2.

A- Le profil d'expression tissulaire de ANK2 au niveau des ARNm a été déterminé par micropuce ; l'expression cardiaque est pointée par la flèche noire. L'expression de ANK2 est testée dans un panel d'ARNs totaux de différents tissus et lignées cellulaires humains (*cf. partie matériels et méthodes*). Un échantillon d'ARN de référence est inclus correspondant à un mélange égal de 10 tissus humains. Les valeurs d'intensités d'expression du gène dans chaque tissu correspondent à la moyenne géométrique d'expression et la déviation standard de 3 mesures indépendantes, chaque mesure représente la moyenne géométrique de toutes les sondes du gène corrigée par la médiane de normalisation de l'ensemble des gènes testés dans la micropuce. La ligne en pointillée indique le niveau seuil pour la détection d'une expression minimale.

B- Variantes connues dans ANK2 responsables du LQTS 4. Les variantes en rouge sont les variantes mises en évidence dans l'étude. Les doubles flèches indiquent les interactions protéiques en fonction des différentes régions. **DD= domaine de mort** («death domain»)

La quatrième variante mise en évidence est dans le gène AKAP9 qui est décrit comme responsable du LQTS11.

Nous avons mis en évidence la variante **p.Ser3793Cys** dans **AKAP9** à l'état hétérozygote chez la patiente 5. Nous avons validé cette variante chez la patiente par génotypage (cf. partie Matériels et méthodes), et montré l'absence de celle-ci chez les 540 contrôles.

AKAP9 code pour 6 isoformes protéiques différentes dérivées d'épissage alternatif. YOTIAO est l'isoforme exprimée dans le cœur, elle a un rôle d'ancrage d'une protéine kinase. La fonction cardiaque est régulée par le système nerveux autonome. Lors de l'accélération de la fréquence cardiaque, les récepteurs bêta-adrénergiques stimulent les canaux KCNQ1 afin d'accélérer le courant I_{ks}. Cette stimulation se fait par le biais de la phosphorylation en Ser27 de KCNQ1 par une protéine kinase A (PKA). YOTIAO est indispensable à l'interaction entre KCNQ1 et PKA (cf. **Figure R.5**), en créant un lien entre les 2 protéines [126, 127]. Une diminution de fonction de YOTIAO entraîne une diminution de l'interaction PKA/KCNQ1, donc l'absence de raccourcissement du courant I_{ks} lorsque la fréquence cardiaque s'accélère, prolongeant ainsi la repolarisation (QTc allongé) à l'effort [128].

À ce jour, **une seule variante p.Ser1570Leu** a été identifiée comme responsable du LQTS11 dans la région C-terminale de YOTIAO, domaine d'interaction avec KCNQ1 [129]. Le cas index d'origine caucasienne présente un QTc à 485msec, et un antécédent de syncopes. Deux de ses sœurs et son père présentent un QTc allongé. La mutation a été retrouvée chez le cas index et sa sœur (QTc à 480msec), mais ne fut pas recherchée chez le père et la deuxième sœur. L'étude fonctionnelle de cette variante montre une diminution de l'interaction PKA/KCNQ1 provoquant l'absence de raccourcissement du courant I_{ks} lorsque la fréquence cardiaque s'accélère, prolongeant ainsi la repolarisation à l'effort.

Dans notre étude, **la « patiente 5 »** a présenté une mort subite à l'âge de 14 ans sur fibrillation ventriculaire documentée, et un QTc modérément allongé à 464msec, l'échographie cardiaque est normale (le phénotype détaillé est disponible **en appendice R1**).

Les différents algorithmes de prédiction de pathogénéicité sont discordants : probablement dommageable par polyphen, neutre par LRT, neutre pour Mutation taster, et en faveur d'un site conservé par PhyloP (score de 1,56).

La variante **p.Ser3793Cys** se trouve dans une région de la protéine qui est absente dans l'isoforme YOTIAO. L'acide aminé 3793 est présent dans les 5 autres isoformes protéiques de AKAP9, mais l'expression cardiaque de ces isoformes n'est à ce jour pas connue. Nous n'avons pour l'instant pas

réalisé d'étude du profil d'expression tissulaire de AKAP9, devant le peu d'arguments en faveur d'une variante délétère.

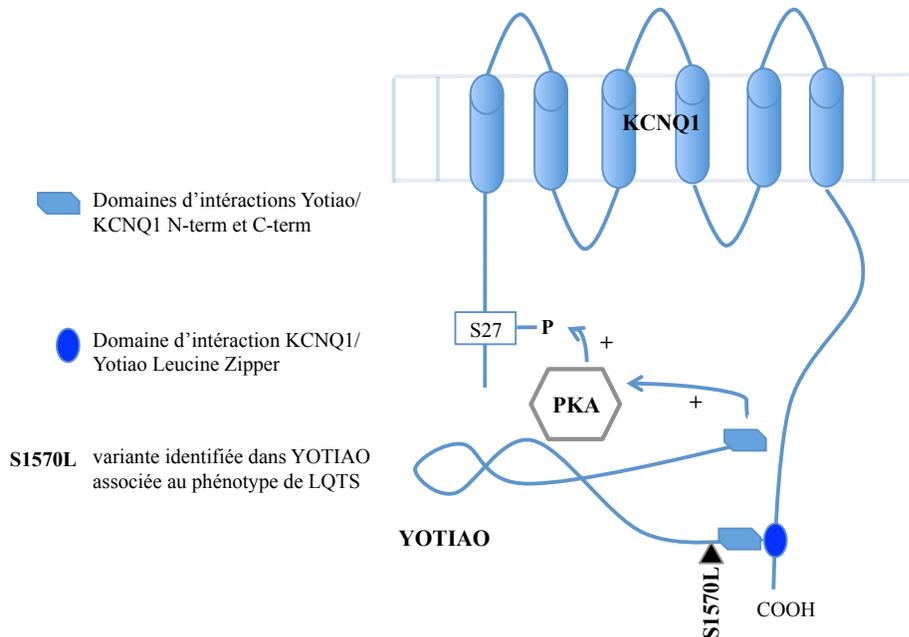


Figure R.5 : Interactions entre l'isoforme YOTIAO et KCNQ1, et localisation sur YOTIAO de la variante S1570L, seule variante associée à ce jour au LQTS 11.

3-5 Variante mise en évidence dans un locus des études d'associations pangénomiques QTGEN et QTSCD, le gène NOS1AP :

La deuxième étape de notre analyse est de rechercher des variantes dans les gènes de régions génomiques associées aux extrêmes supérieurs de la variation normale de l'intervalle QT provenant de deux études d'associations pangénomiques QTSCD [108] et QTGEN [109].

Une variante a été mise en évidence dans NOS1AP, gène identifié dans les 2 études de QTGEN et QTSCD. Cette variante **p.Ser47Asn** à l'état hétérozygote a été identifiée chez la « patiente 12 » (*tableau R.IV*). Nous avons validé le génotype de la patiente par génotypage (*cf. partie Matériels et méthodes*) et montré l'absence de cette variante chez les 540 contrôles.

NOS1AP est considéré comme le régulateur génétique majeur de l'intervalle QT [130]. Il est le locus avec la valeur la plus significativement associée à l'allongement de l'intervalle QTc dans les études

d'associations pangénomiques QTGEN [109], et QTSCD [108] dans la population saine. À ce jour, aucune variante causale n'a été retrouvée dans ce gène. NOS1AP code pour une protéine nommée CAPON, localisée dans les disques intercalants au niveau de la jonction des cardiomyocytes du cœur adulte. Les mécanismes, entre l'allongement de l'intervalle QT et NOS1AP, sont encore mal définis. CAPON jouerait un rôle de régulateur des canaux ioniques à l'origine de la modulation de la repolarisation cardiaque.

La patiente 12 présente des lipothymies à l'effort et des pré-syncope à l'effort associées à des palpitations. L'holter ECG retrouve seulement des rares extrasystoles ventriculaires sans autres anomalies. Un ECG retrouve un QTc à 463msec, fréquence cardiaque=77, PR=128msec, QRS=87msec. Nous n'avons pas retrouvé d'antécédents familiaux.

La variante est prédite comme ayant un effet pathogène sur la fonction protéique. Elle est décrite comme possiblement dommageable pour Polyphen, dommageable par LRT, et montre un score de 2,49 sur PhyloP (en faveur d'un site conservé). De plus, nous avons aussi démontré que NOS1AP a une expression ubiquitaire avec une expression cardiaque significative (*cf. figure R.6*).

La variante chez la « patiente 12 » est au niveau de la région N-terminale de CAPON. Aucun domaine particulier n'a été décrit en N-terminale. Un domaine PDZ a été identifié au niveau de la région C-terminale de la protéine, codé par les 2 derniers exons de NOS1AP en 3'.

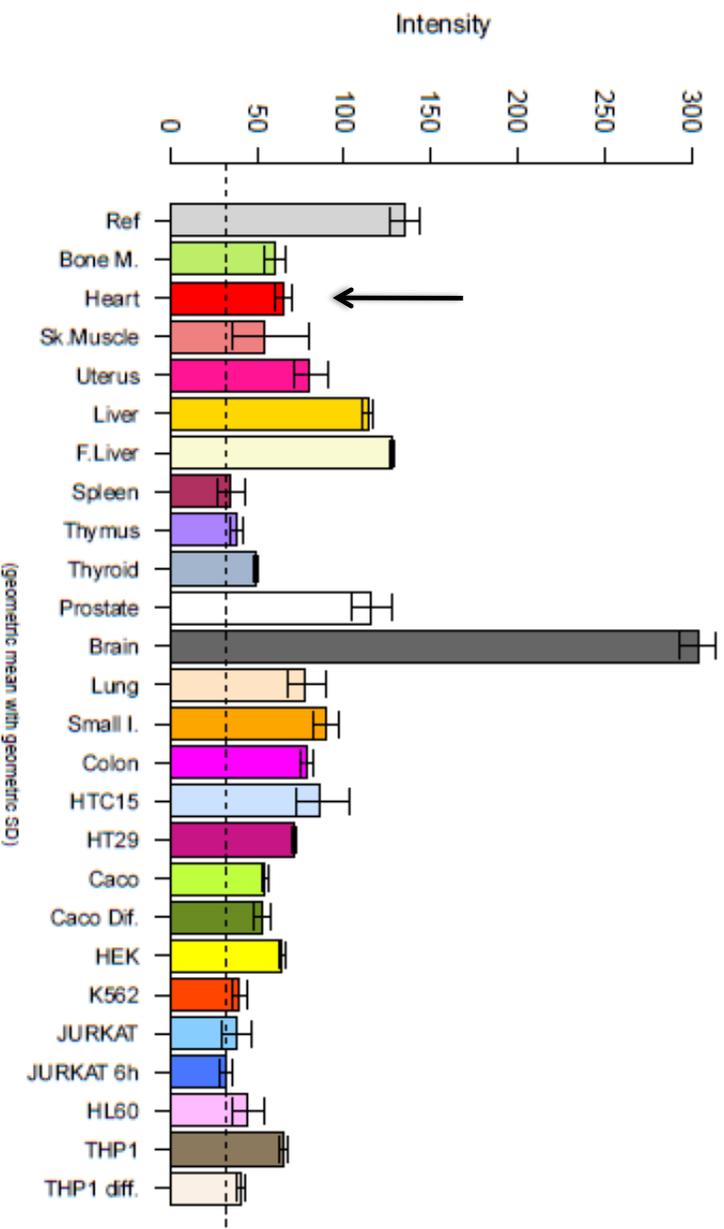


Figure R.6 : Profil d'expression tissulaire de NOSIAP.

Le profil d'expression tissulaire de NOSIAP au niveau des ARNm a été déterminé par micropuce ; l'expression cardiaque est pointée par la flèche noire. L'expression de NOSIAP est testée dans un panel d'ARNs totaux de différents tissus et lignées cellulaires humains (cf. partie matériels et méthodes). Un échantillon d'ARN de référence est inclus correspondant à un mélange égal de 10 tissus humains. Les valeurs d'intensités d'expression du gène dans chaque tissu correspondent à la moyenne géométrique d'expression et la déviation standard de 3 mesures indépendantes, chaque mesure représente la moyenne géométrique de toutes les sondes du gène corrigée par la médiane de normalisation de l'ensemble des gènes testés dans la micropuce. La ligne en pointillée indique le niveau seuil pour la détection d'une expression minimale.

3-6 Variante mise en évidence dans TECRL, gène identifié par la présence d'une variante à l'état homozygote chez deux patientes :

La troisième étape de notre analyse est de se concentrer sur les gènes, dans lesquels une même variante ou plusieurs variantes différentes sont retrouvées dans le même gène chez plus d'un individu testé.

Le gène TECRL a retenu notre attention car il présentait une variante à l'état homozygote partagée par deux individus. Cette variante **p.Arg196Gln** est présente à l'état homozygote chez les « patientes 7 et 11 » (*tableau R.IV*). Nous avons validé le génotype des deux patientes par génotypage (*cf. partie Matériels et méthodes*) et montré l'absence de cette variante chez les 540 contrôles. Les patientes sont toutes deux d'origine canadienne française, mais il n'existe pas de lien familial connu entre elles. Les analyses génétiques n'ont retrouvé aucune autre variante rare partagée entre ces deux patientes ni à l'état hétérozygote ni homozygote.

La grande ressemblance phénotypique des 2 patientes est surprenante (*cf. Tableau R.IX*). Les patientes ont présenté des arrêts cardiaques récupérés sur troubles du rythme ventriculaire à type de torsades de pointes et TV polymorphes, la plupart du temps après un stress émotionnel comme une dispute. L'intervalle QTc est allongé de manière intermittente, lors d'un stress sous Isoprénaline ou après des événements rythmiques pour la patiente 7, il est normal le reste du temps. De plus, elles présentent un trouble du rythme supra-ventriculaire particulier : des tachycardies atriales paroxystiques. Dans la littérature, l'allongement de l'intervalle QTc est associé avec une augmentation de l'incidence et une apparition plus précoce de la fibrillation auriculaire [131, 132]. Aucune donnée n'est retrouvée concernant une association entre l'allongement du QTc et de la tachycardie atriale paroxystique.

Les deux patientes ne présentent pas de cardiomyopathie avec une échographie cardiaque trans-thoracique normale et une fraction d'éjection ventriculaire gauche normale.

Elles ont un défibrillateur double chambre avec une stimulation auriculaire de 100% pour la patiente 7, et de 58% pour la patiente 11, révélant une dysfonction sinusale. Sur l'ECG, le PR (intervalle entre le début de l'onde P et le début du QRS) est court chez la patiente 7, contrairement au PR de la patiente 11, ce qui pourrait s'expliquer par une stimulation auriculaire proche du nœud auriculo ventriculaire. La patiente 11 présente un bloc auriculo-ventriculaire de type 1. Les ECGs sont disponibles en *appendice R.7*.

Les symptômes ont commencé au début de la période adulte, à 18 ans pour l'une, et 22 ans pour l'autre. Pour la patiente 7, une cousine paternelle a fait une mort subite de cause inconnue, la grand-mère paternelle est morte subitement à l'âge de 53 ans avec des antécédents de syncope. Il est difficile d'attribuer ces symptômes à la pathologie de la patiente car nous n'avons que peu de renseignements. De plus, la grand-mère paternelle était connue pour avoir un anévrisme cérébral. Pour la patiente 11, nous n'avons retrouvé aucun antécédent familial suspect. Par contre elle est issue d'une union consanguine, ses arrière-grand-mères étant cousines, ce qui pourrait expliquer le caractère homozygote de la variante chez la patiente 11.

Les différents algorithmes de prédictions sont concordants en faveur de la pathogénicité de la variante. La variante est décrite comme probablement dommageable par Polyphen, dommageable par LRT et mutation taster, et en faveur d'un site conservé pour PhyloP (score à 2,37). De plus, nous avons aussi démontré que l'expression tissulaire de TECRL est exclusive aux muscles cardiaque et squelettiques. (*cf. figure R.7*)

Tableau R.IX: Comparaison des phénotypes de la patiente 7 et 11

	Patiente 7	Patiente 11
Début des symptômes	22 ans	18 ans
Histoire familiale	cousine paternelle : mort subite à 34 ans, grand mère paternelle : syncopes, mort subite à 53 ans mais anévrisme cérébral connu pas de consanguinité retrouvée	pas d'antécédents familiaux consanguinité : arrière grand-mères cousines
	22 ans : Arrêt cardiaque sur TDP et FV avec hypokaliémie et hypomagnésémie, exploration électrophysiologique négative, QTc sous isuprel augmenté (pas de valeur), implantation défibrillateur.	18 ans : Syncopes à l'émotion et TVNS.
	23 ans : TDP et TV à répétition (orage rythmique) avec choc de son défibrillateur hypokaliémie et encéphalopathie anoxique.	31 ans : Arrêt cardiaque sur FV dans un contexte de stress émotionnel (dispute), exploration électrophysiologique négative, QTc allongé sous isuprel 520ms, ETT et IRM normales, implantation défibrillateur.
Histoire de la maladie	36 ans : Choos inappropriés sur TAP dans un contexte d'oubli du bisoprolol. 37 ans : TV polymorphique et FV avec chocs de son défibrillateur dans un contexte de stress émotionnel (dispute) et hypokaliémie, plus TAP sous bisoprolol, QTc à 430ms.	PUIS TV avec chocs du défibrillateurs, et TAP avec des chocs non appropriés, exploration électrophysiologique: mise en évidence de 2 foyers de TAP ablatés, potassium limite à 3.6 mmol/L, Mg non disponible. 32 ans : TV avec des chocs du défibrillateur K+3.8, Mg 0.97=normale, récidive de TAP avec des chocs inappropriés, nouvelle exploration électrophysiologique mise en évidence de 4 foyers de TAP ablatés.
ECG (sans épreuve de stress)	QTc le plus long mesuré=474msec Anomalies de la repolarisation: ondes T négatives en V3-4 (jusqu'à V2 en post événement) et ondes T plates en inférieur, PR court	QTc le plus long mesuré=464msec PR long 248ms avec lente progression de l'onde R de VI à V4
Réglages défibrillateur	réglé en DDDR à une fréquence de 75/min, stimulation auriculaire de 100%	réglé en DDD à une fréquence de 60/min, stimulation auriculaire de 58% et ventriculaire de 30%

TDP : Torsades de pointes, TV : Tachycardie Ventriculaire, TAP : Tachycardie atriale paroxysstique, FV : Fibrillation Ventriculaire

DDD et DDR : mode de stimulation

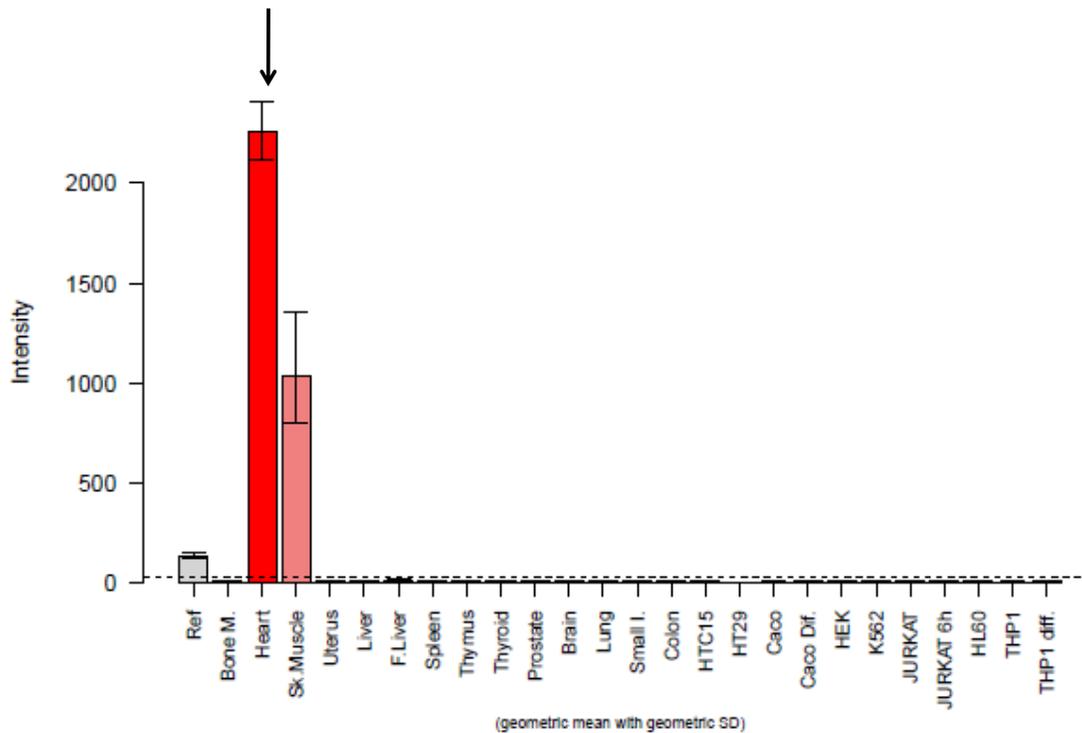


Figure R.7 : Profil d'expression tissulaire de TECRL.

Le profil d'expression tissulaire de TECRL au niveau des ARNm a été déterminé par micropuce ; l'expression cardiaque est pointée par la flèche noire. L'expression de TECRL est testée dans un panel d'ARNs totaux de différents tissus et lignées cellulaires humaines (*cf. partie matériels et méthodes*). Un échantillon d'ARN de référence est inclus correspondant à un mélange égal de 10 tissus humains. Les valeurs d'intensités d'expression du gène dans chaque tissu correspondent à la moyenne géométrique d'expression et la déviation standard de 3 mesures indépendantes, chaque mesure représente la moyenne géométrique de toutes les sondes du gène corrigée par la médiane de normalisation de l'ensemble des gènes testés dans la micropuce. La ligne en pointillée indique le niveau seuil pour la détection d'une expression minimale.

