



Troubles du rythme cardiaque et mort subite

Focus sur les canalopathies



Flavien CHARPENTIER

flavien.charpentier@univ-nantes.fr

Equipe II " Canaux ioniques et cardiopathies "

L'unité de recherche de l'institut du thorax

Inserm UMR 1087 / CNRS UMR 6291

Nantes, France

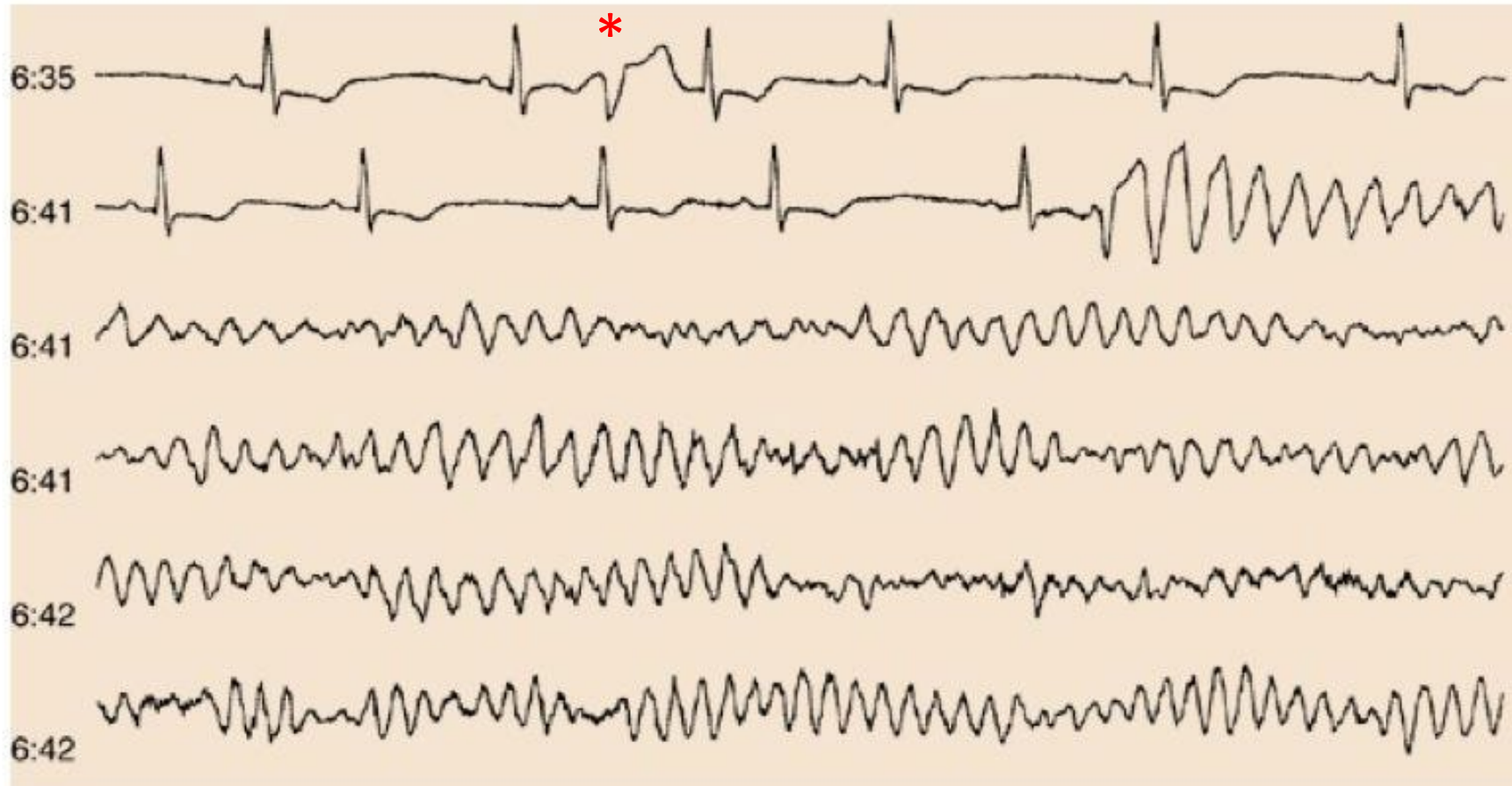


Mort subite cardiaque

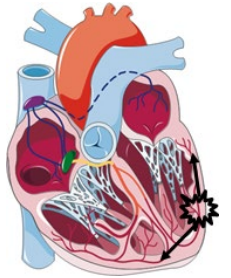
- ➔ mort naturelle avec perte brutale de conscience survenant dans l'heure après les 1^{ers} symptômes, chez un sujet ayant ou non une maladie cardiaque connue
- ➔ l'une des principales causes de décès
 - ✓ environ 360 000 décès/an aux Etats-Unis et 250 000 dans l'UE
 - ✓ environ 40 000 décès/an en France
 - ✓ 10-15% de la mortalité totale dans les pays industrialisés
 - ✓ 8-9% des décès en France
 - ✓ 63% des décès de cause cardiaque
 - ✓ environ 70% des décès de toute origine entre 35 et 44 ans
 - ✓ 3-10% de morts subites récupérées