Le gène TECRL (Trans-2,3-Enoyl-CoA Réductase Like) code pour une protéine de 363 acides aminés, dont la fonction n'est pas connue à ce jour. Aucune donnée dans la littérature ne relie à ce jour TECRL au LQTS. Ce gène fait partie de la superfamille des gènes codant pour des stéroïdes 5-alpha réductases. Ils sont tous issus d'un ancêtre commun. L'ensemble des protéines codées par ces gènes sont des enzymes responsables de la réduction d'un substrat via la NADPH. L'arbre phylogénique et la fonction de ces gènes sont décrits sur la **Figure R.8** [133]. Notre gène code pour une protéine TECRL qui est très proche de TECR (Trans-2,3-Enoyl-CoA Reductase), une autre protéine de la famille, d'où son nom. L'alignement par le logiciel BlastP de TECRL et TECR retrouve une identité de 51%, et une homologie de 68% (**appendice R.8**). Nous supposons que la fonction de TECRL est proche de celle de TECR du fait du degré d'homologie.

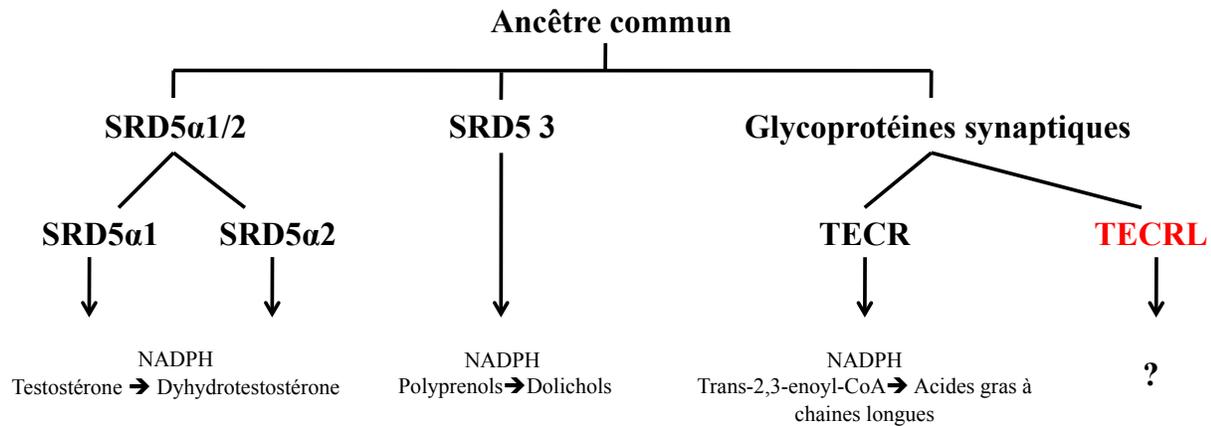


Figure R.8 : Famille des 5 alpha-stéroïdes réductases.

TECR est une enzyme qui intervient dans l'élongation des acides gras à très longues chaînes. L'élongation des acides gras à très chaînes longues se déroule dans les microsomes du réticulum sarcoplasmique du foie, du rein, mais aussi dans le muscle et le cœur. L'élongation des acides gras suit une séquence récurrente de 4 réactions (*cf. Figure R.9*), TECR réalise la deuxième réduction via la NADPH transformant Trans-2,3-enoyl-CoA en acides gras à chaînes longues. Ces acides gras à très longues chaînes sont ensuite dégradés dans les mitochondries par une réaction en chaîne nommée la bêta-oxydation, libérant de l'acétyl-CoA fournissant de l'énergie.

TECR a été identifiée par son homologie avec la protéine levure Tsc13p de même fonction chez la levure. L'alignement sur BlastP entre TECR et Tsp13p retrouve une identité de 32% [134]. Moon et al. ont démontré que TECR s'exprime dans le foie, le rein, le cœur et les muscle, lieu de l'élongation des acides gras à chaînes longues[134]. Le gène TECRL est aussi très proche de Tsc13p car l'alignement Blastp de TECRL et Tsc13p montre 32% d'identité moyenne avec 92 acides aminés partagés entre les deux protéines (*appendice R.8*). Caliskan et al. ont découvert une variante p.pro182leu à l'état homozygote dans TECR responsable de retard mental non syndromique dans une famille consanguine [135]. Le mécanisme entre le retard mental et TECR n'est pas connu, mais il est probablement dû à une perturbation de l'homéostasie lipidique intracellulaire.

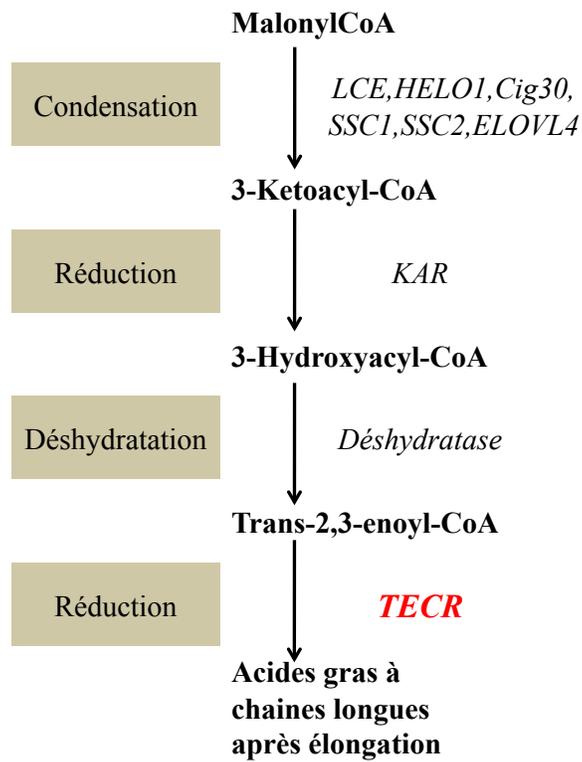


Figure R.9 : Élongation des acides gras à chaînes très longues.

Quatre étapes en chaînes 1-condensation, 2-réduction par NADPH, 3-déshydratation et 4-réduction par NADPH

4-Discussion :

Afin de mieux comprendre le syndrome du QT long, nous avons étudié le phénotype de 50 patients diagnostiqués LQTS et suivis à l'ICM. Nous avons montré que notre population d'étude a des caractéristiques semblables à celles décrites dans la littérature pour les patients LQTS. La comparaison des phénotypes des patients avec un génotype positif et ceux avec un génotype négatif ne révèle aucune différence, hormis une fréquence plus importante de symptômes à type de syncopes et d'arrêts cardiaques chez les génotypes négatifs. Cette différence est imputable à notre méthode de recrutement. La seule réelle différence est liée à la présence ou non d'un diagnostic génétique. Nous avons réalisé un séquençage à haut débit de l'ensemble des exons chez 12 patients, avec un diagnostic de LQTS et un génotype négatif, et nous avons identifié des nouvelles variantes, potentiellement causales, dans des gènes connus, ainsi que dans de nouveaux gènes potentiellement impliqués dans le LQTS.

4-1 Étude de la population diagnostiquée LQTS à l'ICM :

L'étude phénotypique a été réalisée sur les patients avec un diagnostic de LQTS dans un centre de cardiologie de Montréal, possédant une clinique génétique avec son propre laboratoire de diagnostic génétique.

La première conclusion de cette étude montre que les caractéristiques de notre population sont comparables à celles décrites dans la littérature. Notre population de patients LQTS présente une prédominance féminine, et des caractéristiques phénotypiques semblables à celles décrites dans de nombreuses études [66, 94, 95]. Dans notre population, la moyenne d'âge de diagnostic est de 36 ans, plus élevée que dans la littérature. Nathaniel et al rapportent un âge moyen de diagnostic de 22 ans sur 176 patients de tout âge [136], tandis que Tester et al. décrivent un âge moyen de diagnostic de 18 ans chez les hommes, 25 ans chez les femmes, dans une étude sur 541 patients de tout âge [94]. L'âge de diagnostic, plus élevé dans notre étude, peut être lié au fait que les patients avec un LQTS diagnostiqué dans l'enfance ont été suivis dans des centres spécialisés infantiles, mais qu'à l'âge adulte étant donné leur bonne réponse au traitement médicamenteux, un certain nombre ont choisi une prise en charge plus proche de leur domicile dans des centres moins spécialisés. Ainsi, ces patients diagnostiqués jeunes ne sont plus suivis dans des centres spécialisés tel que l'ICM, modifiant l'âge moyen de diagnostic.

Concernant le pourcentage de patients avec une histoire familiale suggérant un LQTS, les données de la littérature sont très variables en fonction de la définition donnée à l'histoire familiale, ce qui rend la

comparaison difficile. Dans l'étude de Taggart et al., les auteurs retrouvent, sur une cohorte de 50 patients, 15 % d'histoire familiale, avec 10 % de patients ayant un parent du premier degré avec un diagnostic clinique de LQTS, et 5 % un antécédent de mort subite dans la famille avant 30 ans. [136] Tester et al. identifient 42% de patients avec une histoire familiale, c'est-à-dire des symptômes relatifs au LQTS sur une cohorte de 541 patients [94]. Dans notre étude, le taux est de 50 % pour une histoire familiale définie par des symptômes relatifs au LQTS chez un membre de famille. De plus, 14 % des patients ont un membre de leur famille avec un LQTS défini par un score de Schwartz >3,5, et 36 % ont des antécédents de mort subite chez un membre de famille de 1^{er} ou 2^{ème} degré. Ces chiffres montrent qu'il n'est pas rare qu'un patient se présente avec un LQTS sans aucun antécédent familial, rendant le diagnostic clinique plus difficile.

Dans 18 % des cas, les patients de notre étude, diagnostiqués LQTS, présentent des signes à type de palpitations ou de lipothymies. Le tableau clinique des patients atteints d'un LQTS peut être très variable, et le diagnostic doit être recherché même en présence de signes moins typiques en mesurant l'intervalle QTc. Les patients asymptomatiques avec un allongement de l'intervalle QTc, découvert de façon fortuite, représentent 16 % des cas index de notre étude. De tels cas sont décrits dans la littérature, mais le pourcentage de ces patients dans la population de patients LQTS n'est pas connu. Ce pourcentage est difficile à évaluer car les patients risquent de développer des symptômes à tout moment de leur vie.

Le laboratoire de la clinique génétique de l'ICM permet de rendre un résultat génétique pour le LQTS dans 61 % des cas après séquençage de KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, KCNE2 et de KCNJ2 en cas d'orientation étiologique. Ce résultat, concordant avec les données de la littérature, permet une comparaison phénotypique des patients avec un génotype positif et négatif. Cette comparaison montre l'absence de différences entre les deux groupes, hormis plus de symptômes à type de syncopes et d'arrêts cardiaques pour les patients avec un génotype négatif ($p < 0,05$). Cette différence est liée à notre recrutement, car nous avons exclu les patients avec une probabilité clinique basse de LQTS selon le score de Schwartz, pour augmenter nos chances de mettre en évidence de nouvelles variantes causales. Les signes, tels que les palpitations ou des troubles du rythme ventriculaire autre que la TdP, ne sont pas comptabilisés dans le score de Schwartz. En 2006, Tester et al. ont montré une différence entre les patients avec un génotype positif et négatif. Les patients avec un génotype négatif présentaient un intervalle QTc en moyenne plus bas, soit 470msec versus 490msec pour les génotypes positifs [94].

Cette différence a été attribuée à des faux positifs pour le diagnostic de LQTS. Dans notre étude, nous avons exclu les faux positifs (7 patients) lors de la revue des dossiers.

Dans le groupe des génotypes positifs, la recherche de la mutation familiale chez les apparentés a été réalisée pour les familles de 12 sur 27 des cas index ayant un génotype positif. Il n'existe pas de données de comparaison dans la littérature, mais ce faible taux peut s'expliquer par le fait que : (1) l'enquête a été faite après le relevé des dossiers, (2) le cas index n'a pas informé ses apparentés de la possibilité de se faire dépister, (3) les apparentés ne désirent pas être dépistés pour des causes multiples (par exemple : à cause d'un éloignement important du centre de l'ICM). Les patients asymptomatiques n'éprouvent pas forcément le besoin d'un dépistage.

La limite principale de l'étude pour les analyses génotypes-phénotypes est liée à la taille de l'échantillon, avec seulement 50 cas index et 56 membres de familles pour l'étude phénotypique. Les caractéristiques de ce petit échantillon sont néanmoins comparables avec les données de la littérature. La répartition des gènes impliqués est particulière (*cf. Figure R.1*), avec les gènes du LQTS7 et LQTS5 représentant 8 % des individus dans notre population, contrairement à une fréquence décrite dans la littérature de moins de 1% [8, 94]. Le gène impliqué dans le LQTS 6 (KCNE2) n'est pas représenté dans notre étude. Dans un petit échantillon comme celui de notre population, la fréquence des gènes normalement très rares est lié au hasard.

À travers cette étude, nous avons mis en évidence des phénotypes particuliers en fonction des gènes impliqués dans le LQTS. Ces phénotypes particuliers sont différents de la description du Romano-Ward classique défini à partir des LQTS1. Ainsi, chaque génotype définit un phénotype différent, avec comme point commun une modification sur l'ECG de la repolarisation cardiaque. Cette modification de la repolarisation est liée à un déséquilibre au niveau des canaux ioniques, soit par une atteinte d'un canal (comme KCNQ1, KCNH2, SCN5A), soit par une atteinte combinée de plusieurs canaux (comme ANK2). Le score de diagnostic clinique de Schwartz détermine un score de probabilité en fonction de critères ECGs, de la présence de torsades de pointes, d'antécédents de syncopes et de cas dans la famille. Mais ces critères ne sont ni sensibles, ni spécifiques pour tous les phénotypes. Ainsi les patients avec un LQTS7 qui présentent des tachycardies bidirectionnelles ont souvent un intervalle QTc normal. Le score de diagnostic est une aide, mais une probabilité élevée ne permet de dépister qu'un certain nombre de patients. Dans notre étude, l'utilisation d'un score de Schwartz $>3,5$ pour le diagnostic de LQTS aurait permis un diagnostic dans seulement la moitié des cas. Le calcul du score

diagnostique pour les membres de famille ne permet pas de guider l'indication d'une recherche génétique. Un score diagnostique de probabilité élevée de LQTS aurait permis de diagnostiquer seulement 18% des membres de famille de notre population, pourcentage comparable aux 19% de l'étude de Hofman et al.[89]. Ce score clinique est bien corrélé au syndrome de Romano Ward, mais il semble moins sensible dans les autres phénotypes du LQTS.

4-2 Identification de nouvelles variantes potentiellement causales du LQTS par séquençage haut débit :

Dans notre étude, le séquençage à haut débit a identifié des nouvelles variantes chez 7 patients sur les 12 recrutés. Ces 12 patients ont un diagnostic de LQTS avec une probabilité intermédiaire à élevée selon Schwartz, et un génotype négatif après séquençage de *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNE1*, et *KCNE2*. Ils ont tous une origine canadienne française. L'originalité et la difficulté de notre étude sont liées au design expérimental, qui consistait à séquencer l'exome de patients indépendants, contrairement à la plupart des autres études réalisées soit sur des familles [41-43], soit ciblées sur un gène ou quelques gènes pour un grand nombre de patients indépendants [40]. Lors de l'étape de séquençage, le fait que chaque échantillon était représenté deux fois sur la chambre de réaction a permis d'augmenter le taux de couverture (*cf. Matériels et méthodes*). La recherche de gènes candidats par analyse séquentielle a identifié des nouvelles variantes à chaque étape : la première dans les gènes connus, la deuxième dans un gène identifié par les études d'associations pangénomiques de la longueur de l'intervalle QT (*QTGEN* et *QTSCD*), et la troisième dans un gène avec une variante (homozygote) partagée par deux individus non apparentés.

À ce jour, 13 gènes sont connus comme impliqués dans le LQTS. Nous avons identifié par le séquençage à haut débit des variantes parmi *KCNJ2*, *ANK2*, et *AKAP9*, c'est à dire 3 des 13 gènes connus mais non séquencés à la clinique génétique.

Nous considérons la variante **p.Gly52Val** dans *KCNJ2* à l'état hétérozygote comme une variante probablement causale chez la « patiente 1 ». La patiente présente tout d'abord un phénotype concordant de syndrome d'Andersen-Tawil (ATS), phénotype associé dans 62 % des cas à une variante causale dans *KCNJ2* [119]. La variante est prédite comme pathogène par les algorithmes de prédiction de pathogénécité, elle est située dans la partie N-terminale de la protéine, domaine hautement conservé donc plus à risque d'effet pathogène. Le phénotype d'ATS est lié à une diminution de l'activité de

kir2.1. Deux types de mécanismes ont été décrits, le premier par effet dominant négatif, et le deuxième par une diminution de l'interaction avec PIP2. PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate), messenger localisé au niveau de la face interne de la membrane plasmique, régule de nombreux transporteurs et canaux ioniques. Il interagit avec les régions C et N terminale de kir2.1, cette interaction étant indispensable pour l'activation suffisante de kir2.1 [137]. La variante **p.Gly52Val** présente dans la région N terminale de Kir2.1 pourrait être responsable d'une diminution de l'interaction protéique PIP2-Kir2.1, entraînant une diminution de l'activité du canal kir2.1 [138]. L'interaction PIP2-kir2.1 est considérée comme électrostatique entre les acides aminés basiques chargés positivement de kir2.1, et les charges anioniques de PIP2. Une étude de mutagénèse des acides aminés basiques de kir2.1, conservés dans la famille kir, a identifié les deux positions 53 et 67 en N terminale comme des sites d'interactions avec PIP2. Donc notre variante en position 52, par sa colocalisation avec l'acide aminé 53, pourrait entraîner une diminution de l'interaction avec PIP2 [122]. Un effet dominant négatif, lié à un défaut de co-assemblage de kir2.1 en tétramère, ne peut être écarté, mais ce type d'effet est décrit généralement pour les variantes du pore et des parties transmembranaires [138, 139].

Nous retenons les 2 variantes à l'état hétérozygote **p.Glu2107Gln**, et **p.Arg1991Gln** dans **ANK2**, présentes respectivement chez la « patiente 3 » et le « patient 4 », comme probablement causales. En ce qui concerne le phénotype, comme nous l'avons décrit dans la partie « résultats », la variabilité phénotypique de ce syndrome est très importante, avec une variabilité intrafamiliale et interfamiliale pour une même variante. Nos deux patients ont des phénotypes différents : le patient 4 présente une syncope nocturne et un allongement de l'intervalle QTc important, alors que la patiente 3 présente des palpitations dans le cadre de troubles du rythme ventriculaire associés à un allongement du QTc. Le phénotype du LQTS4 est lié à une diminution de fonction de ANK2 [140], entraînant une perturbation dans l'organisation cellulaire de la pompe à sodium, de l'échangeur calcium/sodium et du ionositol-1,4,5-triphosphate récepteur, canal calcique tétramérique du réticulum endoplasmique [140]. ANK2 a un rôle dans l'assemblage et dans la localisation au niveau du réticulum sarcoplasmique de ces canaux. Le LQTS4 est lié à une majoration du courant calcique intra-cellulaire qui est à l'origine de la tendance à la dépolarisation cellulaire par EADs et DADs (*cf. partie Introduction*). Le courant calcique d'entrée est le même, mais le courant calcique de sortie va être plus faible. Les canaux Na/K ATPase (permettant l'entrée de K⁺ dans la cellule par la sortie de Na⁺) étant peu nombreux et non fonctionnels dans le LQTS4, la concentration du Na augmente dans la cellule. Les canaux Na/Ca permettent la sortie

du Ca⁺⁺ par l'entrée de Na⁺. Du fait d'une concentration sodique intra-cellulaire trop élevée, le calcium n'est pas évacué en extra cellulaire. De plus, se rajoute une diminution de la fonction de InsP3R jouant un rôle dans la sortie du calcium. Selon Moher et al., une relation existe entre la gravité phénotypique et l'importance de l'atteinte de la protéine Ankyrine B [141]. La majorité des variantes causales à l'origine de la diminution de l'activité Ankyrine sont dans la partie C-terminale régulatrice de la protéine, comme nos deux variantes.

La causalité de la variante **p.Ser3793Cys** dans **AKAP9**, identifiée chez la « patiente 5 », est difficile à évaluer. Premièrement, il existe à ce jour que peu de littérature reliant AKAP9 au LQTS, une seule variante causale p.Ser1570Leu a été identifiée chez deux sœurs dans la partie du gène codant pour l'isoforme YOTIAO [129]. Deuxièmement, notre variante n'est pas retrouvée dans l'isoforme YOTIAO, connu comme étant exprimé dans le coeur. Mais le pouvoir délétère de la variante p.Ser3793Cys n'est pas exclu, elle peut influencer l'épissage de AKAP9 modifiant l'isoforme YOTIAO. De plus, l'expression cardiaque des 5 autres isoformes de AKAP9 comprenant l'acide aminé 3793, n'est pas connue, YOTIAO n'est peut être pas le seul isoforme de AKAP9 présentant une fonction cardiaque.

En prenant en compte les variantes que nous considérons comme causales, c'est à dire **KCNJ2 p.Gly52Val**, **ANK2 p.Glu2107Gln** et **ANK2 p.Arg1991Gln**, le pourcentage de génotypes positifs parmi les gènes connus du LQTS est de 68%. Ce résultat est comparable aux 72% d'une étude récente sur 855 patients après séquençage des gènes du LQTS 1 à 12 [97].