Causes arythmiques de la mort subite

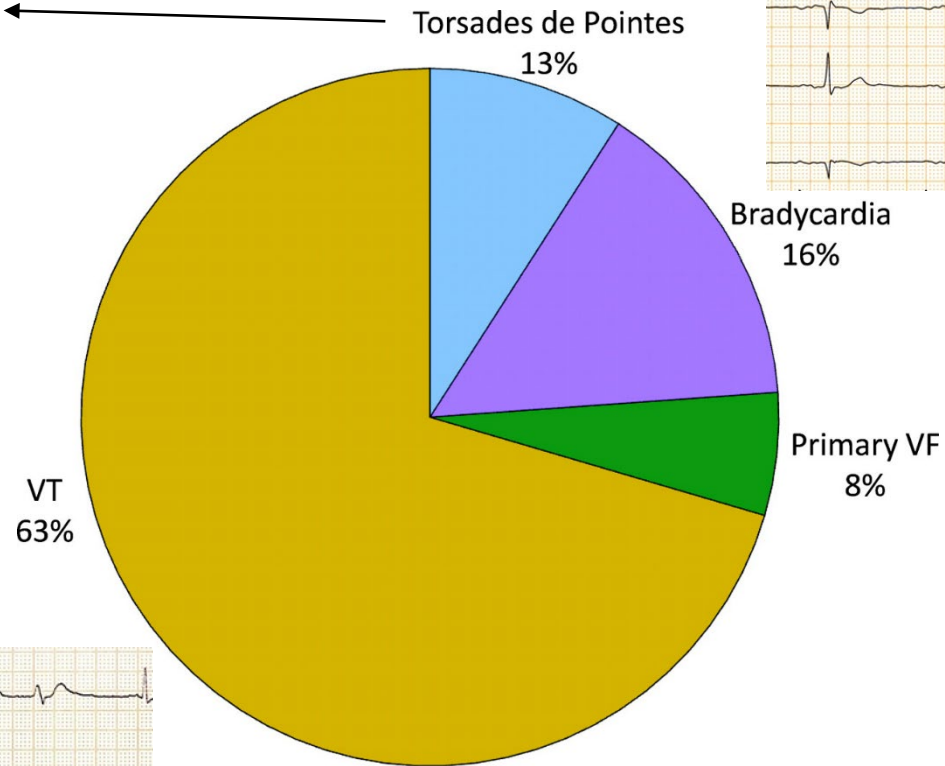
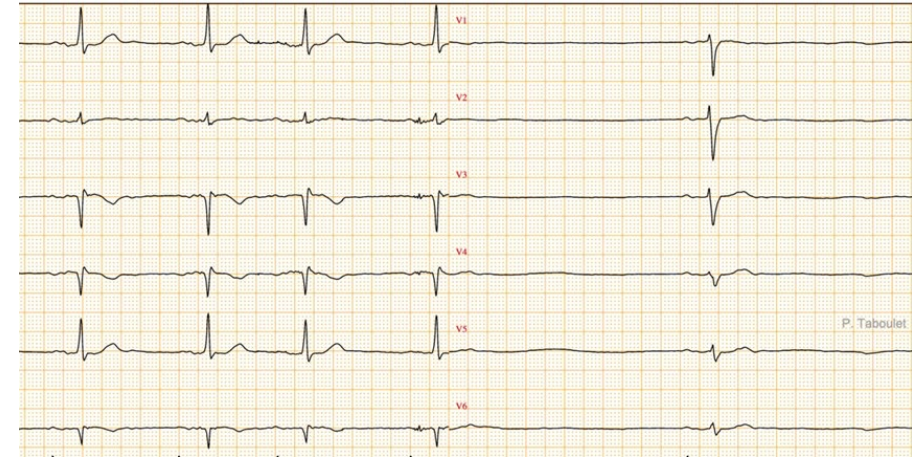
➔ **80-85% des cas : fibrillation ventriculaire**
(primaire ou secondaire à une tachycardie ventriculaire)



* Extrasystole ventriculaire (ESV)



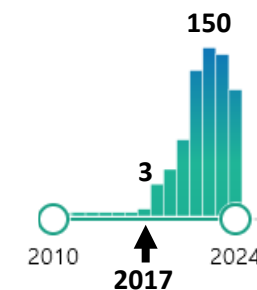
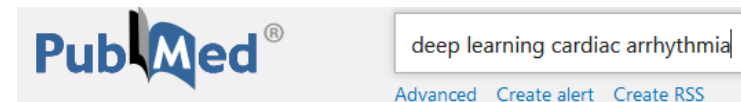
Causes arythmiques de la mort subite