Le séquençage à haut débit a permis l'identification d'une variante dans un gène impliqué dans la variation normale du LQTS. Les études d'associations pangénomiques ont identifié 30 gènes potentiellement impliqués dans la variation normale de l'intervalle QT, incluant le gène NOS1AP qui code pour la protéine CAPON. Notre étude de séquençage a permis de mettre en évidence une variante **p.Ser47Asn** dans NOS1AP chez la « patiente 12 ». Nous pensons que cette variante est causale, et ce serait la première variante de ce gène formellement associée à un phénotype et responsable du LQTS. Sa fonction est encore peu connue, mais il a un rôle dans la régulation des canaux ioniques impliqués dans le potentiel d'action et s'exprime dans le cœur. Une variante commune de NOS1AP a été associée avec un risque accru d'allongement de l'intervalle QTc induit par des médicaments [142]. Chang et al. ont observé que la surexpression de NOS1AP provoquait une accélération de la repolarisation

cardiaque par la diminution du courant calcique (inhibition des canaux calciques de type L) et une augmentation du courant I_{kr} [143]. On peut émettre l'hypothèse qu'une variante provoquant une diminution de la fonction de CAPON serait responsable à contrario d'un allongement de la repolarisation. La protéine CAPON possède au niveau de sa région C-terminale un domaine PDZ, codé par les 2 derniers exons en 3' de NOS1AP. Le mécanisme décrit par Chang et al. est l'interaction de NOS1AP via son domaine PDZ avec NOS1, entraînant une activation de la voie cellulaire NOS1-NO à l'origine de l'inhibition des canaux calciques $I_{Ca,L}$ et l'activation des canaux potassiques I_{kr} [143]. La variante chez la « patiente 12 » étant au niveau de la région N-terminale de CAPON, le mécanisme d'interaction avec les canaux ioniques est probablement différent.

Le séquençage à haut débit a identifié TECRL comme un gène potentiel du LQTS; les signes étant expliqués par un nouveau mécanisme physiopathologique lié à la perturbation du métabolisme lipidique. La troisième étape de notre analyse séquentielle avait pour objectif de rechercher des variantes partagées entre plusieurs individus de notre étude. Du fait de la transmission habituellement autosomique dominante du LQTS, nous ne cherchions pas spécifiquement de variantes à l'état homozygote, mais cette analyse a identifié la variante **p.Arg196Gln** dans le gène TECRL à l'état homozygote chez deux patientes indépendantes.

Les phénotypes des deux patientes sont d'une ressemblance surprenante, elles présentent toutes deux des tachycardies ventriculaires polymorphiques récurrentes et des fibrillations ventriculaires, une histoire de tachycardie atriale récurrente (qui a nécessité une ablation pour l'une), des facteurs émotionnels déclenchant les arythmies, des intervalles QTc allongés de façon intermittente avec un allongement induit par Isoprénaline, et un cœur structurellement normal. Le gène TECRL a une expression exclusivement cardiaque et musculo-squelettique. La fonction de ce gène est inconnue, mais il présente une forte homologie avec TECR qui joue un rôle dans le métabolisme des acides gras à chaînes lourdes. Notre hypothèse est que TECRL est une enzyme avec une fonction similaire à TECR, mais spécifique au cœur et aux muscles. L'accumulation des acides gras à chaînes longues a été associée à des troubles du rythme ventriculaire graves à l'origine de syncopes et morts subites [144]. Cette symptomatologie a été décrite lors d'un déficit enzymatique de la chaîne de béta-oxydation des acides gras à chaînes lourdes. Les patients atteints de ces déficits présentent des cardiomyopathies, des arythmies ventriculaires sévères, des myopathies squelettiques progressives, des insuffisances hépatiques, et de sévères hypoglycémies. Certains patients ont été décrits avec des troubles du rythme

ventriculaire au premier plan [144]. Le laboratoire du Dr Desrosiers à l'ICM a développé un modèle de souris avec inactivation homozygote du gène VLCAD^{-/-}, ce gène (very long chain acyl-coA déshydrogénase) étant une des premières enzymes de la réaction de la bêta-oxydation des acides gras à chaînes très longues [145]. Les souris VLCAD^{-/-} présentent un allongement de l'intervalle QTc secondaire à une accumulation des métabolites lipidiques.

L'hypothèse du lien entre le déficit de la bêta oxydation et les troubles du rythme ventriculaires est liée à la possibilité d'accumulation d'acides gras à chaînes longues et d'acylcarnitine du fait d'un déficit enzymatique de la bêta-oxydation. Ces métabolites lipidiques vont interagir avec les canaux ioniques potassiques IK1 en diminuant leur conductance, diminuer le seuil sodique nécessaire pour une dépolarisation, et activer les canaux calciques. L'interaction avec les canaux ioniques n'est pas observée avec les acides gras à chaînes moyennes ou courtes [144]. Ferro et al. ont étudié l'interaction des métabolites lipidiques avec HerG (canal potassique codé par KCNH2) [146]. L'augmentation extracellulaire d'acylcarnitine, par défaut de la voie en aval de la bêta-oxydation, provoque une stimulation de HerG, ce qui cause une augmentation du flux K⁺, puis une inhibition plus rapide de HerG. L'augmentation du flux IKr entraîne une diminution du potentiel d'action (PA) de la cellule myocardique. Un cas de LQTS a été décrit comme la résultante d'une désactivation rapide de IKs. L'accumulation d'acylcarnitine provoquerait un raccourcissement du potentiel d'action (PA) et à contrario, la diminution d'acylcarnitine entrainerait un allongement du PA de la cellule. L'accumulation d'acides gras à chaînes lourdes en extracellulaire est responsable d'un raccourcissement du PA. Un déséquilibre de concentration des métabolites lipidiques va entraîner une perturbation de l'homéostasie ionique, suite à des interactions avec les canaux ioniques encore mal comprises. Nous émettons l'hypothèse qu'une altération de la fonction de TECRL provoquerait un déséquilibre des métabolites lipidiques, et donc des flux ioniques.

Au total, la fonction de TECRL, par homologie avec TECR, est probablement liée à l'élongation des acides gras à chaînes lourdes. Son expression cardiaque et musculaire exclusive présage d'un rôle important au niveau des ces 2 tissus. Les caractéristiques phénotypiques très superposables des 2 patients sont en faveur de la causalité de la variante TECRL. Ce serait dans ce cas le deuxième gène responsable du LQTS, avec une transmission autosomique récessive, potentiellement spécifique à la population canadienne française.

4-3 Nouvelles orientations de notre étude :

Sur les 12 patients recrutés avec un génotype négatif suite au séquençage réalisé à la clinique génétique de l'ICM, nous avons identifié des variantes probablement causales pour 6 patients avec les analyses actuelles. Les prochaines étapes ont pour objectif : 1) la validation fonctionnelle de la causalité dans le LQTS de ces six nouvelles variantes, et 2) l'identification de variantes causales pour les six autres patients séquencés.

Nous avons développé plusieurs analyses pour la validation fonctionnelle de la causalité des variantes mises en évidence. Concernant les variantes dans les gènes connus KCNJ2 et ANK2, il est nécessaire de compléter l'enquête clinique des apparentés de ces patients, afin de rechercher des patients avec un allongement de l'intervalle QTc ou QUc (pour KCNJ2) non identifiés. La recherche des variantes parmi les membres de familles permettra de vérifier une ségrégation de la variante avec la maladie. Pour la « patiente 1 » avec la variante KCNJ2, la recherche de la variante est intéressante chez sa mère présentant de nombreuses extrasystoles ventriculaires en sachant que la probabilité est très forte qu'elle soit porteuse de la variante en l'ayant hérité de son père mort subitement de manière inexplicable. Pour la « patiente 4 » avec une variante ANK2, la recherche d'une variante serait intéressante chez le neveu qui présente des syncopes à répétition. Concernant le « patient 3 » avec une variante ANK2, aucun membre de famille n'est connu comme symptomatique, mais il est nécessaire de conduire une expertise médicale plus poussée. Les analyses fonctionnelles auront pour objectif de prouver directement la conséquence de la variante sur les flux ioniques cellulaires : diminution du courant potassique (KCNJ2), et augmentation du courant calcique intracellulaire (ANK2). La méthode que l'on souhaite utiliser serait le patch clamp sur un modèle de cellules HEK (en particulier pour KCNJ2) ou de cellules myocardiques avec transfection du gène cible muté dans les cellules. Le patch clamp a été utilisé dans de nombreuses études, cette technique enregistre des courants ioniques transitant à travers les membranes cellulaires.

Concernant la variante dans NOS1AP, une évaluation clinique plus poussée pourrait mettre en évidence d'autres apparentés avec un allongement de l'intervalle QTc. L'analyse fonctionnelle n'est pas possible dans les cellules HEK, du fait d'une expression endogène de NOS1AP trop faible dans ces cellules. Il n'existe pas à ce jour de bons modèles cellulaires humains. Nous souhaitons développer une analyse chez le poisson zèbre.

Concernant la variante homozygote mise en évidence dans TECRL pour les patientes 7 et 11, nous prévoyons en premier une analyse clinique et génétique des apparentés. L'analyse génétique sera en premier proposée aux sœurs (recherche de la variante à l'état homozygote ou hétérozygote), puis aux parents (afin de rechercher les variantes à l'état hétérozygote). Les enfants sont automatiquement porteurs de la variante à l'état hétérozygote. Une enquête clinique est nécessaire pour les sœurs, mais aussi chez les parents et les enfants pour rechercher les conséquences non connues de la variante à l'état hétérozygote. Pour la patiente 11, le caractère homozygote de la variante peut s'expliquer par le fait qu'elle est issue d'une union consanguine avérée. Nous n'avons par contre pas d'informations sur une possible consanguinité des parents pour la patiente 7. Au niveau fonctionnel, nous prévoyons d'analyser le profil des acides gras, étant donné le rôle supposé de TECRL dans l'élongation des acides gras. Nous rechercherons une répartition anormale du profil des acides gras dans le plasma. Les analyses métabolomiques seront réalisées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse avec détermination d'un profil ciblé des acylcarnitines.

Concernant les 6 individus sans variantes mises en évidence à date, nous voulons identifier d'autres gènes candidats parmi les gènes identifiés par les études d'associations pangénomiques (QTSCD et QTGEN), mais aussi parmi les gènes avec des variantes partagées entre plusieurs individus. Nous avons développé d'autres étapes d'analyses séquentielles pour rechercher des gènes candidats (*cf Figure M.4*). La quatrième étape sera de rechercher des variantes parmi les gènes codant pour des canaux ioniques intervenant dans le potentiel d'action [147] [93]. Nous avons établi au préalable une liste de gènes codant pour des canaux ioniques à partir de « Gene Ontology ». La cinquième étape sera de se concentrer sur les variantes mises en évidence dans des gènes interagissant avec les gènes connus du LQTS, tels que définis à partir de logiciels comme Dapple [148].

Le développement du séquençage à haut débit ciblé va permettre de définir un phénotype spécifique pour chaque gène, et ainsi définir une conduite à tenir et un traitement spécifique pour chaque mutation. Différentes variantes dans un même gène peuvent être responsables de phénotypes très différents. Les gènes KCNQ1, KCNH2 sont impliqués dans le LQTS (diminution de la fonction des canaux K⁺), le syndrome du QT court (augmentation de la fonction des canaux K⁺) et la fibrillation auriculaire. Le gène SCN5A est responsable du LQTS (augmentation de la fonction des canaux Na⁺), du syndrome de Brugada (diminution de la fonction des canaux Na⁺), de blocs auriculo-ventriculaires congénitaux, et de cardiomyopathie dilatée.

Cette étude combinée du phénotype et du génotype a permis de mettre en évidence de nouvelles variantes dans le syndrome du QT long parmi des gènes connus, dans un gène identifié par les études d'associations de la variation normale de l'intervalle QT, et dans un nouveau gène TECRL, ce dernier causant vraisemblablement le LQTS par un mécanisme différent de ceux décrits pour les autres gènes identifiés à ce jour.

Elle montre le lien direct entre le phénotype et le génotype avec des manifestations particulières pour chaque gène. La variabilité phénotypique pour une même variante est liée à des facteurs qui restent encore à déterminer. De plus, d'autres gènes impliqués dans le LQTS restent encore à découvrir.

Bibliographie :

1. Hershberger, R.E., *Cardiovascular genetic medicine: evolving concepts, rationale, and implementation*. J Cardiovasc Transl Res, 2008. **1**(2): p. 137-43.
2. al., B.e., *Clinical Approach to Sudden Cardiac Death Syndromes* Vol. Chapter 8 2010: Springer-Verlag ndon Limites
3. Andrew Read, D.D., *Génétique médicale: De la biologie à la pratique clinique*. 2009: De boeck.
4. Majewski, J., et al., *What can exome sequencing do for you?* J Med Genet, 2011. **48**(9): p. 580-9.
5. Phillips, P.C., *Epistasis--the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems*. Nat Rev Genet, 2008. **9**(11): p. 855-67.
6. Griffiths, W., Lewontin ,Caroll, *Introduction à l'analyse génétique*, ed. d. boeck. Vol. 5ème édition. 2010.
7. Stenson, P.D., et al., *The Human Gene Mutation Database: 2008 update*. Genome Med, 2009. **1**(1): p. 13.
8. Bokil, N.J., et al., *Molecular genetics of long QT syndrome*. Mol Genet Metab, 2010. **101**(1): p. 1-8.
9. Morales, A., et al., *Family history: an essential tool for cardiovascular genetic medicine*. Congest Heart Fail, 2008. **14**(1): p. 37-45.
10. Pare, J.A., et al., *Hereditary cardiovascular dysplasia. A form of familial cardiomyopathy*. Am J Med, 1961. **31**: p. 37-62.
11. Nabel, E.G., *Cardiovascular disease*. N Engl J Med, 2003. **349**(1): p. 60-72.
12. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *The LDL receptor locus and the genetics of familial hypercholesterolemia*. Annu Rev Genet, 1979. **13**: p. 259-89.
13. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *Familial hypercholesterolemia: model for genetic receptor disease*. Harvey Lect, 1979. **73**: p. 163-201.
14. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
15. Venter, J.C., et al., *The sequence of the human genome*. Science, 2001. **291**(5507): p. 1304-51.
16. *Finishing the euchromatic sequence of the human genome*. Nature, 2004. **431**(7011): p. 931-45.
17. Ji, W., et al., *Rare independent mutations in renal salt handling genes contribute to blood pressure variation*. Nat Genet, 2008. **40**(5): p. 592-9.
18. Marian, A.J. and R. Bolli, *Circulation Research and human genetic studies*. Circ Res, 2010. **107**(1): p. 6-8.
19. Boczek, N.J., et al., *Exome Sequencing and Systems Biology Converge to Identify Novel Mutations in the L-Type Calcium Channel, CACNA1C, Linked to Autosomal Dominant Long QT Syndrome*. Circ Cardiovasc Genet, 2013.
20. Wells, Q.S., et al., *Whole Exome Sequencing Identifies a Causal RBM20 Mutation in a Large Pedigree with Familial Dilated Cardiomyopathy*. Circ Cardiovasc Genet, 2013.
21. Roncarati, R., et al., *Doubly heterozygous LMNA and TTN mutations revealed by exome sequencing in a severe form of dilated cardiomyopathy*. Eur J Hum Genet, 2013.

22. Charron, P., *Clinical genetics in cardiology*. Heart, 2006. **92**(8): p. 1172-6.
23. Krahn, A.D., et al., *Inherited heart rhythm disease: negotiating the minefield for the practicing cardiologist*. Can J Cardiol, 2013. **29**(1): p. 122-5.
24. Ware, J.S., A.M. Roberts, and S.A. Cook, *Republished review: Next generation sequencing for clinical diagnostics and personalised medicine: implications for the next generation cardiologist*. Postgrad Med J, 2012. **88**(1038): p. 234-9.
25. Cowan, J., et al., *Genetic testing and genetic counseling in cardiovascular genetic medicine: overview and preliminary recommendations*. Congest Heart Fail, 2008. **14**(2): p. 97-105.
26. Andrew Read, D.D., *Génétique médicale: De la biologie à la pratique clinique*. 2008.
27. Wendy R. Uhlmann, J.L.S., Beverly Yasha, *A Guide to Genetic Counseling*. Vol. second edition. 2009: Wiley-Blackwell.
28. Rantanen, E., et al., *What is ideal genetic counselling? A survey of current international guidelines*. Eur J Hum Genet, 2008. **16**(4): p. 445-52.
29. Splawski, I., et al., *Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2*. Circulation, 2000. **102**(10): p. 1178-85.
30. Metzker, M.L., *Sequencing technologies - the next generation*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(1): p. 31-46.
31. Gilissen, C., et al., *Disease gene identification strategies for exome sequencing*. Eur J Hum Genet, 2012.
32. Roberts, R., et al., *Genomics in Cardiovascular Disease*. J Am Coll Cardiol, 2013.
33. Schnabel, R.B., et al., *Next steps in cardiovascular disease genomic research--sequencing, epigenetics, and transcriptomics*. Clin Chem, 2012. **58**(1): p. 113-26.
34. Ku, C.S., et al., *Exome sequencing: Dual role as a discovery and diagnostic tool*. Ann Neurol, 2012. **71**(1): p. 5-14.
35. Marian, A.J., *Challenges in medical applications of whole exome/genome sequencing discoveries*. Trends Cardiovasc Med, 2012. **22**(8): p. 219-23.
36. Todd, A.K., et al., *Detection and whole genome sequence analysis of an enterovirus 68 cluster*. Virol J, 2013. **10**: p. 103.
37. Kisand, V. and T. Lettieri, *Genome sequencing of bacteria: sequencing, de novo assembly and rapid analysis using open source tools*. BMC Genomics, 2013. **14**: p. 211.
38. Touma, M., et al., *Whole genome sequencing identifies SCN2A mutation in monozygotic twins with Ohtahara syndrome and unique neuropathologic findings*. Epilepsia, 2013.
39. Ma, Y., et al., *Developmental timing of mutations revealed by whole-genome sequencing of twins with acute lymphoblastic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013.
40. Herman, D.S., et al., *Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy*. N Engl J Med, 2012. **366**(7): p. 619-28.
41. Norton, N., et al., *Genome-wide studies of copy number variation and exome sequencing identify rare variants in BAG3 as a cause of dilated cardiomyopathy*. Am J Hum Genet, 2011. **88**(3): p. 273-82.
42. Theis, J.L., et al., *Homozygosity mapping and exome sequencing reveal GATAD1 mutation in autosomal recessive dilated cardiomyopathy*. Circ Cardiovasc Genet, 2011. **4**(6): p. 585-94.
43. Galmiche, L., et al., *Exome sequencing identifies MRPL3 mutation in mitochondrial cardiomyopathy*. Hum Mutat, 2011. **32**(11): p. 1225-31.
44. van de Laar, I.M., et al., *Mutations in SMAD3 cause a syndromic form of aortic aneurysms and dissections with early-onset osteoarthritis*. Nat Genet, 2011. **43**(2): p. 121-6.

45. Mardis, E.R., *Next-generation DNA sequencing methods*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2008. **9**: p. 387-402.
46. DePristo, M.A., et al., *A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data*. Nat Genet, 2011. **43**(5): p. 491-8.
47. Cooper, G.M. and J. Shendure, *Needles in stacks of needles: finding disease-causal variants in a wealth of genomic data*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(9): p. 628-40.
48. Bamshad, M.J., et al., *Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(11): p. 745-55.
49. Li, M.X., et al., *A comprehensive framework for prioritizing variants in exome sequencing studies of Mendelian diseases*. Nucleic Acids Res, 2012.
50. Postema, P.G., et al., *Accurate electrocardiographic assessment of the QT interval: teach the tangent*. Heart Rhythm, 2008. **5**(7): p. 1015-8.
51. Farre, J. and H.J. Wellens, *Philippe Coumel: a founding father of modern arrhythmology*. Europace, 2004. **6**(5): p. 464-5.
52. Antzelevitch, C. and W. Shimizu, *Cellular mechanisms underlying the long QT syndrome*. Curr Opin Cardiol, 2002. **17**(1): p. 43-51.
53. Antzelevitch, C. and A. Oliva, *Amplification of spatial dispersion of repolarization underlies sudden cardiac death associated with catecholaminergic polymorphic VT, long QT, short QT and Brugada syndromes*. J Intern Med, 2006. **259**(1): p. 48-58.
54. Rudy, Y., *Modelling and imaging cardiac repolarization abnormalities*. J Intern Med, 2006. **259**(1): p. 91-106.
55. Roden, D.M., *Long QT syndrome: reduced repolarization reserve and the genetic link*. J Intern Med, 2006. **259**(1): p. 59-69.
56. Yan, G.X., et al., *Phase 2 early afterdepolarization as a trigger of polymorphic ventricular tachycardia in acquired long-QT syndrome : direct evidence from intracellular recordings in the intact left ventricular wall*. Circulation, 2001. **103**(23): p. 2851-6.
57. Rosen, M.R. and I.S. Cohen, *Molecular/genetic determinants of repolarization and their modification by environmental stress*. J Intern Med, 2006. **259**(1): p. 7-23.
58. Goldenberg, I. and A.J. Moss, *Long QT syndrome*. J Am Coll Cardiol, 2008. **51**(24): p. 2291-300.
59. Jervell, A. and F. Lange-Nielsen, *Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death*. Am Heart J, 1957. **54**(1): p. 59-68.
60. Vincent, G.M., *The long QT syndrome*. Indian Pacing Electrophysiol J, 2002. **2**(4): p. 127-42.
61. Schwartz, P.J., *The congenital long QT syndromes from genotype to phenotype: clinical implications*. J Intern Med, 2006. **259**(1): p. 39-47.
62. Curran, M.E., et al., *A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome*. Cell, 1995. **80**(5): p. 795-803.
63. Wang, Q., et al., *SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome*. Cell, 1995. **80**(5): p. 805-11.
64. Schwartz, P.J., et al., *Prevalence of the congenital long-QT syndrome*. Circulation, 2009. **120**(18): p. 1761-7.
65. Schwartz, P.J. and L. Crotti, *QTc behavior during exercise and genetic testing for the long-QT syndrome*. Circulation, 2011. **124**(20): p. 2181-4.
66. Locati, E.H., et al., *Age- and sex-related differences in clinical manifestations in patients with congenital long-QT syndrome: findings from the International LQTS Registry*. Circulation, 1998. **97**(22): p. 2237-44.