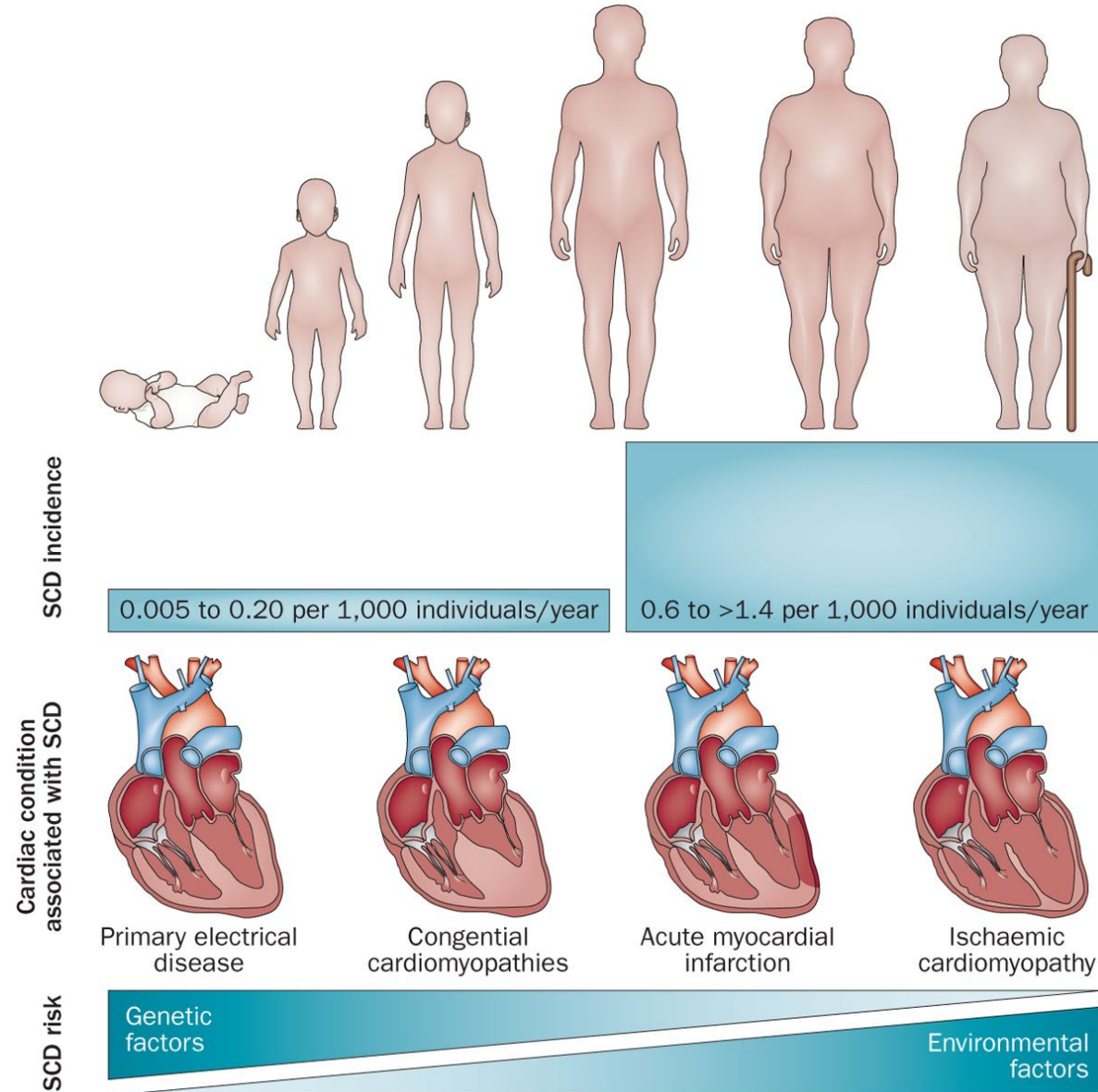
VF: ventricular fibrillation
VT: ventricular tachycardia

Voies de recherche sur les arythmies

- Identification des mécanismes physiopathologiques
- Identification de cibles thérapeutiques
- Développement de solutions thérapeutiques
 - médicaments
 - ablation des foyers arythmogènes
 - défibrillateurs et stimulateurs
- Prédiction du risque ➔ outils d'intelligence artificielle
 - analyse des ECG
 - intégration de données multimodales (ECG, imagerie, génétique...)
 - ...