67. Rautaharju, P.M., et al., *Sex differences in the evolution of the electrocardiographic QT interval with age*. Can J Cardiol, 1992. **8**(7): p. 690-5.
68. Grandinetti, A., et al., *Prevalence and risk factors for prolonged QTc in a multiethnic cohort in rural Hawaii*. Clin Biochem, 2005. **38**(2): p. 116-22.
69. Shah, S.A., et al., *Associations between NOS1AP single nucleotide polymorphisms (SNPs) and QT interval duration in four racial/ethnic groups in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA)*. Ann Noninvasive Electrocardiol, 2013. **18**(1): p. 29-40.
70. Crotti, L., et al., *Congenital long QT syndrome*. Orphanet J Rare Dis, 2008. **3**: p. 18.
71. Shimizu, W., et al., *Epinephrine unmasks latent mutation carriers with LQT1 form of congenital long-QT syndrome*. J Am Coll Cardiol, 2003. **41**(4): p. 633-42.
72. Roden, D.M., *Clinical practice. Long-QT syndrome*. N Engl J Med, 2008. **358**(2): p. 169-76.
73. Schwartz, P.J., et al., *Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias*. Circulation, 2001. **103**(1): p. 89-95.
74. Moss, A.J., et al., *ECG T-wave patterns in genetically distinct forms of the hereditary long QT syndrome*. Circulation, 1995. **92**(10): p. 2929-34.
75. Tan, H.L., et al., *Genotype-specific onset of arrhythmias in congenital long-QT syndrome: possible therapy implications*. Circulation, 2006. **114**(20): p. 2096-103.
76. Priori, S.G., et al., *Association of long QT syndrome loci and cardiac events among patients treated with beta-blockers*. JAMA, 2004. **292**(11): p. 1341-4.
77. Hsiao, P.Y., et al., *Gene mutations in cardiac arrhythmias: a review of recent evidence in ion channelopathies*. Appl Clin Genet, 2013. **6**: p. 1-13.
78. Priori, S.G., et al., *A novel form of short QT syndrome (SQT3) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene*. Circ Res, 2005. **96**(7): p. 800-7.
79. Bartos, D.C., et al., *A KCNQ1 mutation causes a high penetrance for familial atrial fibrillation*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2013. **24**(5): p. 562-9.
80. Kotta, C.M., A. Anastasakis, and C. Stefanadis, *Effects of mutations and genetic overlap in inherited long-QT and Brugada arrhythmia syndromes*. Hellenic J Cardiol, 2012. **53**(6): p. 439-46.
81. Xia, M., et al., *A Kir2.1 gain-of-function mutation underlies familial atrial fibrillation*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **332**(4): p. 1012-9.
82. Knoche, J.W., et al., *Atrial Fibrillation and Long QT Syndrome Presenting in a 12-Year-Old Girl*. Case Rep Pediatr, 2012. **2012**: p. 124838.
83. Li, A., M.M. Saba, and E.R. Behr, *Genetic biomarkers in Brugada syndrome*. Biomark Med, 2013. **7**(4): p. 535-46.
84. Surber, R., et al., *Combination of cardiac conduction disease and long QT syndrome caused by mutation T1620K in the cardiac sodium channel*. Cardiovasc Res, 2008. **77**(4): p. 740-8.
85. McNair, W.P., et al., *SCN5A mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia*. Circulation, 2004. **110**(15): p. 2163-7.
86. Olson, T.M., et al., *Sodium channel mutations and susceptibility to heart failure and atrial fibrillation*. JAMA, 2005. **293**(4): p. 447-54.
87. Hershberger, R.E., D.J. Hedges, and A. Morales, *Dilated cardiomyopathy: the complexity of a diverse genetic architecture*. Nat Rev Cardiol, 2013. **10**(9): p. 531-47.
88. Johnson, J.N., et al., *Prevalence and clinical correlates of QT prolongation in patients with hypertrophic cardiomyopathy*. Eur Heart J, 2011. **32**(9): p. 1114-20.
89. Hofman, N., et al., *Diagnostic criteria for congenital long QT syndrome in the era of molecular genetics: do we need a scoring system?* Eur Heart J, 2007. **28**(5): p. 575-80.

90. Schwartz, P.J., *Idiopathic long QT syndrome: progress and questions*. Am Heart J, 1985. **109**(2): p. 399-411.
91. Schwartz, P.J., et al., *Diagnostic criteria for the long QT syndrome. An update*. Circulation, 1993. **88**(2): p. 782-4.
92. Horner, J.M., M.M. Horner, and M.J. Ackerman, *The diagnostic utility of recovery phase QTc during treadmill exercise stress testing in the evaluation of long QT syndrome*. Heart Rhythm, 2011. **8**(11): p. 1698-704.
93. Douglas P.Zipes, J.J., *Cardiac electrophysiology: from cell to bedside*, ed. Saunders/Elsevier. 2009.
94. Tester, D.J., et al., *Effect of clinical phenotype on yield of long QT syndrome genetic testing*. J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(4): p. 764-8.
95. Bai, R., et al., *Yield of genetic screening in inherited cardiac channelopathies: how to prioritize access to genetic testing*. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2009. **2**(1): p. 6-15.
96. Napolitano, C., et al., *Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice*. JAMA, 2005. **294**(23): p. 2975-80.
97. Lieve, K.V., et al., *Results of Genetic Testing in 855 Consecutive Unrelated Patients Referred for Long QT Syndrome in a Clinical Laboratory*. Genet Test Mol Biomarkers, 2013. **17**(7): p. 553-61.
98. Splawski, I., et al., *Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function*. Nat Genet, 1997. **17**(3): p. 338-40.
99. Westenskow, P., et al., *Compound mutations: a common cause of severe long-QT syndrome*. Circulation, 2004. **109**(15): p. 1834-41.
100. Glenn, T.C., *Field guide to next-generation DNA sequencers*. Mol Ecol Resour, 2011. **11**(5): p. 759-69.
101. Li, H. and R. Durbin, *Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform*. Bioinformatics, 2009. **25**(14): p. 1754-60.
102. McKenna, A., et al., *The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data*. Genome Res, 2010. **20**(9): p. 1297-303.
103. Adzhubei, I.A., et al., *A method and server for predicting damaging missense mutations*. Nat Methods, 2010. **7**(4): p. 248-9.
104. Liu, X., X. Jian, and E. Boerwinkle, *dbNSFP: a lightweight database of human nonsynonymous SNPs and their functional predictions*. Hum Mutat, 2011. **32**(8): p. 894-9.
105. Kumar, P., S. Henikoff, and P.C. Ng, *Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm*. Nat Protoc, 2009. **4**(7): p. 1073-81.
106. Schwarz, J.M., et al., *MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations*. Nat Methods, 2010. **7**(8): p. 575-6.
107. Cooper, G.M., et al., *Single-nucleotide evolutionary constraint scores highlight disease-causing mutations*. Nat Methods, 2010. **7**(4): p. 250-1.
108. Pfeufer, A., et al., *Common variants at ten loci modulate the QT interval duration in the QTSCD Study*. Nat Genet, 2009. **41**(4): p. 407-14.
109. Newton-Cheh, C., et al., *Common variants at ten loci influence QT interval duration in the QTGEN Study*. Nat Genet, 2009. **41**(4): p. 399-406.
110. Wu, C., et al., *BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources*. Genome Biol, 2009. **10**(11): p. R130.
111. Liu, X., et al., *TiGER: a database for tissue-specific gene expression and regulation*. BMC Bioinformatics, 2008. **9**: p. 271.

112. Aydin, A., et al., *Single nucleotide polymorphism map of five long-QT genes*. J Mol Med (Berl), 2005. **83**(2): p. 159-65.
113. Gouas, L., et al., *Association of KCNQ1, KCNE1, KCNH2 and SCN5A polymorphisms with QTc interval length in a healthy population*. Eur J Hum Genet, 2005. **13**(11): p. 1213-22.
114. Gouas, L., et al., *Confirmation of associations between ion channel gene SNPs and QTc interval duration in healthy subjects*. Eur J Hum Genet, 2007. **15**(9): p. 974-9.
115. Viswanathan, P.C., D.W. Benson, and J.R. Balsler, *A common SCN5A polymorphism modulates the biophysical effects of an SCN5A mutation*. J Clin Invest, 2003. **111**(3): p. 341-6.
116. Gui, J., et al., *Mutation-specific effects of polymorphism H558R in SCN5A-related sick sinus syndrome*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2010. **21**(5): p. 564-73.
117. Lizotte, E., et al., *Genetic modulation of brugada syndrome by a common polymorphism*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2009. **20**(10): p. 1137-41.
118. Tristani-Firouzi, M. and S.P. Etheridge, *Kir 2.1 channelopathies: the Andersen-Tawil syndrome*. Pflugers Arch, 2010. **460**(2): p. 289-94.
119. Donaldson, M.R., et al., *Andersen-Tawil syndrome: a model of clinical variability, pleiotropy, and genetic heterogeneity*. Ann Med, 2004. **36 Suppl 1**: p. 92-7.
120. Delannoy, E., et al., *Cardiac characteristics and long-term outcome in Andersen-Tawil syndrome patients related to KCNJ2 mutation*. Europace, 2013.
121. Zhang, L., et al., *Electrocardiographic features in Andersen-Tawil syndrome patients with KCNJ2 mutations: characteristic T-U-wave patterns predict the KCNJ2 genotype*. Circulation, 2005. **111**(21): p. 2720-6.
122. Lopes, C.M., et al., *Alterations in conserved Kir channel-PIP2 interactions underlie channelopathies*. Neuron, 2002. **34**(6): p. 933-44.
123. Mohler, P.J., et al., *Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death*. Nature, 2003. **421**(6923): p. 634-9.
124. Mohler, P.J., et al., *A cardiac arrhythmia syndrome caused by loss of ankyrin-B function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(24): p. 9137-42.
125. van Oort, R.J., et al., *Alternative splicing: a key mechanism for ankyrin-B functional diversity?* J Mol Cell Cardiol, 2008. **45**(6): p. 709-11.
126. Chen, L. and R.S. Kass, *A-kinase anchoring protein 9 and IKs channel regulation*. J Cardiovasc Pharmacol, 2011. **58**(5): p. 459-13.
127. Chen, L. and R.S. Kass, *Dual roles of the A kinase-anchoring protein Yotiao in the modulation of a cardiac potassium channel: a passive adaptor versus an active regulator*. Eur J Cell Biol, 2006. **85**(7): p. 623-6.
128. Li, Y., et al., *The A-kinase anchoring protein Yotiao facilitates complex formation between adenylyl cyclase type 9 and the IKs potassium channel in heart*. J Biol Chem, 2012. **287**(35): p. 29815-24.
129. Chen, L., et al., *Mutation of an A-kinase-anchoring protein causes long-QT syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(52): p. 20990-5.
130. Tomas, M., et al., *Polymorphisms in the NOS1AP gene modulate QT interval duration and risk of arrhythmias in the long QT syndrome*. J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(24): p. 2745-52.
131. Mandyam, M.C., et al., *The QT Interval and Risk of Incident Atrial Fibrillation*. Heart Rhythm, 2013.
132. Johnson, J.N., et al., *Prevalence of early-onset atrial fibrillation in congenital long QT syndrome*. Heart Rhythm, 2008. **5**(5): p. 704-9.

133. Langlois, V.S., et al., *Evolution of steroid-5alpha-reductases and comparison of their function with 5beta-reductase*. Gen Comp Endocrinol, 2010. **166**(3): p. 489-97.
134. Moon, Y.A. and J.D. Horton, *Identification of two mammalian reductases involved in the two-carbon fatty acyl elongation cascade*. J Biol Chem, 2003. **278**(9): p. 7335-43.
135. Caliskan, M., et al., *Exome sequencing reveals a novel mutation for autosomal recessive non-syndromic mental retardation in the TECR gene on chromosome 19p13*. Hum Mol Genet, 2011. **20**(7): p. 1285-9.
136. Taggart, N.W., et al., *Diagnostic miscues in congenital long-QT syndrome*. Circulation, 2007. **115**(20): p. 2613-20.
137. D'Avanzo, N., et al., *Direct and specific activation of human inward rectifier K⁺ channels by membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*. J Biol Chem, 2010. **285**(48): p. 37129-32.
138. Donaldson, M.R., et al., *PIP2 binding residues of Kir2.1 are common targets of mutations causing Andersen syndrome*. Neurology, 2003. **60**(11): p. 1811-6.
139. Cheng, W.W., et al., *Dual-mode phospholipid regulation of human inward rectifying potassium channels*. Biophys J, 2011. **100**(3): p. 620-8.
140. Camors, E., et al., *Ankyrin-B reduction enhances Ca spark-mediated SR Ca release promoting cardiac myocyte arrhythmic activity*. J Mol Cell Cardiol, 2012. **52**(6): p. 1240-8.
141. Mohler, P.J., et al., *Defining the cellular phenotype of "ankyrin-B syndrome" variants: human ANK2 variants associated with clinical phenotypes display a spectrum of activities in cardiomyocytes*. Circulation, 2007. **115**(4): p. 432-41.
142. Jamshidi, Y., et al., *Common variation in the NOS1AP gene is associated with drug-induced QT prolongation and ventricular arrhythmia*. J Am Coll Cardiol, 2012. **60**(9): p. 841-50.
143. Chang, K.C., et al., *CAPON modulates cardiac repolarization via neuronal nitric oxide synthase signaling in the heart*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(11): p. 4477-82.
144. Bonnet, D., et al., *Arrhythmias and conduction defects as presenting symptoms of fatty acid oxidation disorders in children*. Circulation, 1999. **100**(22): p. 2248-53.
145. Gelinas, R., et al., *Prolonged QT interval and lipid alterations beyond beta-oxidation in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase null mouse hearts*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(3): p. H813-23.
146. Ferro, F., et al., *Long-chain acylcarnitines regulate the hERG channel*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41686.
147. Grant, A.O., *Cardiac ion channels*. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2009. **2**(2): p. 185-94.
148. Rossin, E.J., et al., *Proteins encoded in genomic regions associated with immune-mediated disease physically interact and suggest underlying biology*. PLoS Genet, 2011. **7**(1): p. e1001273.
149. Zipes, D.P., et al., *ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Develop guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death) developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society*. Europace, 2006. **8**(9): p. 746-837.
150. Sherman, J., D.J. Tester, and M.J. Ackerman, *Targeted mutational analysis of ankyrin-B in 541 consecutive, unrelated patients referred for long QT syndrome genetic testing and 200 healthy subjects*. Heart Rhythm, 2005. **2**(11): p. 1218-23.

151. Zhou, X., et al., *Analysis of ankyrin-B gene mutations in patients with long QT syndrome*. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2006. **26**(7): p. 901-3, 909.

APPENDICE :

Appendice I.1 : Critères diagnostiques du LQTS de 1985, le diagnostic de LQTS est porté en présence de 2 critères majeurs ou 1 critère majeur et 2 mineurs.

Critères majeurs	Critères mineurs
QTC \geq 440msec	Surdit�e congénitale
Syncope induite par le stress	Ondes T alternantes
Membre de famille LQTS	Bradycardie
	Repolarisation ventriculaire anormale

Appendice I.2: Recommandations américaines et européennes sur le traitement du LQTS [149].

Classe I:

1-Une modification du mode de vie est recommandée pour tous les patients avec un diagnostic de LQTS (clinique et/ou moléculaire) (Niveau de preuve B) (concernant le sport, la liste des médicaments contre-indiqués).

2-Les bêta-bloquants sont recommandés pour les patients avec un diagnostic clinique de LQTS (c'est à dire en présence d'un allongement de l'intervalle QT) (Niveau de preuve B).

3-L'implantation d'un DAI associé à la prescription de b ta-bloquants est recommandée pour les patients atteints de LQTS ayant présenté un arrêt cardiaque, en cas d'espérance de vie de plus d'1 an (Niveau de preuve A).

Classe IIa :

1-Les bêta-bloquants peuvent être efficaces en terme de prévention de la mort subite chez les patients avec un diagnostic génétique de LQTS, et un intervalle QT normal. (Niveau de preuve B)

2-L'implantation d'un DAI peut être efficace pour réduire la mort subite chez les patients atteints de LQTS ayant présenté des syncopes et tachycardies ventriculaires sous traitement b ta-bloquants, avec une espérance de vie de plus d'un an (Niveau de preuve B).

Classe IIb :

1-La dénervation sympathique cardiaque gauche peut être envisagée pour les patients atteints de LQTS ayant présenté des syncopes, torsades de pointes, ou un arrêt cardiaque sous traitement b ta-bloquants (Niveau de preuve B).

2-L'implantation d'un défibrillateur associé à la prescription de bêta-bloquants peut être considérée en prévention de la mort subite chez les patients avec un risque plus élevé d'arrêts cardiaques, comme ceux avec un diagnostic génétique de LQTS2 ou LQTS3, en cas d'espérance de vie de plus d'un an (Niveau de preuve B).

Appendice M1: Données cliniques et génétiques recueillies.

Phénotype:

Age au moment du recueil : ans

Sexe:

- féminin
 masculin

Cause de la première évaluation à l'ICM:

- syndrome de LQTS connu
 suspicion du LQTS: allongement de l'intervalle QT à un temps t
 suspicion du LQTS: syncope
 suspicion du LQTS: mort subite récupérée
 antécédent familial de LQTS

Histoire familiale:

- arrêt cardiaque récupérée ou non 1er degré
 arrêt cardiaque récupérée ou non 2eme degré
 mutation familiale membre 1er degré
 mutation familiale membre 2eme degré
 syncope membre 1er degré
 syncope membre 2eme degré

Age de la mort subite

familiale: ans

Age du diagnostique: ans

Symptomatologie:

- asymptomatique
 syncope
 mort subite
 autre

Traitement:

- traitement anti-arythmique autre que bêta-bloquants
 bêta-bloquants
 défibrillateur
 pacemaker
 sympathectomie droite
 pas de traitement

QTc le plus long mesuré en msec*

Génétique

Présence d'une mutation après enquête génétique au laboratoire de l'ICM:

- oui
 non
 non recherchée pourquoi ?
 en attente

Nombres de mutations retrouvées dans les gènes LQTS

Type de LQTS 1, 2, 3, 5 ou 6 en cas de mutations retrouvées

Type de mutation:

Catégorisation de la mutation:

Score diagnostique:

- < ou égal à 1 probabilité basse de LQTS
 > 1 à 3 probabilité intermédiaire de LQTS
 > ou égal à 3,5 probabilité élevée de LQTS

Détails du score diagnostique #:

Mesures ECG, mesure du QTc le plus long mesuré en msec:

- 0- <450 ms (hommes) et < 460 ms (femmes)
 1- 450-459 ms (hommes)
 2-460-479 ms
 3- > ou égal à 480 ms
 2-torsades de pointes

Histoire clinique:

- 0- pas de syncope ni surdité familiale
 0.5- surdité familiale
 1- syncope sans stress
 2- syncope avec stress
 1.5 syncope sans stress+ surdité familiale
 2.5- syncope avec stress+ surdité familiale
 0- syncope sur torsades de pointes

Histoire familiale:

- 0.5- Mort subite inexpliquée moins de 30 ans chez un membre de famille immédiat
 1- LQTS défini membres de famille SD > ou égal 3.5
 0- aucune des deux
 1- si les deux

Légende : Données recueillies dans les dossiers des patients diagnostiqués LQTS à l'ICM.

*QTc le plus long mesuré sur les ECG de suivis des patients, corrigé selon la formule de Bazett

#Relevé en fonction des différents items du score de diagnostic de Schwartz

Appendice M2 : Catégorisation des variantes dans le laboratoire de la clinique de génétique de l'ICM.

Le diagnostic génétique à l'ICM est réalisé par séquençage de type Sanger pour les gènes KCNQ1(LQTS1), KCNH2(LQTS2), SCN5A(LQTS3), KCNE1(LQTS5), et KCNE2(LQTS6).

Pour définir leurs pouvoirs causals, les variantes sont catégorisées de 1 à 6 selon différents critères:

1-calcul d'un score mis en place à l'ICM équivalent d'une moyenne des scores attribués par 5 bases de données de prédiction de la pathogénicité : Polyphen 1, Slift, Panther, Pmut, SNP3D

2-recherche d'arguments en faveur d'un lien entre la variante et le LQTS dans la littérature et dans les bases de données du LQTS, revue des variantes mises en évidence dans le laboratoire de l'ICM

3-évaluation familiale : recherche de la variante chez des membres de familles malades.

Catégorie 1 : Variante causale connue : un article montre le lien certain entre la variante et la maladie, **ou** plusieurs articles (2 ou plus) décrivent des évidences d'association entre la variante et la maladie.

Catégorie 2 : Variante causale très probable :

- un article décrit des évidences d'association entre la variante et la maladie, **ou** la variante est retrouvée dans une base de données du LQTS

- **et** l'histoire familiale du patient est importante avec une ségrégation de la variante (les individus malades sont porteurs de la variante), et une pénétrance approuvée en réunion cardiogénétique **ou** deux familles différentes suivies à l'ICM présentent des individus atteints et porteurs de la variante.

Catégorie 3 : Variante causale probable :

- un article avec des évidences d'association entre la variante et la maladie **ou** la variante est retrouvée dans une base de données du LQTS

- **ou** un pedigree avec 3 individus, malades et porteurs de la variante, de deux générations différentes (ségrégation de la mutation) **ou** deux familles différentes suivies à l'ICM présentent des individus atteints et porteurs de la variante

- **ou** polymorphisme intronique ≤ 2 bp de l'exon, ou codon Stop, ou décalage du cadre de lecture.
- ou score moyen de prédiction de la pathogénicité $\geq 0,5$.

Catégorie 4 : Variante causale possible (ou polymorphisme) devant une revue de la littérature incertaine ou contradictoire, ou une littérature absente pour une variante associée à score moyen de prédiction de la pathogénicité bas $\leq 0,5$.

Catégorie 5 : Polymorphisme non associé à la maladie ou à effet inconnu mais fréquent dans la population.

Catégorie 6 : Variantes à effets variables, 3 variantes sont répertoriées dans cette catégorie : KCNH2 K897T rs1805123, SCN5A H558R rs1805124 et KCNE1 G38S rs1805127.

Dans la littérature, ces variantes ne sont pas décrites comme causales du LQTS, mais leur rôle modulateur de l'effet d'une autre mutation est probable en particulier pour SCN5A H558R (*cf. partie Résultats*).

La catégorisation évolue avec le temps suivant la littérature et les nouveaux cas. Les variantes de catégories 1 à 4 sont rapportées par le laboratoire et considérées comme des variantes causales.

Appendice M3 : Formulaires de consentement cas index et membres de famille.

FORMULAIRE DE CONSENTEMENT

PROJET DE RECHERCHE : ICM #11-1310

Analyses phénotypique et génétique du syndrome du Long QT

GénoLQT

Investigateur principal et collaborateurs

John D. Rioux PhD.; Mario Talajic M.D.; Lena Rivard M.D.; Laura Robb MSc.; Marie-A Chaix M.D.; Philippe Goyette PhD.; Guillaume Lettre PhD.; Blandine Mondesert M.D.

Fondation de l'Institut de Cardiologie de Montréal

INFORMATION

DESCRIPTION GÉNÉRALE

Nous vous invitons à participer à un projet de recherche parce que vous présentez un syndrome du Long QT.

Ce projet est financé par la FICM (Fondation de l'Institut de Cardiologie de Montréal).

Avant de signer ce formulaire de consentement, veuillez prendre tout le temps nécessaire pour lire (ou vous faire lire) et comprendre l'information présentée ci-dessous. Vous pouvez consulter vos proches avant de prendre votre décision. Veuillez poser à votre médecin ou à l'équipe de recherche toutes les questions que vous avez sur la présente étude et sur vos droits. Ils devraient être en mesure de répondre à toutes vos questions.

Contexte :

L'ADN est une molécule qui renferme toutes les informations qui dirigent les activités des cellules de notre corps. L'ADN fournit une série d'instructions déterminant les caractères, transmissibles de parents à enfants, d'une personne tels que la couleur de ses yeux ou son groupe sanguin.

L'ADN est découpé en morceaux: les gènes. Chaque gène a un emplacement précis dans l'ADN.

Le syndrome du Long QT est une maladie génétique, c'est à dire secondaire à une atteinte de certains gènes, avec une possibilité de transmission de génération en génération. L'analyse génétique standard vise à rechercher des atteintes parmi les gènes connus comme responsables de la maladie. Ces atteintes sont appelées des mutations.

La connaissance de la mutation dans le cas du Long QT guide le traitement, les recommandations sur la pratique sportive et les habitudes de vies. Cela permet aussi une enquête génétique standard pour les membres de famille afin de diagnostiquer les patients atteints ou non de la maladie.

Dans certains cas, on ne trouve pas de mutations au niveau de ces différents gènes, mais ceci n'exclut pas que d'autres gènes non connus à ce jour puissent être à l'origine de la maladie du Long QT.

Nous avons actuellement des appareils de recherche performants qui nous permettent d'analyser l'ADN en entier. L'analyse génétique vise à décoder l'ordre des informations contenues dans les gènes. Dans cette étude, les chercheurs veulent décoder les informations de l'ensemble de l'ADN et non seulement des gènes connus. Ainsi, de nouvelles mutations responsables de votre maladie pourraient être identifiées.

But de l'étude:

Vous êtes atteint d'un syndrome du Long QT sans une étiologie génétique retrouvée. Dans environ un tiers des cas, on ne retrouve pas de gènes responsables de la maladie parmi les gènes connus. Le but de la cueillette d'un échantillon de sang et de l'extraction de votre ADN est de retrouver un ou des nouveaux gènes atteints responsables de la maladie. Chaque atteinte différente des gènes peut entraîner des signes différents de la maladie comme des signes plus à l'effort ou plus au repos. En cas de

consentement de votre part, nous rechercherons des liens entre vos symptômes présents dans votre dossier médical et les atteintes des gènes que l'on trouvera. Ces liens peuvent être importants pour guider le traitement et le type d'analyse génétique.

L'étude sera réalisée à l'Institut de Cardiologie de Montréal seulement.

DÉROULEMENT DE L'ÉTUDE

Si vous acceptez de participer à cette étude, nous prendrons un échantillon de votre sang (environ 10-20 ml soit 2-4 cuillères à thé). Ce prélèvement sera effectué à l'Institut de Cardiologie de Montréal par une infirmière et prendra 5 minutes. L'équipe de recherche consultera votre dossier médical pour obtenir les informations pertinentes au projet de recherche.

Votre participation se terminera après le prélèvement de sang et la révision de votre dossier médical. Il se peut que les chercheurs ou l'équipe médicale vous demande de contacter votre famille pour leur proposer de participer à l'étude. Il est de votre choix de refuser.

À la suite de votre participation, cette étude continuera seulement sur les échantillons de sang et les données médicales recueillies pendant une durée maximum de 15 ans, sans nécessité de participation de votre part.

CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS D'ADN

Nous protégeons la confidentialité des échantillons d'ADN et des données médicales en leur assignant un code spécifique. Ils ne seront pas identifiés, mais un code permettra de vous lier à l'échantillon et aux données médicales. Le décodage ne peut être fait que par la clinique génétique et non le laboratoire de recherche où est réalisé le projet. C'est la clinique génétique qui a donné à l'échantillon de sang le code après le prélèvement.

Des échantillons de votre ADN seront conservés à l'Institut de Cardiologie de Montréal dans le laboratoire de génétique pour une durée déterminée sous la responsabilité du Dr John D. Rioux. Tous les échantillons et les données médicales seront détruits au bout de 15 ans. Ils seront utilisés qu'aux fins du présent projet de recherche.

RISQUES ET INCONVÉNIENTS

Bien que les prises de sang ne causent pas de problèmes graves pour la plupart des gens, elles peuvent entraîner un inconfort à l'insertion de l'aiguille dans une veine de l'avant-bras.

Les effets secondaires possibles peuvent être aussi des malaises, étourdissements, des saignements, des ecchymoses (bleus), des douleurs, une inflammation de la veine à l'endroit où le prélèvement a été effectué. Il y a également un faible risque d'infection au site d'insertion de l'aiguille.

Un des risques associés à ce projet de recherche est lié au caractère génétique donc à la connaissance d'une nouvelle mutation présente possiblement chez les membres de la famille liés par le sang. Cela peut générer de l'anxiété ou de la souffrance psychologique ou morale pour vous et les membres de votre famille.

La connaissance d'une maladie génétique peut avoir aussi des conséquences en matière d'emploi et d'assurance, d'études pour vous et votre famille liés à la divulgation d'informations aux tiers (compagnies d'assurance, employeurs...), c'est la raison pour laquelle des mesures particulières visant à assurer la confidentialité et la protection de renseignements ont été mises en place. Des conséquences sur le bien-être moral et votre décision d'avoir ou non des enfants sont possibles, un soutien psychologique et un conseil génétique vous seront proposés.

Lors de l'analyse génétique de l'ADN en entier, nous pouvons mettre en évidence par hasard des atteintes de gènes responsables de maladies autres que le Long QT, même si nous ne les recherchons pas intentionnellement. Si vous donnez votre consentement à être informé des résultats, il se peut que vous soyez informé d'être atteint d'une maladie génétique autre que le syndrome du Long QT. Cette information ne portera que sur des maladies avec un risque significatif pour votre santé avec des mesures préventives ou un traitement disponible.

AVANTAGES

Aucun bénéfice direct découlant de votre participation à cette étude ne vous est garanti. Toutefois, il se peut que les informations recueillies et analysées soient profitables pour votre santé et celle de votre famille comme la découverte d'un nouveau gène. Nous espérons aussi que les résultats nous permettront de faire avancer l'état de nos connaissances au sujet de l'étiologie génétique des syndromes du Long QT et éventuellement, d'en faire profiter la société. Il se peut que les variations génétiques responsables de votre condition ne puissent être identifiées.

PARTICIPATION VOLONTAIRE

Vous êtes libre de participer à cette étude ou de vous en retirer en tout temps sur simple avis verbal sans avoir à préciser les motifs de votre décision. Vous pouvez prendre le temps de réfléchir et discuter de votre participation à ce projet avec vos proches avant de nous donner une réponse.

Si vous désirez vous retirer de ce projet de recherche et que votre échantillon soit détruit, contactez la clinique génétique de l'ICM qui veillera à transmettre votre demande et vous confirmera par écrit que votre échantillon a été détruit. Vos données médicales codées seront aussi détruites et ne serviront pas au projet de recherche.

Si vous décidez de ne pas y participer ou de vous en retirer, vous recevrez les soins médicaux usuels pour le traitement de votre condition. Quelle que soit votre décision, celle-ci n'influencera en rien la qualité des soins que vous êtes en droit de recevoir.

Vous serez informé de toute nouvelle découverte importante faite au cours de l'étude et susceptible d'influencer votre décision de maintenir ou non votre participation à l'étude. [94, 136]

Le laboratoire de recherche peut à tout moment mettre fin au projet de recherche sans votre consentement.

CONFIDENTIALITÉ

Durant votre participation à cette étude, l'équipe de recherche consultera votre dossier médical et recueillera des données personnelles et de santé (histoire médicale, examen physique, résultats de laboratoire) afin de réaliser ce projet de recherche. Les données personnelles utilisées par l'équipe de recherche seront codées.

A moins d'une autorisation expresse de votre part, d'une ordonnance de la cour ou de la loi, vos résultats personnels ne seront pas accessibles à des tiers tels qu'un employeur, un assureur ou une institution d'enseignement. Il en sera de même pour votre conjoint, les autres membres de votre famille et votre médecin.

Votre participation et les résultats de la recherche ne seront pas inscrits dans votre dossier médical, sauf si vous désirez être informé des résultats et que ceux-ci sont confirmés par le laboratoire d'analyses médicales de la clinique génétique.

L'équipe de recherche utilisera vos données et les analysera avec les données des autres participants pour réaliser ce projet de recherche. Pour protéger votre identité, vos données personnelles ne seront identifiées que par un code qui vous sera assigné en remplacement de votre nom. Vos renseignements personnels suivants: les données médicales et le prélèvement de sang seront consignés dans une banque de données pour permettre l'analyse des résultats et conservés pendant 15 ans au laboratoire du Dr Rioux. Les données révélant votre identité seront conservées à la clinique génétique sous la responsabilité de Dr. Talajic. Tous les dossiers de recherche seront conservés sous clé et dans des fichiers sécurisés pendant 15 ans.

Les personnes ayant accès à l'ordinateur dans lequel se trouvera la base de données reliant le code d'identification à votre identité devront avoir un mot de passe confidentiel et l'accès à ces données ne sera autorisé qu'au personnel habilité de la clinique génétique de l'ICM.

Aux fins de s'assurer du bon déroulement du projet, il est possible qu'un délégué du comité d'éthique de la recherche ou d'un organisme réglementaire tel que Santé Canada consulte les données de recherche et votre dossier médical.

Les résultats de cette étude seront publiés et diffusés, mais aucune information permettant de vous identifier ne sera alors dévoilée.

COMMUNICATION DES RESULTATS

Dans le cas où un résultat scientifique validé qui est significatif pour votre santé serait trouvé et que des mesures préventives ou un traitement sont disponibles, désirez vous en être informé ?

Oui ou **Non** (encerclez) _____ (initiales).

Si oui, cette information vous sera expliquée par le médecin ou la conseillère de la clinique génétique, Laura ROBB, lors d'une consultation à la clinique génétique; ces résultats seront versés à votre dossier médical.

Tout résultat pertinent issu du laboratoire de recherche devra être validé par le laboratoire d'analyses médicales de la clinique génétique, avec votre consentement, avant la mise en place d'un traitement, d'un conseil génétique et d'être inscrit dans votre dossier médical. Ce consentement vous sera demandé lors de la consultation où l'on vous informera du résultat.

L'information qui vous sera communiquée ne portera que sur les résultats de l'analyse génétique. Il se peut que l'on découvre de manière non intentionnelle des atteintes des gènes responsables de maladie autre que le Long QT. Ces informations vous seront communiquées si le risque est significatif pour votre santé et que des mesures préventives ou un traitement sont disponibles.

Les analyses dans votre famille peuvent révéler la non paternité ou maternité, mais ces résultats ne vous seront pas communiqués ni à vous ni à la clinique génétique.

En cas de refus d'être informé de vos résultats génétiques, les membres de la clinique génétique (votre médecin, la conseillère génétique) ne seront pas informés de votre diagnostic pour ne pas influencer votre traitement à votre insu.

Les chercheurs et leur équipe médicale ne communiqueront pas vos résultats à votre famille. Si un résultat génétique est découvert, ce sera à vous de décider d'en informer les membres de votre famille.

La communication de telles informations peut engendrer de l'anxiété pour vous et votre famille de même que des conséquences sur votre décision d'avoir ou non des enfants. Si vous désirez recevoir un soutien psychologique, les médecins de la clinique génétique pourront vous mettre en contact avec une personne qui pourra vous aider. À tout moment, vous pourrez rencontrer une conseillère en génétique. En cas de découverte d'une autre maladie ne relevant pas des compétences de la clinique génétique de l'institut Cardiologie de Montréal, vous serez si vous consentez à être informé, orienté vers un centre compétent pour la validation du diagnostic et la suite de la prise en charge.

RECRUTEMENT DES AUTRES MEMBRES DE VOTRE DE LA FAMILLE

Il est possible que l'on demande à vous ou à une personne que vous désignez de contacter d'autres membres de votre famille afin de leur offrir de participer à l'étude. Les chercheurs et leur équipe médicale ne peuvent eux-mêmes entrer en contact avec les membres de votre famille pour un tel recrutement.

Par contre si un membre de votre famille est suivi à la clinique de génétique de l'ICM, il se peut qu'on lui propose le projet de recherche.

COMPENSATION

Dans l'éventualité où vous seriez victime d'un préjudice causé par l'étude ou par toute autre procédure requise par le protocole de recherche, l'Institut de Cardiologie de Montréal veillera à ce que vous receviez tous les soins que nécessite votre état de santé.

Si votre participation engendrait d'autres coûts qui ne sont pas présentement assurés par les régimes d'assurance-hospitalisation et d'assurance-maladie du Québec, ceux-ci ne sont pas couverts. Vous

devrez donc en déboursier les frais. De plus, aucune compensation pour perte de revenus, invalidité ou inconfort n'est prévue.

La validation des tests génétiques dans le laboratoire de la clinique génétique et autres laboratoires cliniques n'est pas prise en charge par l'équipe de recherche.

Toutefois, en signant ce formulaire de consentement, vous ne renoncez à aucun de vos droits. Notamment, vous ne libérez pas l'investigateur de ses responsabilités légales et professionnelles advenant une situation qui vous causerait préjudice.

Si vous encourez des dépenses pour participer à ce projet de recherche (ex : stationnement), veuillez discuter avec l'infirmière de recherche de la possibilité d'en obtenir le remboursement et de la procédure à suivre.

IDENTIFICATION DES PERSONNES-RESSOURCES

Si vous avez des questions concernant le projet de recherche ou si vous éprouvez un problème que vous croyez relié à votre participation au projet de recherche, vous pouvez communiquer avec le chercheur responsable du projet de recherche aux numéros suivants :

Vous pouvez communiquer en tout temps avec :

Institut de Cardiologie de Montréal

Dr Talajic, MD, Chercheur : Tél. : (514) 376-3330, poste 3652 Madame Laura ROBB, conseillère en génétique: Tél. : (514) 376-3330, poste 3525 Mardi/Mercredi/Jeudi

Pour toute question concernant vos droits en tant que sujet participant à ce projet de recherche ou si vous avez des plaintes ou des commentaires à formuler vous pouvez communiquer avec le commissaire local aux plaintes et à la qualité des services de l'Institut de Cardiologie de Montréal au numéro suivant : (514) 376-3330 poste 3398.

FORMULAIRE DE CONSENTEMENT

PROJET DE RECHERCHE : ICM #11-1310

Analyses phénotypique et génétique du syndrome du Long QT

GénoLQT

Investigateur principal et collaborateurs

John D. Rioux PhD.; Mario Talajic M.D.; Lena Rivard M.D.; Laura Robb MSc.; Marie-A Chaix M.D.; Philippe Goyette PhD.; Guillaume Lettre PhD.; Blandine Mondesert M.D.

Fondation de l'Institut de Cardiologie de Montréal

J'ai eu l'occasion de poser toutes les questions voulues au sujet de ce projet et on y a répondu à ma satisfaction.

Je comprends que je demeure libre de me retirer de ce projet en tout temps sans que cela n'affecte en aucune façon les soins dont je pourrais bénéficier à l'avenir.

J'ai lu ou l'on m'a lu ce formulaire de consentement et j'en comprends le contenu. Je, soussigné(e), accepte de participer au présent projet de recherche. J'accepte que mon médecin de famille soit informé de ma participation à ce projet : **oui**

Signature du patient Nom du patient en lettres moulées Date (a/m/j)

Signature de l'un des chercheurs Nom du chercheur en lettres moulées Date (a/m/j) Nom Date Heure

Je certifie que j'ai expliqué les buts du projet à _____ et il(elle) a signé le consentement en ma présence.

Signature du chercheur ou de son Nom du chercheur ou de son délégué Date (a/m/j) Heure délégué en lettres moulées

FORMULAIRE DE CONSENTEMENT

PROJET DE RECHERCHE : ICM #11-1310

Analyses phénotypique et génétique du syndrome du Long QT

Membre de la famille

GénoLQT

Investigateur principal et collaborateurs

John D. Rioux Ph.D.; Mario Talajic M.D.; Lena Rivard M.D.; Laura Robb MSc.; Marie-A Chaix M.D.; Philippe Goyette Ph.D.; Guillaume Lettre Ph.D.; Blandine Mondesert M.D.

Fondation de l'Institut de Cardiologie de Montréal

INFORMATION

DESCRIPTION GÉNÉRALE

Nous vous invitons à participer à un projet de recherche parce que vous êtes un membre de la famille de quelqu'un atteint d'un syndrome du Long QT.

Ce projet est financé par des fonds du laboratoire du Dr John D. Rioux subventionné par la FICM (Fondation de l'Institut de Cardiologie de Montréal).

Avant de signer ce formulaire de consentement, veuillez prendre tout le temps nécessaire pour lire (ou vous faire lire) et comprendre l'information présentée ci-dessous. Vous pouvez consulter vos proches avant de prendre votre décision. Veuillez poser à votre médecin ou à l'équipe de recherche toutes les questions que vous avez sur la présente étude et sur vos droits. Ils devraient être en mesure de répondre à toutes vos questions.

Contexte :

L'ADN est une molécule qui renferme toutes les informations qui dirigent les activités des cellules de notre corps. L'ADN fournit une série d'instructions déterminant les caractères, transmissibles de parents à enfants, d'une personne tels que la couleur de ses yeux ou son groupe sanguin.

L'ADN est découpé en morceaux: les gènes. Chaque gène a un emplacement précis dans l'ADN.

Le syndrome du Long QT est une maladie génétique, c'est à dire secondaire à une atteinte de certains gènes, avec une possibilité de transmission de génération en génération. Ce syndrome est à risque de perte de connaissance et de mort subite cardiaque. Certaines personnes présentent les atteintes des gènes sans avoir les manifestations de la maladie, celles-ci peuvent survenir plus tard dans la vie ou ne jamais apparaître.

L'analyse génétique standard vise à rechercher des atteintes parmi les gènes connus comme responsables de la maladie. Ces atteintes sont appelées des mutations.

La connaissance de la mutation dans le cas du Long QT guide le traitement, les recommandations sur la pratique sportive et les habitudes de vies.

Cela permet aussi une enquête génétique standard pour les membres de famille afin de diagnostiquer les patients atteints ou non de la maladie. Chez un patient ne présentant pas les manifestations de la maladie, le médecin peut mettre en place un traitement préventif.