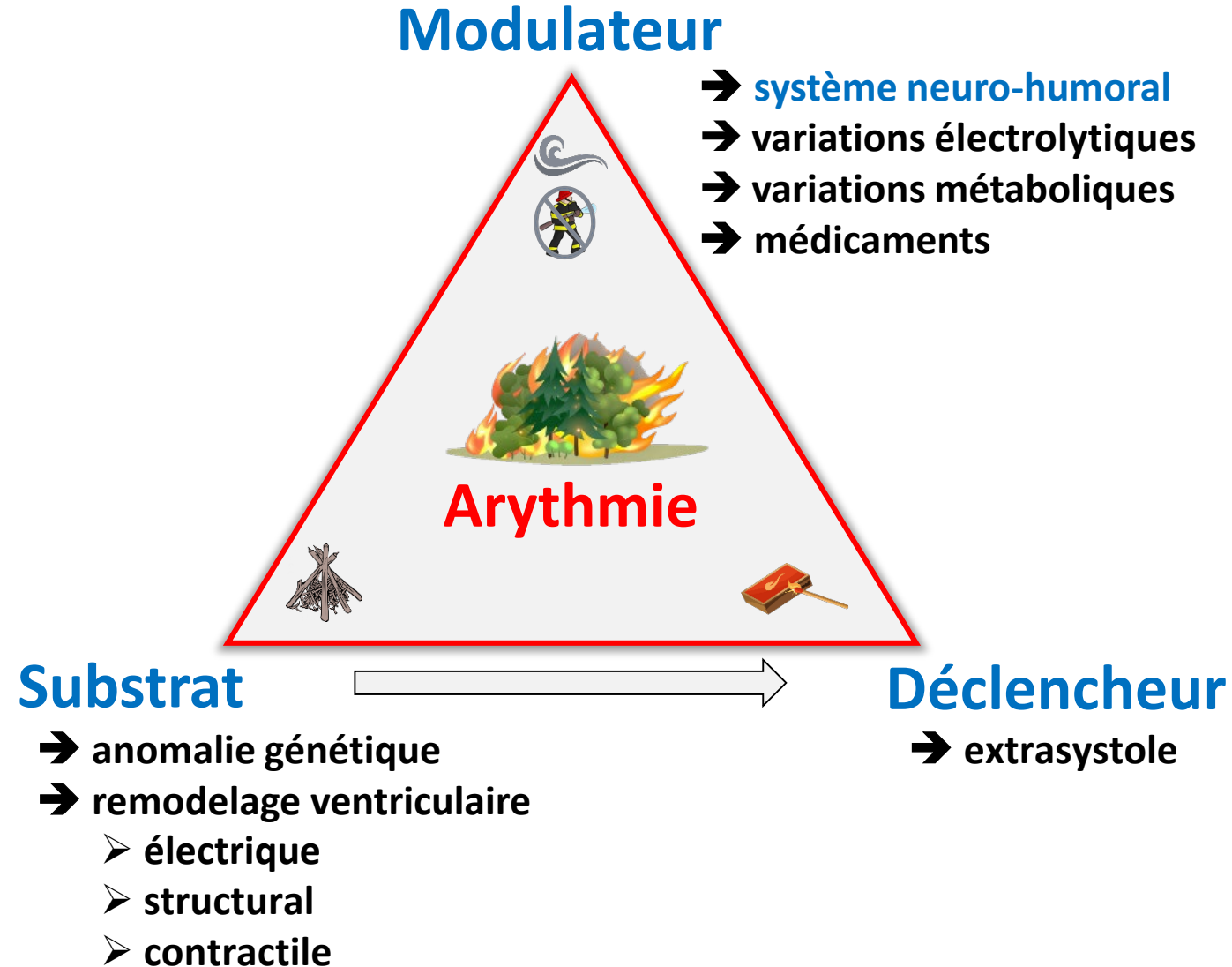
Mort subite cardiaque



SCD: sudden cardiac death

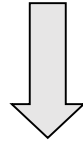
Mécanismes des troubles du rythme cardiaque

Le triangle de Coumel



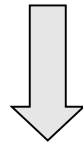
Causes moléculaires des troubles du rythme

Remodelage ionique = altération de l'expression des gènes codant pour des sous-unités de canaux ioniques (anomalies du **transcriptome**)

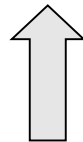


Remodelage électrique = altération de l'activité électrique des myocytes cardiaques

(+ remodelage structural & contractile)



Troubles du rythme cardiaque



Canalopathies (anomalies du **génome**)