Dans certains cas, on ne trouve pas de mutations au niveau de ces différents gènes, mais ceci n'exclut pas que d'autres gènes non connus à ce jour puissent être à l'origine de la maladie du Long QT. Nous avons actuellement des appareils de recherche performants qui nous permettent d'analyser l'ADN en entier. L'analyse génétique vise à décoder l'ordre des informations contenues dans les gènes. Dans cette étude, les chercheurs veulent décoder les informations de l'ensemble de l'ADN et non seulement des gènes connus. Ainsi de nouvelles mutations responsables de votre maladie pourraient être identifiées.

But de l'étude:

Vous êtes un membre de la famille d'un patient atteint d'un syndrome du QT long. pour lequel aucune atteinte de gène n'a été retrouvée après une analyse génétique standard. Dans environ un tiers des cas, on ne retrouve pas de gènes responsables de la maladie parmi les gènes connus.

Le but de la cueillette d'un échantillon de sang et de l'extraction de votre ADN est de retrouver un ou des nouveaux gènes atteints responsables de la maladie par des nouveaux appareils qui analyse l'ADN en entier.

L'étude sera réalisée à l'Institut de Cardiologie de Montréal seulement, et plus particulièrement dans le cadre de la clinique génétique.

Les patients atteints d'une maladie génétique cardiaque sont suivis par l'équipe médicale de la clinique génétique qui comporte des médecins, dont le Dr Talajic et la conseillère génétique, Laura ROBB, et du personnel administratif.

DÉROULEMENT DE L'ÉTUDE

Si vous acceptez de participer à cette étude, nous prendrons un échantillon de votre sang (environ 10-20 ml soit 2-4 cuillères à thé). Ce prélèvement sera effectué à l'Institut de Cardiologie de Montréal par une infirmière et prendra 5 minutes.

Votre participation se terminera après le prélèvement de sang.

À la suite de votre participation, cette étude continuera seulement sur l'échantillon d'ADN pendant une durée maximum de 15 ans, sans nécessité de participation de votre part.

CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS D'ADN

Nous protégeons la confidentialité des échantillons d'ADN en leur assignant un code spécifique. Votre échantillon d'ADN ne sera pas identifié, mais un code permettra de vous lier à l'échantillon. Le décodage ne peut être fait que par la clinique génétique et non le laboratoire de recherche où est réalisé le projet. C'est la clinique génétique qui a donné à l'échantillon de sang le code après le prélèvement.

Des échantillons de votre ADN seront conservés à l'Institut de Cardiologie de Montréal dans le laboratoire de génétique pour une durée déterminée sous la responsabilité du Dr John D. Rioux. Tous les échantillons seront détruits au bout de 15 ans. Votre échantillon sera utilisé qu'aux fins du présent projet de recherche.

RISQUES ET INCONVÉNIENTS

Bien que les prises de sang ne causent pas de problèmes graves pour la plupart des gens, elles peuvent entraîner un inconfort à l'insertion de l'aiguille dans une veine de l'avant-bras. Les effets secondaires possibles peuvent être aussi des malaises, étourdissements, des saignements, des ecchymoses (bleus), des douleurs, une inflammation de la veine à l'endroit où le prélèvement a été effectué. Il y a également un faible risque d'infection au site d'insertion de l'aiguille.

En l'absence de symptômes, vous vous considérez non atteint d'un syndrome du Long QT. La découverte d'une mutation peut entraîner de l'anxiété, de la souffrance physique et psychologique suite à la prise de conscience de la possibilité d'apparition de symptômes de la maladie. Ceci pourrait conduire à d'autres examens et la mise en place d'un traitement préventif.

Un des risques associés à ce projet de recherche est lié au caractère génétique donc à la connaissance d'une nouvelle mutation présente possiblement chez les membres de la famille liés par le sang. Cela peut générer de l'anxiété ou de la souffrance psychologique ou morale pour vous et les membres de votre famille.

La connaissance d'une maladie génétique peut avoir aussi des conséquences en matière d'emploi et d'assurance, d'études pour vous et votre famille liés à la divulgation d'informations aux tiers (compagnies d'assurance, employeurs...), c'est la raison pour laquelle des mesures particulières visant à assurer la confidentialité et la protection de renseignements ont été mises en place. Des conséquences

sur le bien-être moral et votre décision d'avoir ou non des enfants sont possibles, un soutien psychologique et un conseil génétique vous seront proposés.

Lors de l'analyse génétique de l'ADN en entier, nous pouvons mettre en évidence par hasard des atteintes de gènes responsables de maladies autres que le Long QT, même si nous ne les recherchons pas intentionnellement. Si vous donnez votre consentement à être informé des résultats, il se peut que vous soyez informé d'être atteint d'une maladie génétique autre que le syndrome du Long QT. Cette information ne portera que sur des maladies avec un risque significatif pour votre santé avec des mesures préventives ou un traitement disponible.

AVANTAGES

Aucun bénéfice direct découlant de votre participation à cette étude ne vous est garanti. Toutefois, il se peut que les informations recueillies et analysées soient profitables pour votre santé et celle de votre famille comme la découverte d'un nouveau gène. Nous espérons aussi que les résultats nous permettront de faire avancer l'état de nos connaissances au sujet de l'étiologie génétique des syndromes du Long QT et éventuellement, d'en faire profiter la société. Il se peut que les variations génétiques responsables de votre condition ne puissent être identifiées.

PARTICIPATION VOLONTAIRE

Vous êtes libre de participer à cette étude ou de vous en retirer en tout temps sur simple avis verbal sans avoir à préciser les motifs de votre décision. Vous pouvez prendre le temps de réfléchir et discuter de votre participation à ce projet avec vos proches avant de nous donner une réponse.

Si vous désirez vous retirer de ce projet de recherche et que votre échantillon soit détruit, contactez la clinique génétique de l'ICM qui veillera à transmettre votre demande et vous confirmera par écrit que votre échantillon a été détruit. Vos données médicales codées seront aussi détruites et ne serviront pas au projet de recherche.

Si vous décidez de ne pas y participer ou de vous en retirer, vous recevrez les soins médicaux usuels pour le traitement de votre condition. Quelle que soit votre décision, celle-ci n'influencera en rien la qualité des soins que vous êtes en droit de recevoir.

Vous serez informé de toute nouvelle découverte importante faite au cours de l'étude et susceptible d'influencer votre décision de maintenir ou non votre participation à l'étude.

Le laboratoire de recherche peut à tout moment mettre fin au projet de recherche sans votre consentement.

CONFIDENTIALITÉ

À moins d'une autorisation expresse de votre part, d'une ordonnance de la cour ou de la loi, vos résultats personnels ne seront pas accessibles à des tiers tels qu'un employeur, un assureur ou une institution d'enseignement. Il en sera de même pour votre conjoint, les autres membres de votre famille et votre médecin.

L'équipe de recherche utilisera vos données et les analysera avec les données des autres participants pour réaliser ce projet de recherche. Pour protéger votre identité, vos données personnelles ne seront identifiées que par un code qui vous sera assigné en remplacement de votre nom. Le prélèvement de sang sera consigné dans une banque de données pour permettre l'analyse des résultats et conservé pendant 15 ans au laboratoire du Dr Rioux. Les données révélant votre identité seront conservées à la clinique génétique sous la responsabilité de Dr. Talajic. Tous les dossiers de recherche seront conservés sous clé et dans des fichiers sécurisés pendant 15 ans.

Les personnes ayant accès à l'ordinateur dans lequel se trouvera la base de données reliant le code d'identification à votre identité devront avoir un mot de passe confidentiel et l'accès à ces données ne sera autorisé qu'au personnel habilité de la clinique génétique de l'ICM.

Aux fins de s'assurer du bon déroulement du projet, il est possible qu'un délégué du comité d'éthique de la recherche ou d'un organisme réglementaire tel que Santé Canada consulte les données de recherche et votre dossier médical.

Les résultats de cette étude seront publiés et diffusés, mais aucune information permettant de vous identifier ne sera alors dévoilée.

COMMUNICATION DES RÉSULTATS

Dans le cas où un résultat scientifique validé qui est significatif pour votre santé serait trouvé et que des mesures préventives ou un traitement sont disponibles, désirez vous en être informé ?

Oui ou **Non** (encerclez) _____ (initiales).

Si oui, cette information vous sera expliquée par le médecin ou la conseillère de la clinique génétique, Laura ROBB, lors d'une consultation à la clinique génétique; ces résultats seront versés à votre dossier médical seulement si vous avez un dossier à l'Institut de Cardiologie de Montréal.

Tout résultat pertinent issu du laboratoire de recherche devra être validé par le laboratoire d'analyses médicales de la clinique génétique, avec votre consentement, avant la mise en place d'un traitement, d'un conseil génétique.

À la suite de l'annonce du résultat issu du laboratoire de recherche, vous aurez le choix d'ouvrir votre dossier médical à la clinique génétique de l'ICM. Le résultat de recherche sera validé à l'ICM. En cas de refus, vous serez orienté vers un autre centre compétent disponible pour la validation du résultat et la suite de la prise en charge.

L'information qui vous sera communiquée ne portera que sur les résultats de l'analyse génétique. Il se peut que l'on découvre de manière non intentionnelle des atteintes des gènes responsables de maladie autre que le Long QT. Ces informations vous seront communiquées si le risque est significatif pour votre santé et que des mesures préventives ou un traitement sont disponibles.

Les analyses dans votre famille peuvent révéler la non paternité ou maternité, mais ces résultats ne vous seront pas communiqués ni à vous ni à la clinique génétique.

En cas de refus d'être informé de vos résultats génétiques, les membres de la clinique génétique (votre médecin, la conseillère génétique) ne seront pas informés de votre diagnostic pour ne pas influencer votre traitement à votre insu.

Les chercheurs et leur équipe médicale ne communiqueront pas vos résultats à votre famille. Si un résultat génétique est découvert, ce sera à vous de décider d'en informer les membres de votre famille.

La communication de telles informations peut engendrer de l'anxiété pour vous et votre famille de même que des conséquences sur votre décision d'avoir ou non des enfants. Si vous désirez recevoir un soutien psychologique, les médecins de la clinique génétique pourront vous mettre en contact avec une personne qui pourra vous aider. À tout moment, vous pourrez rencontrer une conseillère en génétique. En cas de découverte d'une autre maladie ne relevant pas des compétences de la clinique génétique de l'Institut de Cardiologie de Montréal, vous serez si vous consentez à être informé, orienté vers un centre compétent pour la validation du diagnostic et la suite de la prise en charge.

COMPENSATION

Dans l'éventualité où vous seriez victime d'un préjudice causé par l'étude ou par toute autre procédure requise par le protocole de recherche, l'Institut de Cardiologie de Montréal veillera à ce que vous receviez tous les soins que nécessite votre état de santé.

Si votre participation engendrait d'autres coûts qui ne sont pas présentement assurés par les régimes d'assurance-hospitalisation et d'assurance-maladie du Québec, ceux-ci ne sont pas couverts. Vous devrez donc en déboursier les frais. De plus, aucune compensation pour perte de revenus, invalidité ou inconfort n'est prévue. La validation des tests génétiques dans le laboratoire de la clinique génétique n'est pas prise en charge par l'équipe de recherche.

Toutefois, en signant ce formulaire de consentement, vous ne renoncez à aucun de vos droits. Notamment, vous ne libérez pas l'investigateur de ses responsabilités légales et professionnelles advenant une situation qui vous causerait préjudice.

Si vous encourez des dépenses pour participer à ce projet de recherche (ex : stationnement), veuillez discuter avec l'infirmière de recherche de la possibilité d'en obtenir le remboursement et de la procédure à suivre.

IDENTIFICATION DES PERSONNES-RESSOURCES

Si vous avez des questions concernant le projet de recherche ou si vous éprouvez un problème que vous croyez relié à votre participation au projet de recherche, vous pouvez communiquer avec le chercheur responsable du projet de recherche aux numéros suivants :

Vous pouvez communiquer en tout temps avec :

Institut de Cardiologie de Montréal

Dr Talajic, MD, Chercheur : Tél. : (514) 376-3330, poste 3652 Madame Laura ROBB, conseillère en génétique: Tél. : (514) 376-3330, poste 3525 Mardi/Mercredi/Jeu

Pour toute question concernant vos droits en tant que sujet participant à ce projet de recherche ou si vous avez des plaintes ou des commentaires à formuler vous pouvez communiquer avec le commissaire local aux plaintes et à la qualité des services de l'Institut de Cardiologie de Montréal au numéro suivant : (514) 376-3330 poste 3398.

FORMULAIRE DE CONSENTEMENT

PROJET DE RECHERCHE : ICM #11-1310

Analyses phénotypique et génétique du syndrome du Long QT

Membre de la famille

GénoLQT

Investigateur principal et collaborateurs

John D. Rioux PhD.; Mario Talajic M.D.; Lena Rivard M.D.; Laura Robb MSc.; Marie-A Chaix M.D.; Philippe Goyette PhD.; Guillaume Lettre PhD.; Blandine Mondesert M.D.

Fondation de l'Institut de Cardiologie de Montréal

J'ai eu l'occasion de poser toutes les questions voulues au sujet de ce projet et on y a répondu à ma satisfaction.

Je comprends que je demeure libre de me retirer de ce projet en tout temps sans que cela n'affecte en aucune façon les soins dont je pourrais bénéficier à l'avenir.

J'ai lu ou l'on m'a lu ce formulaire de consentement et j'en comprends le contenu. Je, soussigné(e), accepte de participer au présent projet de recherche.

Signature du patient Nom du patient en lettres moulées Date (a/m/j) Heure

Signature de l'un des chercheurs Nom du chercheur en lettres moulées Date (a/m/j) Heure

Je certifie que j'ai expliqué les buts du projet à _____ et il(elle) a signé le consentement en ma présence.

Signature du chercheur ou de son Nom du chercheur ou de son délégué Date (a/m/j) Heure délégué en lettres moulées

Appendice M4 : Définitions de termes du protocole expérimental.

Chambre de réaction ou « Flow-cell » : La chambre de réaction est une plaque sur laquelle sont disposés les échantillons d'ADN pour le séquençage à haut débit. Chaque chambre de réaction contient 8 **pistes ou « lanes »**, qui correspondent à 8 emplacements en ligne. Les échantillons d'ADN sont disposés dans les différentes pistes par un appareil automatisé appelé c-bot fourni par la compagnie Illumina. La chambre de réaction est recouverte d'adaptateurs complémentaires aux adaptateurs qui ont été hybridés avec les fragments d'ADN issus de chaque échantillon. Ainsi, les brins d'ADN vont s'apparier de façon complémentaire aux adaptateurs de la chambre de réaction.

Adaptateur : L'adaptateur, lié au fragment d'ADN lors de la préparation, contient une séquence d'ADN appelée **index** différente pour chaque échantillon permettant d'identifier l'échantillon, et des séquences complémentaires aux adaptateurs présents sur la chambre de réaction. Ces séquences d'ADN sont liées aux deux extrémités de chaque brin d'ADN. Ces adaptateurs ont pour fonction de permettre l'appariement de façon complémentaire aux adaptateurs de la chambre de réaction, la liaison des amorces pour le séquençage, et l'identification des brins d'ADN.

Groupe de fragments d'ADN ou « cluster » : Un cluster correspond à l'amplification d'un brin d'ADN issu de la fragmentation de l'ADN d'un échantillon. Ce cluster est formé lors de l'amplification par PCR en pont suivant 3 étapes: (1) le brin d'ADN s'apparie de façon complémentaire sur la chambre de réaction par ses adaptateurs, (2) s'en suit une réaction de PCR sur ce brin d'ADN puis l'ADN est dénaturé en monobrin, (3) le brin d'ADN accroché à la chambre de réaction va s'apparier avec un autre adaptateur complémentaire formant un pont à l'origine d'une nouvelle réaction de PCR. Plusieurs réactions de ce type se font formant une zone de multiples brins d'ADN issue de l'amplification d'un seul brin d'ADN avec un même index issu d'un même échantillon. Un cluster est défini par une position sur la chambre de réaction, et par son index l'attribuant à tel individu.

Séquençage au niveau des 2 extrémités d'un fragment d'ADN ou « Lecture paire-end » : Une lecture paire end est une lecture en 5' et en 3' du brin d'ADN. La première lecture se fait dans le sens 5'-3' puis la deuxième dans le sens 3'-5'. Les 2 lectures sont d'une centaine de paires de bases chacune, sachant que certains de nos fragments sont plus gros que 200bp, les séquences peuvent ne pas se chevaucher.

Ce type de séquençage permet d'obtenir une meilleure couverture de l'ADN. Le séquençage se base sur la méthode de ligation, une fois que le nucléotide complémentaire s'apparie au brin d'ADN, une

fluorescence de couleur spécifique de la nucléotide est émise au niveau du cluster La même fluorescence dans tout le cluster permet au séquenceur de détecter la lumière par amplification du signal. Et ainsi de suite pour l'ensemble du brin d'ADN.

First base report : c'est un rapport émis par HiSeq2000 pour évaluer le début du séquençage, dont les valeurs normales sont détaillées dans le tableau ci-dessous.

	Valeurs normales
Densité des clusters (K/mm2)	350-400
Intensité de A	>10000
Intensité de C	>10000
Intensité de G	>10000 and <A,C,T
Intensité de T	>10000
A Focus score	50-80
C Focus score	50-80
G Focus score	50-80
T Focus score	50-80

Sequencing analysis viewer : Lors de la préparation, des ADNs doubles brins synthétiques comportant déjà les modifications apportées par les étapes précédentes sont insérés aux bibliothèques, ils sont les témoins du bon déroulement de l'étape en cours. Lors du séquençage, ces ADNs sont détectés, en cas d'absence ils sont témoins de l'échec de l'étape. Le résultat est disponible pour chaque bibliothèque selon des graphiques couleurs appelés « Sequencing Analysis viewer ».

dbSNP138 (database of single nucleotide polymorphisms) est une base de données publiques qui répertorie toutes les variantes génétiques identifiées dans le génome humain, elle comprend en outre les données de 1Kgenome et ESP.

1Kgenome ou 1000 génomes est un projet de séquençage à haut débit de 1000 génomes qui a permis de répertorier l'ensemble des variantes avec une fréquence de plus de 1% parmi ces 1000 génomes.

HapMap (Haplotype Map) est un catalogue des variations génétiques les plus fréquentes chez l'humain sur 270 personnes de différentes origines africaine, asiatique et européenne issues d'une étude de génotypage parmi des SNPs sélectionnés dans dbSNP, afin de développer des cartes d'haplotypes.

ESP6500 (exome sequencing projet) répertorie les variantes issues du séquençage exomique de 6500 individus recrutés aux États-Unis. Ce projet avait pour objectif de rechercher de nouveaux gènes associés à des traits complexes de pathologies cardiaques, pulmonaires et hématologiques.

SNPs issus QTSCD	Chr Genes	SNPs issus de QTGEN	Chr Genes
rs846111	1 RNF207	rs846111	1 RNF207, NPHP4, CHDS, ACOT7, PLEKHG5, KLH21
rs12143842	1 NOS1AP	rs12143842 rs12029454 S16857031	1 NOS1AP
s10919071	1 ATP1B1		
rs11129795	3 SCN5A	rs12053903	3 SCN5A
rs11970286	6 SLC35F1- PLN- C6orf204	rs11756438	6 c6orf204 SLC35F1, PLN, ASF1A
rs2968863	7 KCNH2	rs4725982 rs2968864	7 KCNH2
rs12296050	11 KCNQ1	rs2074238 rs12576239	11 KCNQ1
rs8049607	16 LITAF	rs8049607	16 LITAF CLEC16A, SNN, ZC3H7A, TNFRSF17
rs7188697	16 GINS3- NDRG4- SETD6- CNOT1	rs37062	16 CNOT1 GINS3, NDRG4, SLC38A7, GOT2
rs17779747	17 KCNJ2		
		rs1805128	21 KCNE1
		rs2074518	17 LIG3 RFFL

Appendice M5 : Les loci associés aux valeurs extrêmes supérieures d'un intervalle QTc dans une population générale issus de QTSCD et QTGEN.

Les locis issus des études de GWAs se recourent pour la plupart. Pour chaque locus, plusieurs gènes peuvent représenter des candidats possibles à l'allongement de l'intervalle QTc.

Appendice R1: Fiches détaillées contenant le profil, la clinique, l'origine et l'arbre familial généalogique des 12 patients recrutés à l'ICM pour l'étude génétique de WES.

Patient 1 :

Age : 37 ans, sexe féminin

Histoire familiale : mort subite inexpliquée chez le grand père à 45 ans, mère connue pour faire des ESV dès l'âge de 25 ans.

Signes fonctionnels : début à l'âge de 28 ans, syncopes à répétition, signes dysmorphiques.

Signes électrocardiographiques : QTc le plus long=482msec, QUc=620msec, Arythmies ventriculaires : importantes avec tachycardie ventriculaires non soutenues polymorphes, nombreuses ESV bigémismes et torsades de pointes authentifiées.