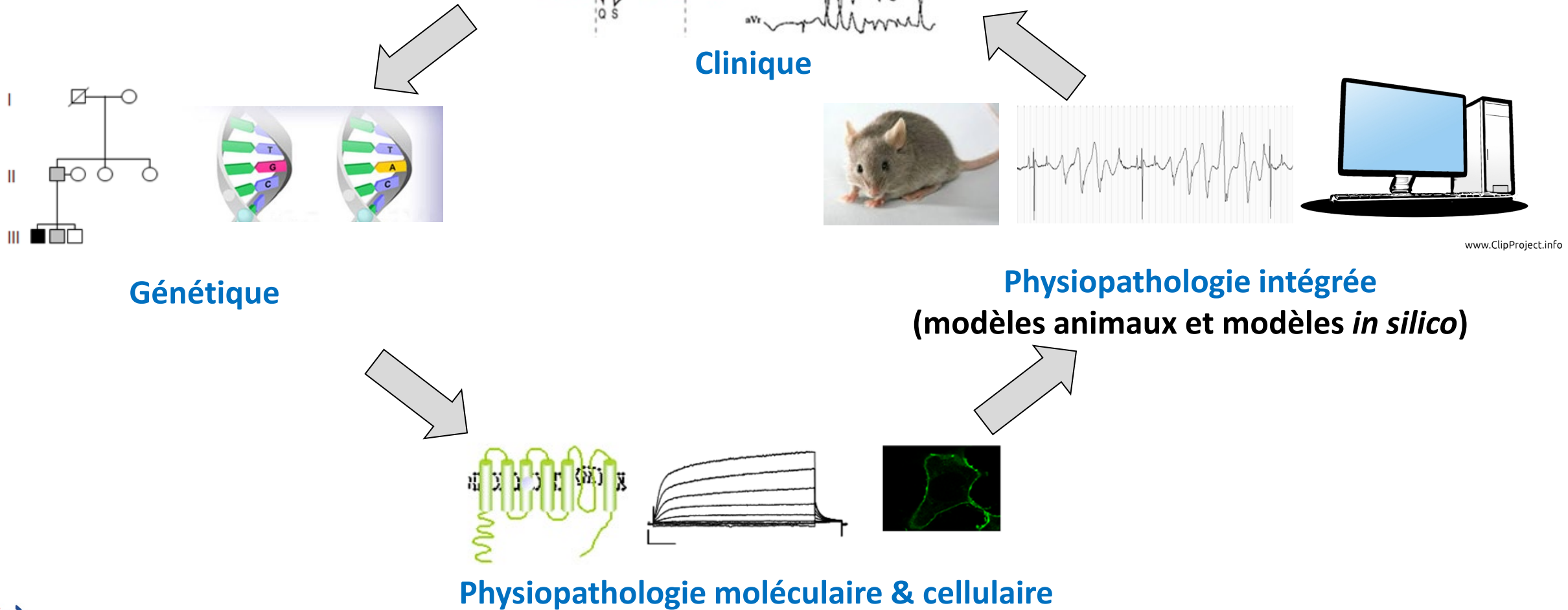
Pathologies
cardiaques
fréquentes

Arythmies
héréditaires

"Canalopathies" cardiaques

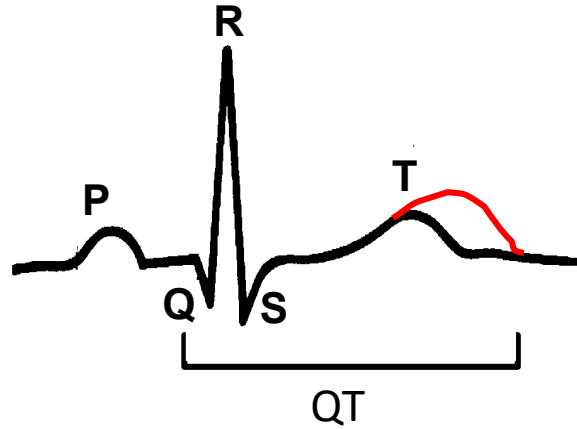
- **long QT syndromes** (Romano-Ward, Jervell & Lange-Nielsen, Andersen, Timothy)
- **short QT syndrome**
- **Brugada syndrome**
- **cardiac conduction diseases (congenital, progressive)**
- **catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia**
- **early repolarization syndrome**
- **sick sinus syndrome**
- **atrial fibrillation**
- **multiple ectopic Purkinje-related premature contractions (MEPPC)**
- **overlap syndromes**
 - PCCD and Brugada syndrome
 - PCCD and long QT syndrome
 - PCCD and Brugada and long QT syndrome
- **(dilated cardiomyopathy)**

Du gène à sa fonction : comprendre les canalopathies cardiaques

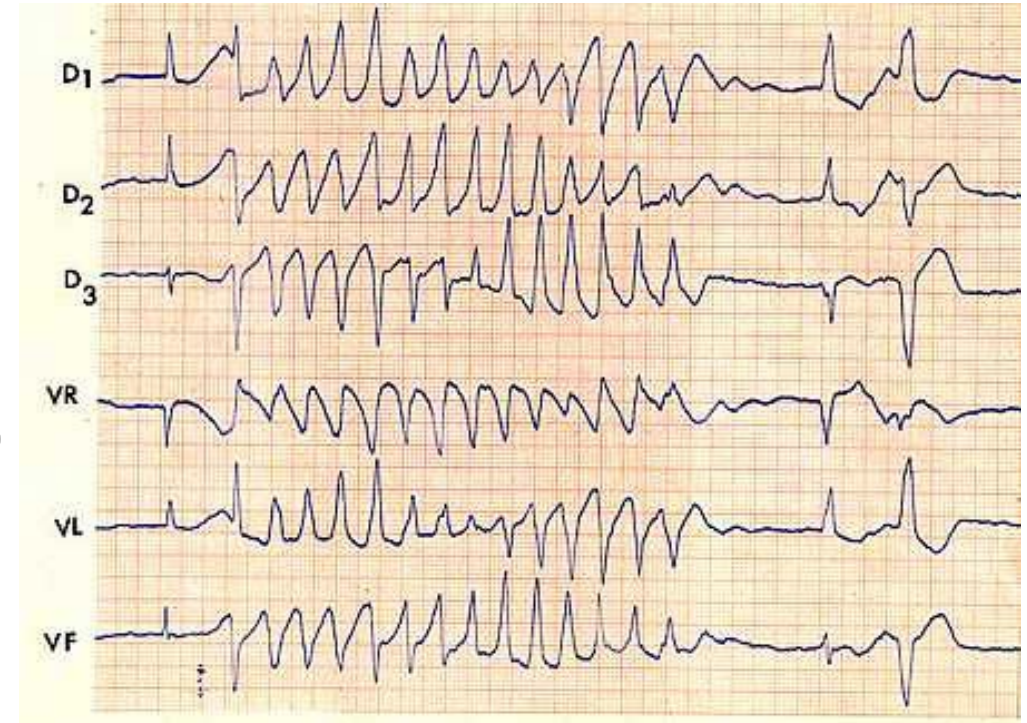


www.ClipProject.info

Syndrome du QT long



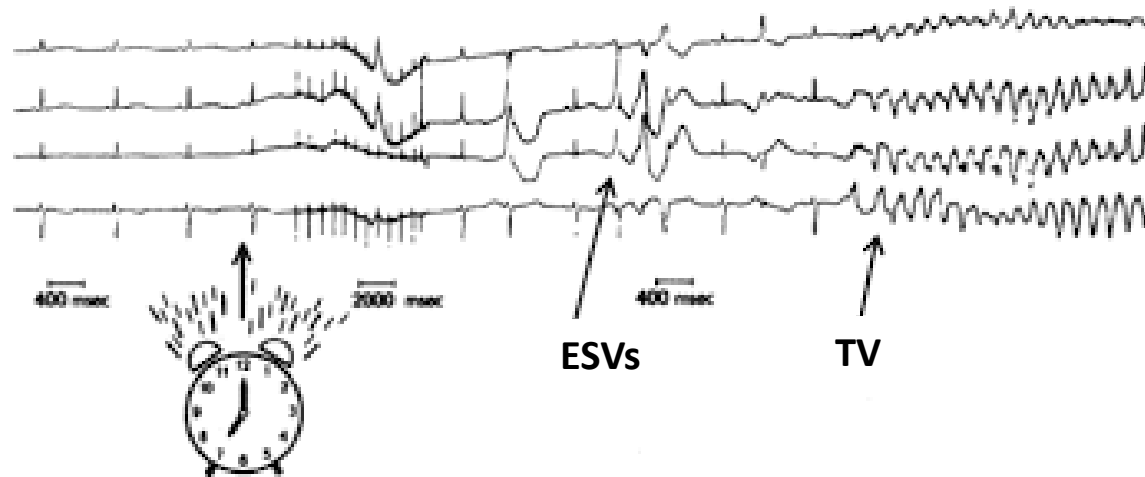
torsade de pointe



- pathologie rare : 1/2500 personnes
- allongement du QTc ($=QT/\sqrt{RR}$; formule de Bazett)
 - ➔ QTc >0.44-0.45 sec chez les hommes
 - ➔ QTc >0.46-0.47 sec chez les femmes(QTc = QT théorique à 60 battements par min)
- autosomique dominante dans plus de 90% des cas (syndrome de Romano-Ward)
- prédominance féminine (60%)
- risque de troubles du rythme cardiaque et de mort subite
- 1^{ers} symptômes souvent à l'adolescence
- cœur morphologiquement normal

Facteurs favorisant QT long et torsades de pointes

- ✓ **Bradycardie**
- ✓ **Effort, stress (stimulation adrénergique)**



- ✓ **Désordres électrolytiques (hypokaliémie, hypomagnésémie)**
- ✓ **Médicaments* (neuroleptiques, antibiotiques, antihistaminiques, antiarythmiques ...)**
➔ **QT long acquis**

* <http://www.cardiogen.aphp.fr/articles/articles.php?id=29&cat=11>

LES syndromes du QT long

Table 1. Subtypes of congenital LQTS and their associated genes, proteins, and effects on cardiac currents

LQT Subtype	Gene	Protein	Current
LQT1	<i>KCNQ1</i>	KCNQ1 (Kv7.1)	↓ I_{Ks}
LQT2	<i>KCNH2</i>	hERG (Kv11.1)	↓ I_{Kr}
LQT3	<i>SCN5A</i>	Na _v 1.5	↑ I_{Na}
LQT4 (ankyrin-B syndrome)	<i>ANK2</i>	Ankyrin-B	Multichannel interactions
LQT5	<i>KCNE1</i>	KCNE1 (minK)	↓ I_{Ks}
LQT6	<i>KCNE2</i>	KCNE2 (MiRP1)	↓ I_{Kr}
LQT7 (Andersen-Tawil syndrome type 1)	<i>KCNJ2</i>	K _{ir} 2.1	↓ I_{K1}
LQT8 (Timothy syndrome)	<i>CACNA1C</i>	Ca _v 1.2	↑ I_{Ca}
LQT9	<i>CAV3</i>	Caveolin 3	↑ I_{Na}
LQT10	<i>SCN4B</i>	Na _v 1.5 β4	↑ I_{Na}
LQT11	<i>AKAP9</i>	AKAP-9 (yotiao)	↓ I_{Ks}
LQT12	<i>SNTA1</i>	α1-Syntrophin	↑ I_{Na}
LQT13	<i>KCNJ5</i>	K _{ir} 3.4 (GIRK4)	↓ I_{KACH}
LQT14	<i>CALM1</i>	Calmodulin	Multichannel interactions
LQT15	<i>CALM2</i>	Calmodulin	Multichannel interactions

+75%

+ syndrome de Jervell & Lange-Nielsen : autosomique récessif ; gènes *KCNQ1* (JLNS1) & *KCNE1* (JLNS2)

Caractérisation des effets des mutations/variants génétiques

Systèmes d'expression hétérologue

Ovocytes de Xénope

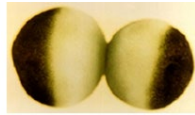
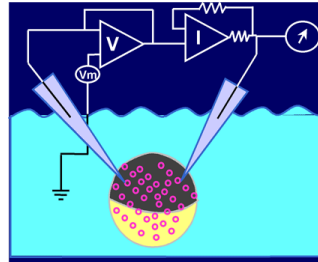