Echocardiographie : normale

Traitement : Béta-bloquants, défibrillateur, pacemaker

Score Diagnostique=5, haute probabilité de LQTS

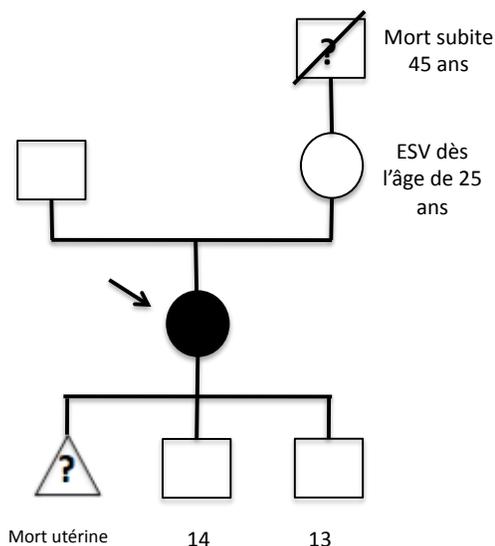
3- >ou égal à 480 ms,

2-Torsades de pointes (annulant l'item syncope)

Origine :

	maternel	paternel
Grand père	québécois	québécois
Grand mère	belge	québécois

Arbre familial :



Patient 2 :

Age : 42 ans, sexe féminin

Histoire familiale : mort subite inexplicée chez l'oncle maternelle à 60 ans et une cousine à 46 ans.

Signes fonctionnels : début à l'âge de 19 ans, syncopes à répétition,

Signes électrocardiographiques : QTc le plus long=469msec (*Commentaires : pas un seul ECG sans traitement médicamenteux à l'origine de l'allongement du QTc, QTc max=469 sous rythmol et flecaine mais pas sous cordarone. DAI suite à TdP et récides syncopes sous trt médicamenteux*), Arythmies ventriculaires : importantes avec tachycardie ventriculaires non polymorphes, fibrillation ventriculaire à l'EPS puis choqué par son défibrillateur, nombreuses torsades de pointes authentifiées.

Echocardiographie : normale

Traitement : Béta-bloquants, défibrillateur, pacemaker

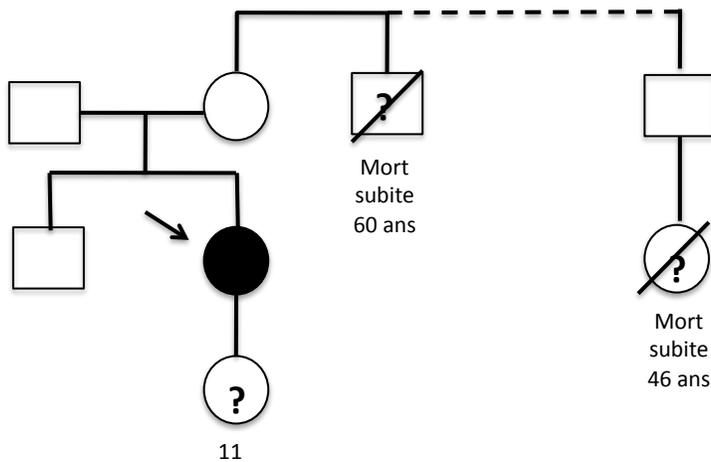
Score Diagnostique=2, probabilité intermédiaire de LQTS

2-torsades de pointes ou syncope

Origine :

	maternel	paternel
Grand père	québécois (3Rivières)	québécois (3 Rivières)
Grand mère	québécois (3 Rivières)	québécois (3 Rivières)

Arbre familial :



Patient 3 :

Age : 55 ans, sexe féminin

Histoire familiale : mort subite inexplicée chez le père à 51 ans, cousine mort subite à 26 ans (on n'a pas d'informations sur le côté maternelle ou paternelle de la cousine), neveu syncope et palpitations

Signes fonctionnels : début à l'âge de 52ans, palpitations

Signes électrocardiographiques : QTc le plus long=474msec, Arythmies ventriculaires : importantes avec tachycardie ventriculaires non soutenues et nombreuses ESV

Echocardiographie : normale

Traitement : Béta-bloquants,

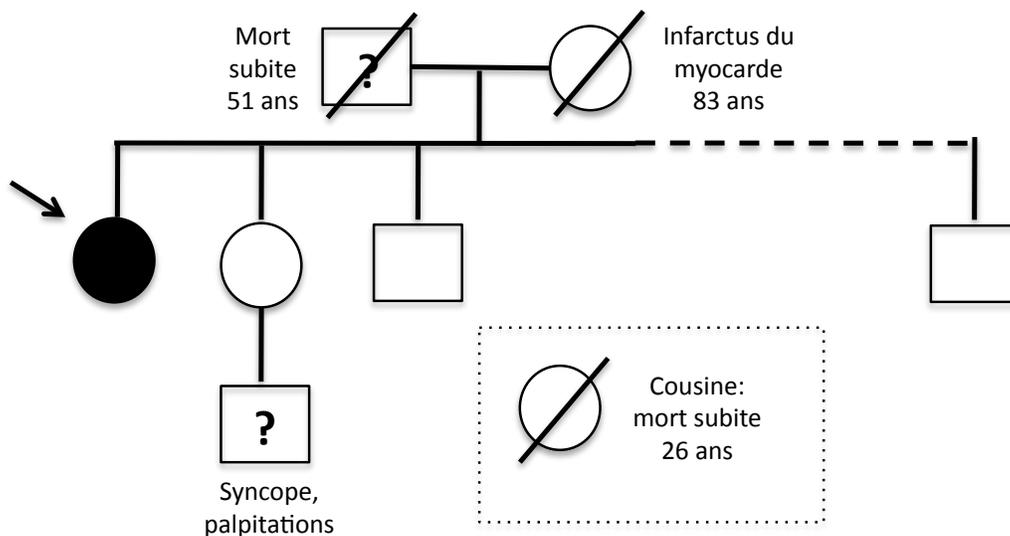
Score Diagnostique =2, probabilité intermédiaire de LQTS

2-QTc 460-479ms

Origine :

	maternel	paternel
Grand père	Québécois	Québécois
Grand mère	Québécois (arrière-grand père Français)	Québécois

Arbre familial :



Patient 4 :

Age : 59 ans, sexe masculin

Histoire familiale : mort subite cardiaque chez le père à 54 ans coronarien, mort subite chez la sœur 42 ans maladie cérébrale ?

Signes fonctionnels : début à l'âge de 42 ans, syncope nocturne (témoin sa femme arrêt respiratoire et reprise conscience spontanée)

Signes électrocardiographiques : QTc le plus long=571msec

Echocardiographie : normale

Traitement : Béta-bloquants

Score Diagnostique=5, haute probabilité de LQTS

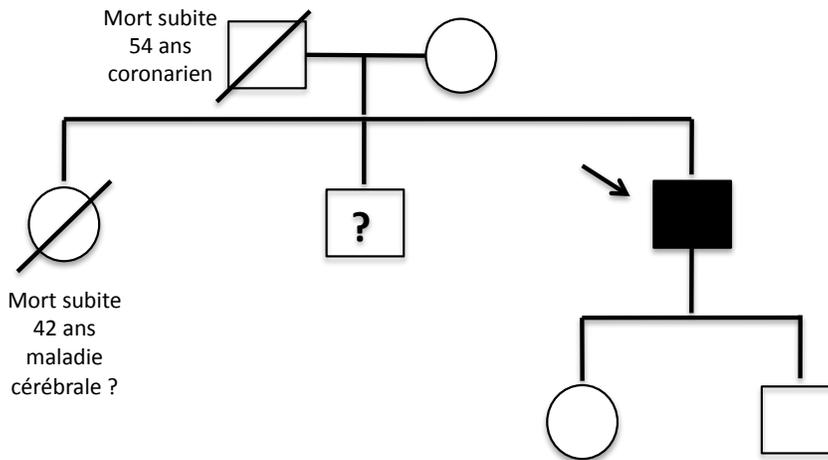
3- >ou égal à 480 ms,

2- Syncope

Origine :

	maternel	paternel
Grand père	Québécois	Québécois
Grand mère	Québécois	Québécois

Arbre familial :



Patient 5 :

Age : 23 ans, sexe féminin

Histoire familiale : pas d'antécédents familiaux particuliers

Signes fonctionnels : mort subite récupérée à 14 ans syncope sur FV identifiée, syncope sans arythmies enregistrée au niveau du DAI vaguale ?

Signes électrocardiographiques : QTc le plus long=464msec

Echocardiographie : normale

Traitement : Béta-bloquants, défibrillateur

Score Diagnostique > ou égal à 3.5 haute probabilité de LQTS

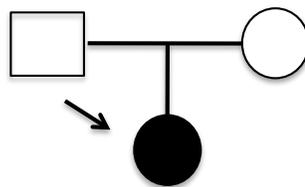
2-QTc entre 460-479ms

2-Syncope

Origine :

	maternel	paternel
Grand père	Québécois	Québécois
Grand mère	Québécois	Québécois

Arbre familial :



Patient 6 :

Age : 47 ans, sexe féminin

Histoire familiale : syncope non explorée chez sa mère et soeur

Signes fonctionnels : début à l'âge de 33 ans, 3 syncopes avec mise en évidence de torsades de pointes

Signes électrocardiographiques : QTc le plus long=453msec (commentaire: QTc allongé mais valeur non disponible dans la dossier médical donc non compter pour le score diagnostique), Arythmies ventriculaires : torsades de pointes documentés lors des syncopes

Echocardiographie : normale

Traitement : Béta-bloquants, défibrillateur

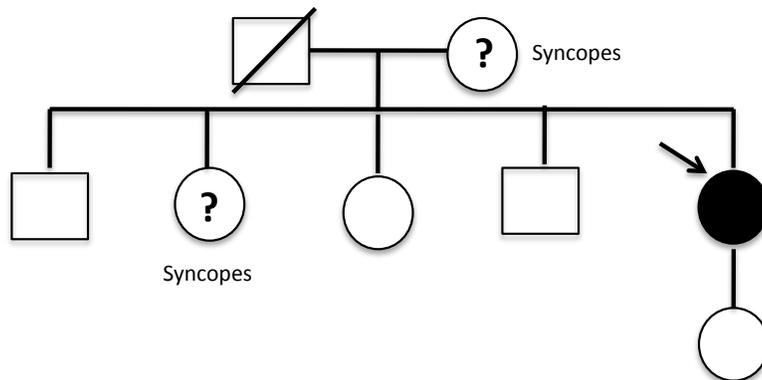
Score Diagnostique=2, probabilité intermédiaire de LQTS

2-Torsades de pointes (annulant l'item syncope)

Origine :

	maternel	paternel
Grand père	Québécois (Québec)	Québécois (Laval)
Grand mère	Québécois (Québec)	Québécois

Arbre familial :



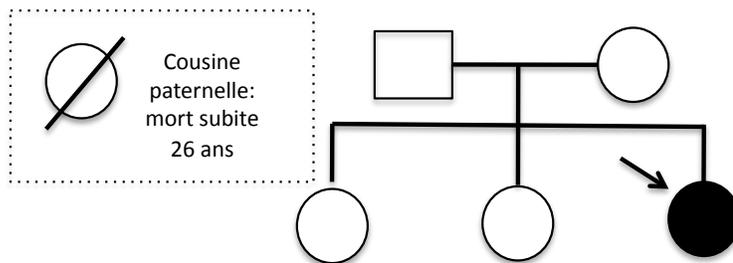
Patient 7 :

Phénotype détaillé dans la partie résultats.

Origine :

	maternel	paternel
Grand père	québécois	québécois
Grand mère	québécois	québécois

Arbre familial :



Patient 8 :

Age : 63 ans, sexe masculin

Histoire familiale : mort subite inexplicée cousine 46 ans

Signes fonctionnels : début à l'âge de 61 ans, arrêt cardiaque récupérée sur FV avec retour au rythme sinusal après CEE, syncopes avec prodromes

Signes électrocardiographiques : QTc le plus long=490msec, ondes T pointues, FV

Echocardiographie : normale

Traitement : Béta-bloquants, défibrillateur, pacemaker

Score Diagnostique=4, haute probabilité de LQTS

3- >ou égal à 480 ms,

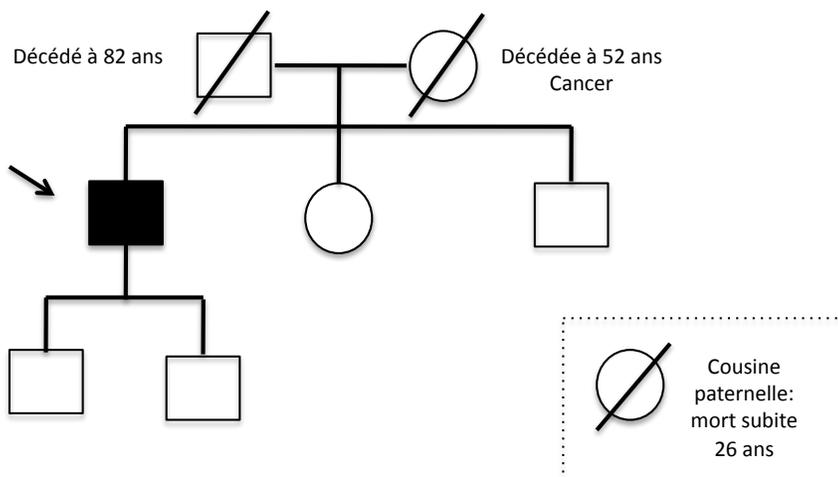
1-ondes T pointues

1-syncopes sans stress

Origine :

	maternel	paternel
Grand père	Belgique	Québec
Grand mère	France Bretagne	Québec

Arbre familial :



Patient 9 :

Age : 55 ans, sexe masculin

Histoire familiale : pas d'antécédents particuliers

Signes fonctionnels : début à l'âge de 52 ans, arrêt cardiaque récupéré sur fibrillation ventriculaire, coronarographie et IRM normale, test pronestyl négatif.

Signes électrocardiographiques : QTc le plus long=496msec, fibrillation ventriculaire

Echocardiographie : normale

Traitement : Béta-bloquants, défibrillateur

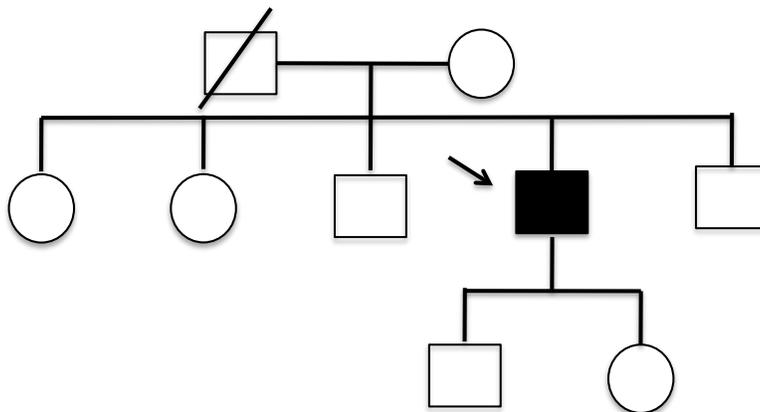
Score Diagnostique > 1 à 3 probabilité intermédiaire de LQTS

3- >ou égal à 480 ms,

Origine :

	<u>maternel</u>	<u>paternel</u>
<u>Grand père</u>	<u>québécois</u>	<u>québécois</u>
<u>Grand mère</u>	<u>québécois</u>	<u>québécois</u>

Arbre familial :



Patient 10 :

Age : 19 ans, sexe féminin

Histoire familiale : pas d'antécédents particuliers

Signes fonctionnels : début à l'âge de 18 ans, palpitations découverte de flutter auriculaire avec au retour en rythme sinusal un QTc allongé à plus de 480msec puis allongement jusqu'à 500ms sous sotalol puis sous flecaïne

Signes électrocardiographiques : QTc le plus long=500msec

Echocardiographie : normale

Traitement : Béta-bloquants

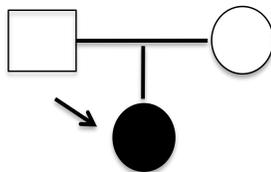
Score Diagnostique=3, probabilité intermédiaire de LQTS

3- >ou égal à 480 ms,

Origine :

	maternel	paternel
Grand père	québécois	québécois
Grand mère	québécois	québécois

Arbre familial :



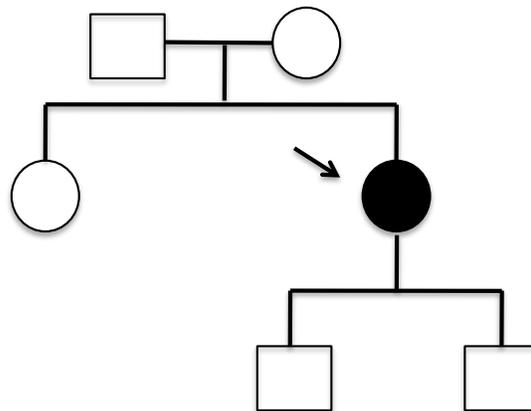
Patient 11 :

Phénotype détaillé dans la partie résultats.

Origine :

	maternel	paternel
Grand père	québécois	québécois
Grand mère	québécois	québécois

Arbre familial :



Patient 12 :

Age : 20 ans, sexe féminin

Histoire familiale : pas d'antécédents particuliers

Signes fonctionnels : début à l'âge de 17 ans, lipothymies à l'effort.

Signes électrocardiographiques : QTc le plus long=463msec

Echocardiographie : normale

Traitement : pas de traitement actuellement

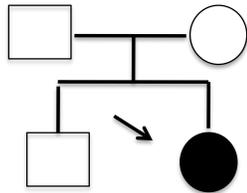
Score Diagnostique > 1 à 3 probabilité intermédiaire de LQTS

2- QTc entre 460 et 479ms

Origine :

	maternel	paternel
Grand père	québécois	québécois
Grand mère	québécois	québécois

Arbre familial :



Appendice R.2 : Génotype à la position 1673 du gène SCN5A (position de polymorphisme H558R) pour les patients recrutés pour le séquençage des exons.

N° patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Génotype	CT	CT	CT	CT	TT	TT	TT	TT	TT	CC	TT	CT

Les numéros des patients sont définis dans le tableau R.IV.

Le tableau ci-dessus décrit le génotype à la position 1673 du gène SCN5A, afin de connaître la présence pour chaque patient du polymorphisme SCN5A H558R (rs1805124), p.His558Arg ou c.1673T>C

Fréquence allélique dans la population européenne (CEU) :

T/T f=0.652

C/T f=0.339

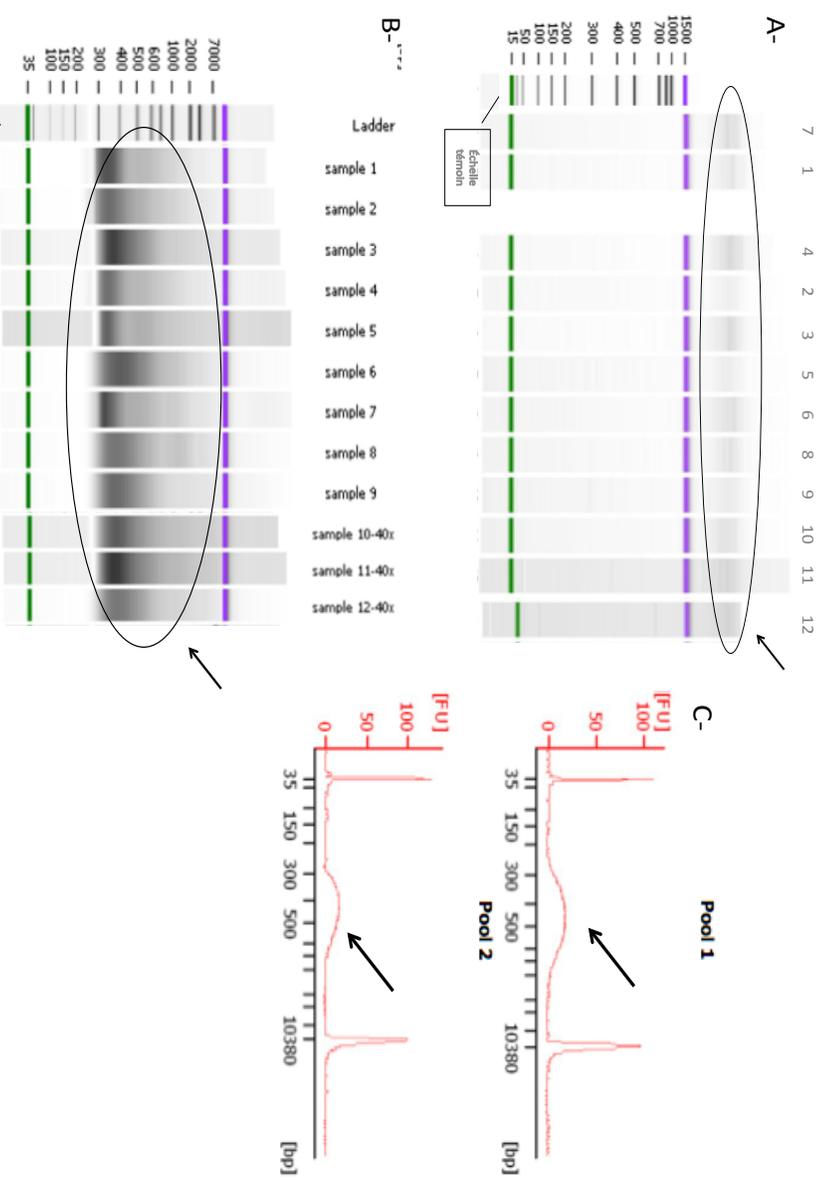
C/C f=0.009

L'allèle de référence est l'allèle T (f=0.821), l'allèle C est associée au polymorphisme H558R.

Appendice R3: Paramètres de contrôles de la préparation des échantillons et de l'enrichissement en exon.