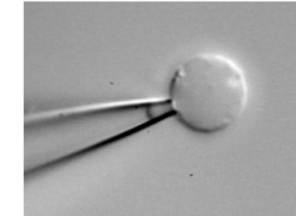
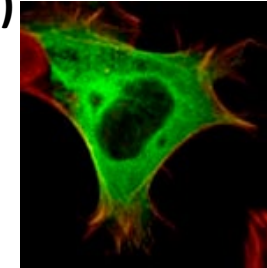
Figure 2: Xenopus oocytes
(actual size)



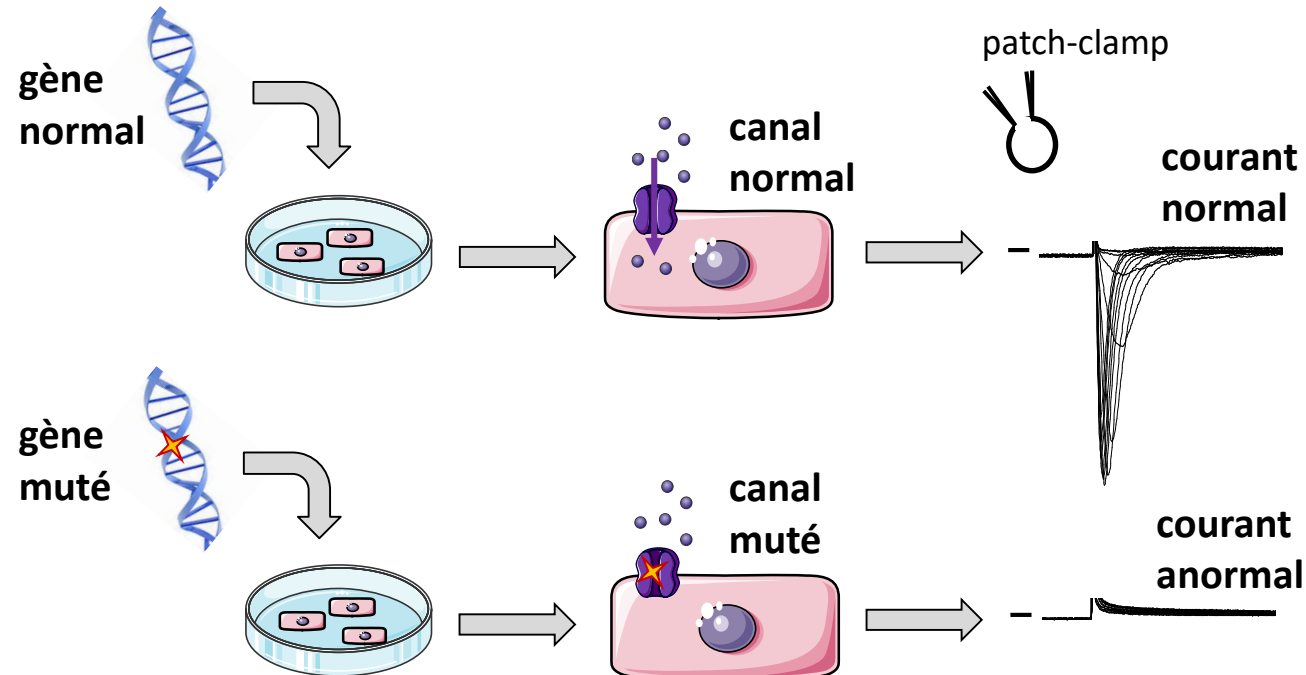
Double micro-électrode

Lignées cellulaires

(cellules Cos7, HeLa, CHO, HEK, SF9, etc.)