Identification	Concentration ng/µl	Concentration par picogreen ng/µl	Regroupement par 6 librairies		Concentration Picogreen		Concentration qPCR	
			≈µl for 500ng	Vol. du pool	Conc.ng/ul	nM	qPCR ng/ul	qPCR nM
1	294	49	10	63,2	25,66	97	15,7916	59
2	163	44,12	11					
3	325	52,58	9,5					
4	376	36,515	13,7					
5	251	58,92	8,5					
6	349	47,48	10,5					
7	394	44,81	11	67,8	24,52	92,8	12,04544	45
8	273	42,78	11,7					
9	191	42,7	11,7					
10	329	44,47	11					
11	352	48,07	10,4					
12	318	41,5	12					

Cee tableau met en évidence les différents contrôles réalisés lors des étapes de préparation expérimentale. À chaque étape, il est nécessaire de réaliser une mesure de la concentration par picogreen (qPCR pour la dernière étape), ainsi qu'une analyse de la qualité de l'ADN (cf. figures ci dessous). Le pool des 6 librairies représente le regroupement des librairies par 6 pour l'enrichissement en exons.



Ces figures représentent les mesures de qualité à différentes étapes. A- Électrophorégrammes par Bioanalyser (Agilent DNA 1000) des échantillons avant le début du protocole, les échantillons sont de bonne qualité non fragmentés mis en évidence par des bandes d'ADN détectées au dessus du dernier témoin (montrées par la flèche). B-Électrophorégrammes par Bionalyser 1000 (Agilent Hight sensibility) des librairies après préparation montrant un ADN de bonne qualité avec des bandes entre 300 et 900bp. C- Électrophorégrammes pour le pool 1 et 2 après enrichissement en exons montrant de même que dans la figure B des fragments d'ADN entre 300 et 900bp.

Appendice R4 : Rapport du « first base report » sur le haut et le bas de la surface de chaque piste de la chambre de réaction.

	Valeurs normales	Piste 1		Piste 2		Piste 5		Piste 6	
		Haut	Bas	Haut	Bas	Haut	Bas	Haut	Bas
Densité des « clusters » (K/mm ²)	350-400	350.86	352.46	285.26	292.35	344.2	342.35	340.17	339.43
Intensité nucléotide A	>10000	46402.02	47468.96	44059.52	45261.44	45462.5	46647.44	45151.11	46089.71
Intensité nucléotide C	>10000	55087.98	55270.81	52785.14	52932.25	54064.02	53920.62	53479.96	52949.33
Intensité nucléotide G	>10000 and <Intensité de A,C,T	23136.04	28138.85	22473.31	26195.75	24120.94	27112.31	23129.77	25065.96
Intensité nucléotide T	>10000	43659.12	53314.81	43513.14	50087.52	45231.58	52993.29	44461.21	51589.27
Score de focalisation nucléotide A	50-80	72.42	72.27	67.87	67.14	71.96	71.19	72.13	71.61
Score de focalisation nucléotide C	50-80	71.88	71.66	67.16	66.31	71.46	70.58	71.54	70.85
Score de focalisation nucléotide G	50-80	74.86	75.77	69.95	70.55	74.32	74.86	74.41	74.99
Score de focalisation nucléotide T	50-80	73.85	74.6	68.98	69.29	73.34	73.6	73.48	73.92

Piste 1	Piste 2	Piste 5	Piste 6
1	7	1	7
2	8	2	8
3	9	3	9
4	10	4	10
5	11	5	11
6	12	6	12

A-Rapport du « first base report » avec dans la 1^{ère} colonne les éléments analysés, la 2^{ème} colonne les valeurs normales, puis les colonnes représentant les pistes avec le haut et le bas de la surface de la piste. L'ensemble des valeurs sont dans la normale, on remarque dans la piste 2 les valeurs de densité de clusters sont plus basses (en rouge) que la normale, mais pour le même groupe de 6 librairies représenté aussi dans la piste 6, les valeurs sont normales (en vert) nous permettant de continuer les analyses.

B-Répartition des échantillons en fonction des pistes, le numéro correspond au patient défini dans le **tableau R.IV** dans la partie résultat

Appendice R.5 : Nombre de variantes et classification des variantes après filtration pour les 12 patients.

Patient	Nombre de variants				Classification des variants							
	Total	Variants hétérozygotes	Variants homozygotes	Variants partagés	Faux-sens				Non-sens	Indel	Variants d'épissage	
					Bénin	Prob.D.	Poss.D.	NC				
1	80	78	2	6	69	28	29	10	2	3	8	0
2	79	77	2	14	70	27	22	17	4	8		1
3	99	98	1	12	90	38	29	16	7	2	7	
4	69	68	1	4	60	23	18	14	5	1	8	
5	70	66	4	10	60	10	24	24	2		10	
6	91	88	3	5	69	22	33	12	2	4	16	2
7	90	87	3	5	79	35	31	11	2	1	10	
8	89	86	3	2	73	27	24	18	4	3	12	1
9	102	98	4	7	86	35	34	14	3	3	12	1
10	90	88	2	3	80	33	28	18	1	4	5	1
11	76	75	1	5	66	26	22	15	3		9	1
12	91	91		3	84	33	33	11	7	3	4	

Les variantes sont réparties en variantes hétérozygotes, homozygotes. Certaines variantes, parmi les variantes hétérozygotes et homozygotes, sont partagées avec 1 ou plusieurs autres individus. Les variantes sont classées en faux-sens, non-sens, indel, et variantes d'épissage. Pour les variantes faux-sens, la prédiction de la pathogénicité selon polyphen classe chaque variante en classe « bénigne », Prob.D. : « probablement dommageable »/ poss.D. : « possiblement dommageable »/ NC :Non Commu.

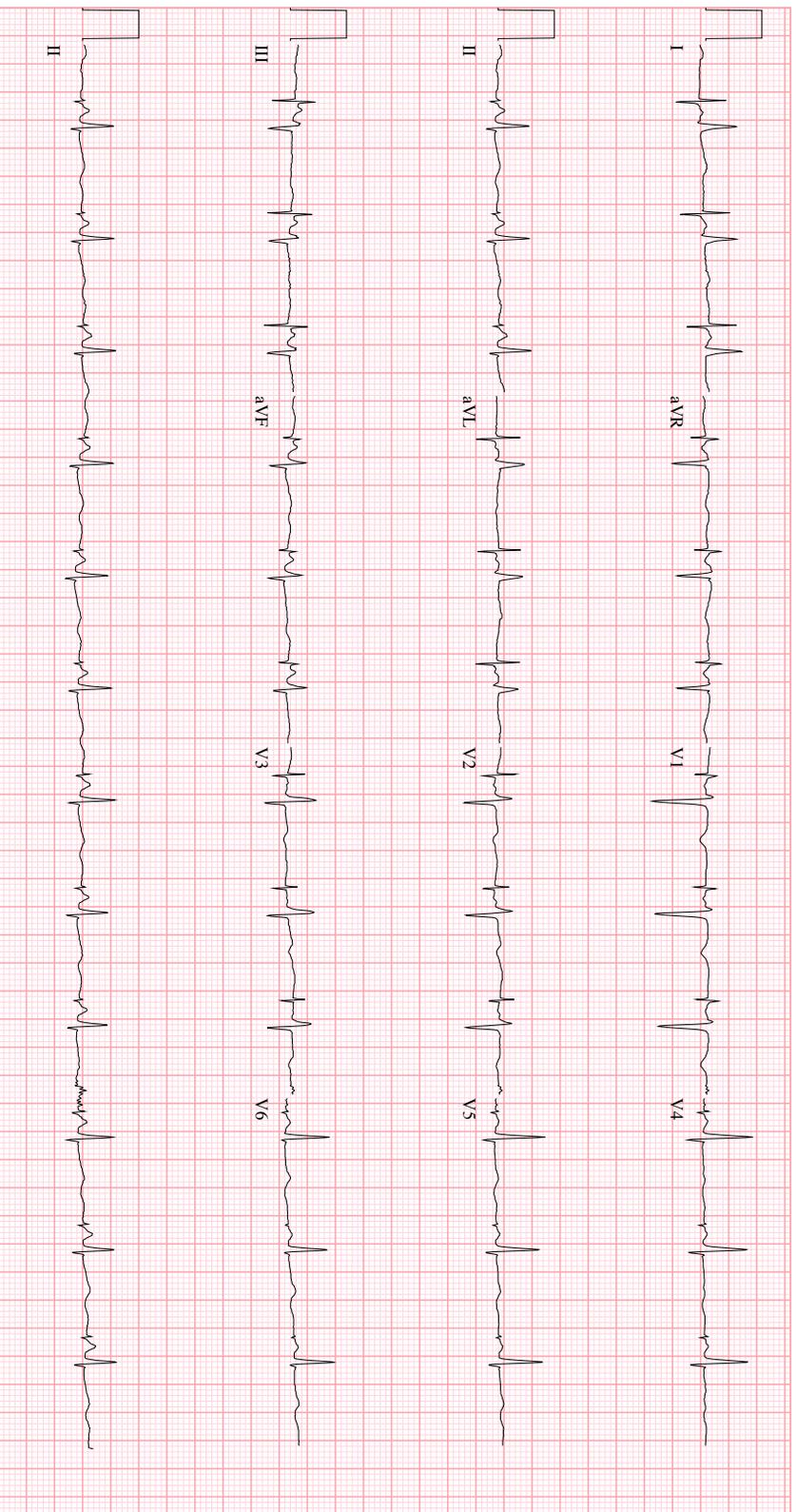
Appendice R6 : Phénotype des patients en fonction des variantes ANK2 connues.

T1404I	(1) CI: bradycardie, FA, TdP et allongement QTc induits par quinidine
E1425G	(2) Famille de 25 personnes présentant le variant : 23 QTc allongé avec ondes T sinusoidales, 25 bradycardie sinusale, 12 Af, 4 asymptomatiques, 2 morts subites (3) CI: QT 450msec, bradycardie modérée 63/min, 3 enfants ayant présentés une mort subite: 1 à 25 ans en gagnant un prix, 1 à 17 ans sous la douche, 1 à 15 ans en sortant de la piscine.
E1452K	(3) CI: syncope , bradycardie sinusale, ondes U
R1503V	(4) CI: syncope, bradycardie sinusale
V1516D	(1) CI: AF, QTc allongé, TdP et TV induits par quinidine, CI: Arrêt cardiaque à l'effort, QTc normal, TV polymorphiques à l'effort CI: bradycardie, TV à l'effort responsable de syncope, FA/ flutter, QTc=460msec CI: mort subite avec aspect de brigada et test ajmaline positif,
W1535R	(5) CI: QTc=470msec, pauses sinusales de 3.8sec pose de pacemaker
E1578K	(4) CI: Arrêt cardiaque durant le sommeil
L1622I	(3) CI: QTc normal à 440msec, TV et FV, Fc à 63 /min, et 3 asymptomatiques
T1626N	(3) CI: sexe féminin syncope et QTc=450msec, fille: mort subite à 19 ans, 5 MF asymptomatiques, CI: sexe masculin: QTc=450msec, arythmie sinusale avec Fc entre 50 et 110, 2 MF asymptomatiques,
T1726N	(4) CI: syncope, ondes U
R1788W	(3) CI: plusieurs syncopes durant le sommeil avec TdP identifiées, QTc allongé à 530msec, Fc à 63/min en moyenne, onde T et U proéminentes, pas de régression sou béta-bloquants , IMF asymptomatique CI: syncopes à répétition durant l'exercice avec tachycardies supra et ventriculaires avec efficacité des bb-, QTc à 470 post syncope IMF asymptomatique CI: syncope durant l'exercice.
E1813K	(3) CI: TV et TdP avec allongement du QTc à 490msec et Fc à 62.min , MF: FV, QTc à 390msec, ECG normal, et Fc=64/min CI: allongement QTc et syncope induit par quinidine CI: allongement QTc et TdP induit par procainamide

(1) Mohler et al. [141] (2) Mohler et al.[123], (3) Mohler et al.[124], (4) Sherman et al.[150] , (5) Zhou et al. [151] CI : Cas index, MF : Membre de famille, FA : Fibrillation auriculaire, Tdp : Torsades de pontes, Fc : Fréquence cardiaque

Appendice R.7 : Électrocardiogrammes de la patiente 7 et 11, l'intervalle QTc est mesuré à 474msec chez la patiente 7 et à 450msec (normal) chez la patiente 11 (l'ECG montrant l'allongement de l'intervalle QTc n'a pas été retrouvé après informatisation des dossiers.).

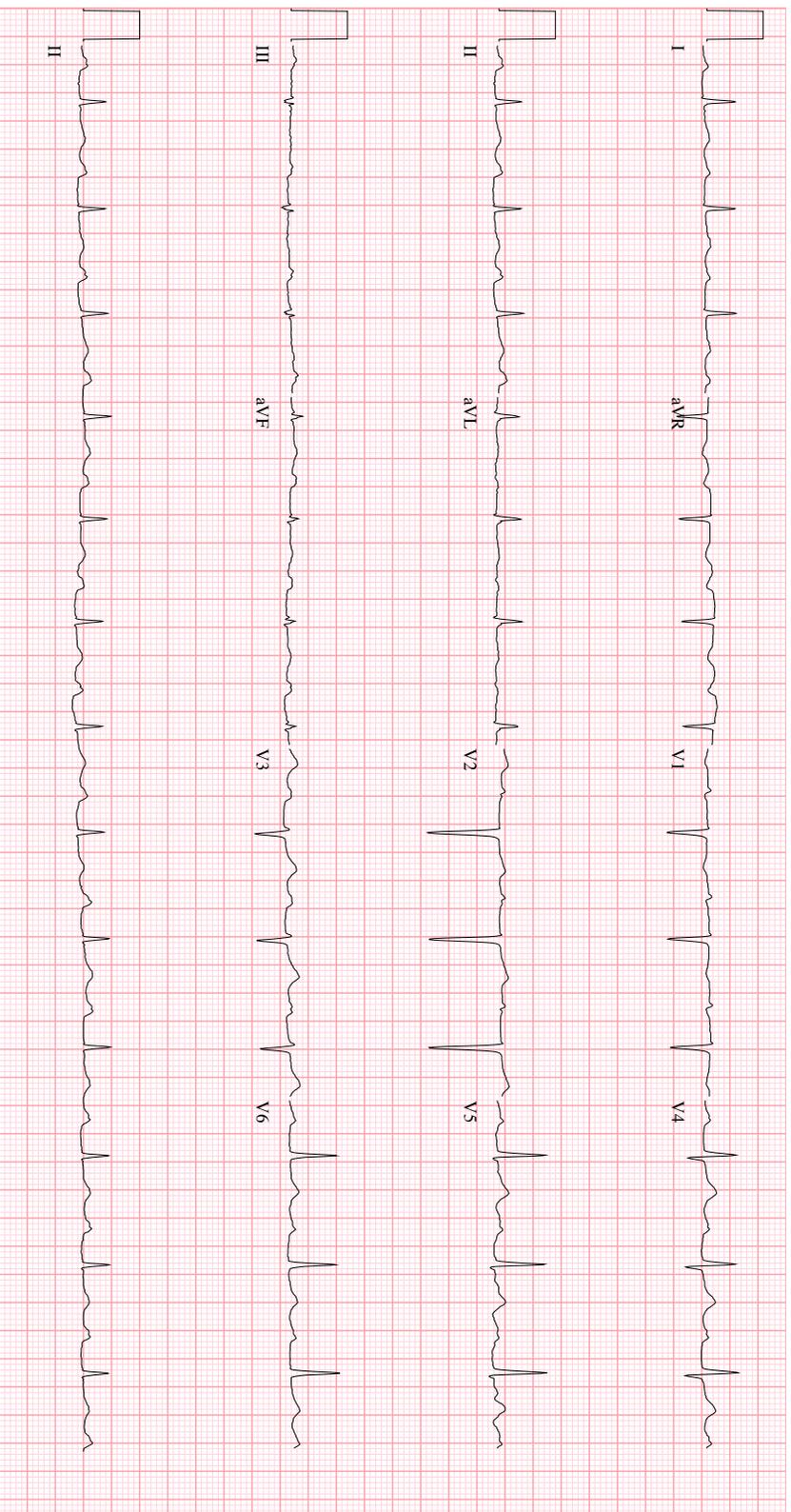
Patiente 7 :



25mm/s 10mm/mV 100Hz 7.1.1 12SL 239 IDC: 84

EID:4893 EDT: 08:50 28-jan-2011 ORDRE:
Page 1 de 1

Patiente II :



EID:10000 EDT: 09:31 13-aof-2007 ORDRE:
Page 1 de 1

Score Expect Method Identities Positives Gaps Frame
 341 bits(875) 5e-120(0) Compositional matrix adjust. 157/305(51%) 209/305(68%) 1/305(0%)

Features:

Query	59	HFEIEIFDAQTRKQICIIDDKYVNSSTIHADVOKQFHKACPKWYBSRVGLOIECGGPFIAKDY	118
Sbjct	3	H+E+E+I DA+Tr++++C LDKV +Tl +++K F K P+WYP+R L+L+ G LKD	62
Query	119	HYEVEIIDAKTRKIKFLDKRVEPHATIAEIKNLFTKTHPQWYPARQSLRLDPRKGSILKDE	178
Sbjct	63	ITIOSIAASSIVTLYATDLDGOOVSWTTLVFLAEYTGPLLILYLLFYLRIKIPDIYDGKESARLL	122
Query	179	+O+ + +TtY Dlg O+Sw TVEl Ey GPl IYllEY R+p IY K	238
Sbjct	123	DVLQKILPVGTTATLIFRDLGAQISWTVLVEYAGPLFYLLFYFRVDPPIYGHKYPFTSS	182
Query	239	RHPVVHLACPFCHCIHYIRYLLLETLFVHKVSAAGHTPLKNTLMSCAFYWGFTSWTAYYYINHP	297
Sbjct	183	RH VVHLAC CH HYI+ LLETLFVH+ S G PL+N+ +C +YMGF +W+AAYYINHP	242
Query	298	RHTVVHLACIChSfHYIKRLLETLFVRFShGTMPLRNlFKNCtYYWGFaAWMAYYtNHp	357
Sbjct	243	LYTTPPSFGNROIIVSAINFLICGAGNHFINVWLSHPNHGNNACFSPSPNPNY	302
Query	358	LYTTPPYGAQOVKLAIAIFVICQDIGNFSIHMAIRLDRPAGSKTRKIPYPTKNDPFTWFLLL	302
Sbjct	303	LYTTPPYGAQOVKLAIAIFVICQDIGNFSIHMAIRLDRPAGSKTRKIPYPTKNDPFTWFLLL	302
Query	358	VSCPNTYVEIGSWTSPFVWTOPLPVGIPTLMSIQMSLMAOKKRIYLARKFNYSYIHRKSA	302
Sbjct	303	VSCPNTYVEIGSWTSPFVWTOPLPVGIPTLMSIQMSLMAOKKRIYLARKFNYSYIHRKSA	302
Query	358	VSCPNTYVEIGSWTSPFVWTOPLPVGIPTLMSIQMSLMAOKKRIYLARKFNYSYIHRKSA	302
Sbjct	303	VSCPNTYVEIGSWTSPFVWTOPLPVGIPTLMSIQMSLMAOKKRIYLARKFNYSYIHRKSA	302

Appendice R.8 : Alignement BlastP TECRL/TECR/ Tsp13p.

A : Alignement par BlastP de TECRL (query) et TECR (sbjct), l'identité est de 51% et l'homologie de 68%

Score Expect Method Identities Positives Gaps Frame
 102 bits(254) 3e-29(0) Compositional matrix adjust. 81/255(32%) 119/255(46%) 28/255(10%)

Features:

Query	126	ASSIVTLIYANDLGOOVSWTTLVFLAEYNGPLLIILYLLFYL--RIPCITYDGKESARRLRHPVY	183
Sbjct	67	A + + DLG Q+Sw VF Ey GP+L++ LFY lP + D SA +P +	126
Query	184	ADDSEMEFFIKDLGPQISWRLVFCFCEYLGVLVHSLFYYLSTPTPTVDRWHSASSDYNPFL	234
Sbjct	127	H-LACFOCHCIHYIRYLLLETLFVHKVSAAGHTPLKNTLMSCAFYWGFTSWIAY-----Y	186
Query	235	NRVAYFILLGfYGRLETLFVHfSfLAtMPLfNlFNlKNCfHYWVLSGLfSfGfYGFpPp	289
Sbjct	187	+ +A F HY + L ETLFVH+ S P+ Nl +C YW + I++ +	246
Query	290	INHPLYTTPPSFGNROIIVSAIN-FLICEAGNHFINVWML----SHPNHGNNACFPSPNPNY	348
Sbjct	247	GNAKLFFKYYSTLKKDDLSTLIGLFLVSLWNPYCHIKIRLWGDYOKKHGNAKIRVPLNQG	296
Query	349	PFTWMPFLVSGPNYTYEIGSWTISFPL-VMTQTLPVGIFPTLLMSIQMSLMAOKKHKIYLARKF	310
Sbjct	297	F L PNYT+E+ SMI FT V L +F + + OM WAOCK+K	310
Query	349	NSYIHRKSAMIPFTL 363	310
Sbjct	297	-KYHRRARFLIPFV 310	310

Range 2: 106 to 136

Score Expect Method Identities Positives Gaps Frame
 16.9 bits(32) 0.83(1) Compositional matrix adjust. 11/31(35%) 15/31(48%) 2/31(6%)

Features:

Query	83	STIHADVOKQFHKACPKWYP--SRVGLDIECG 111
Sbjct	106	STI V ++H A + P +RV L G
Query	106	STIPYVDRWHSASSDYNPFLINRYAYYFLILG 136

B : Alignement TECRL et Tsp13p par BlastP, l'alignement montre 32% d'identité moyenne entre les 2 morceaux protéiques alignés avec 92 acides aminés partagés entre les deux protéines