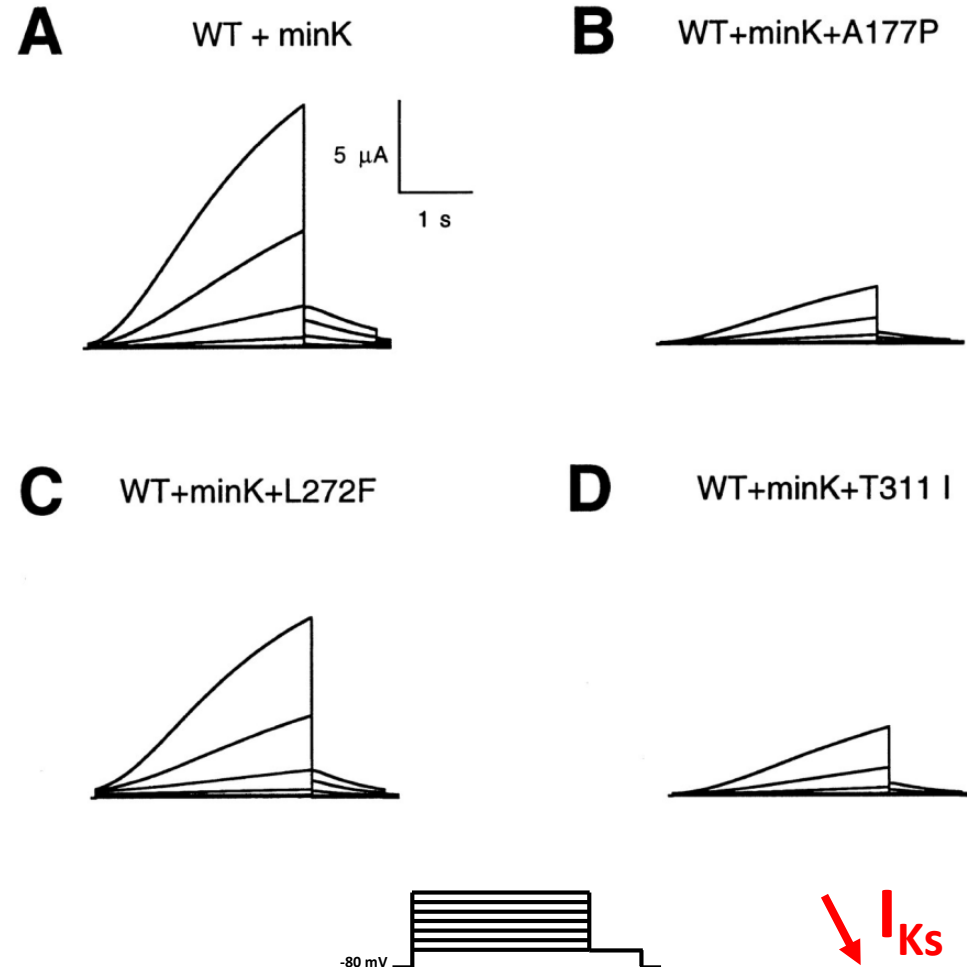
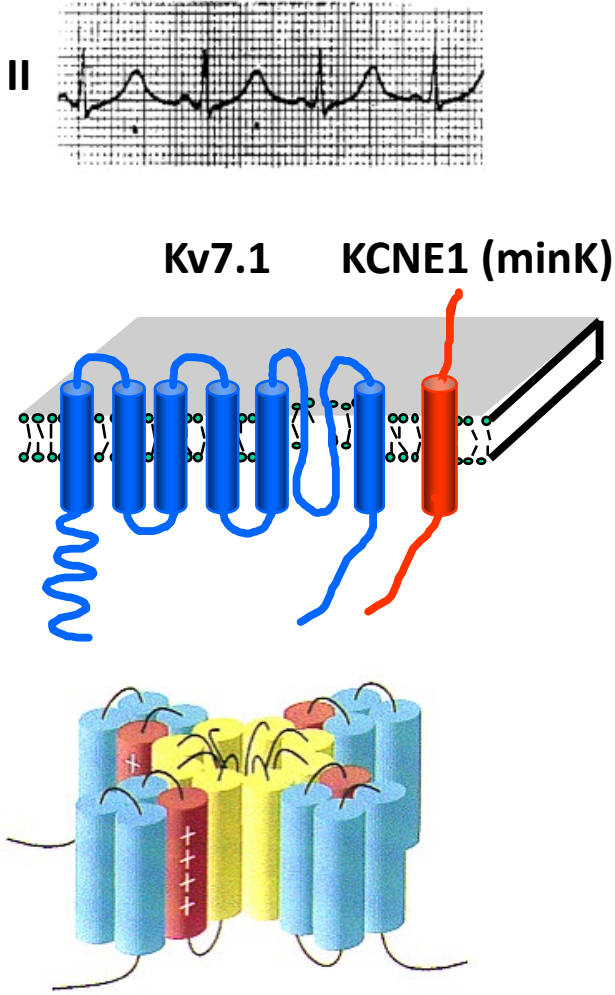


Patch-clamp

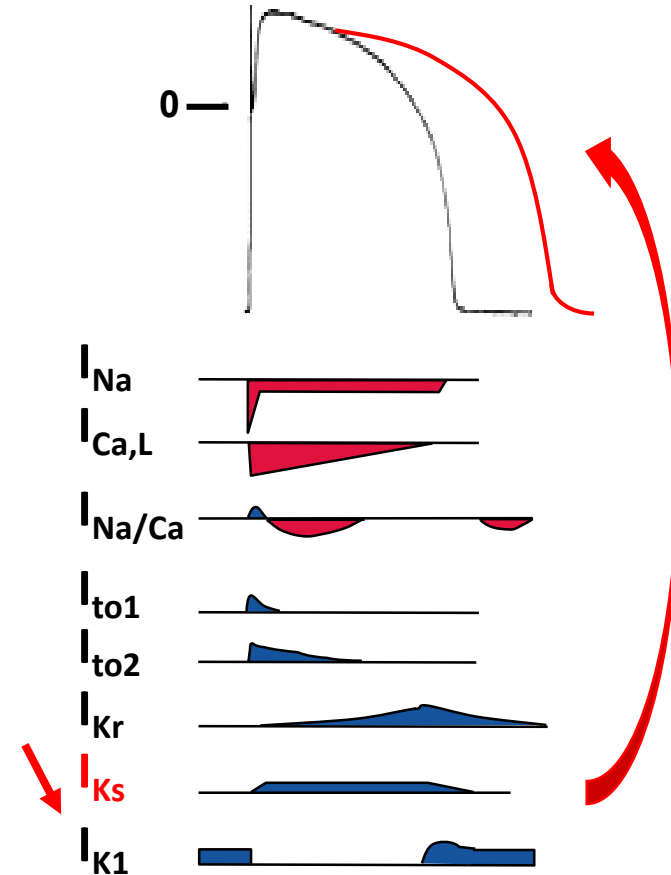


Mécanismes cellulaires du QT long : exemple de LQT1

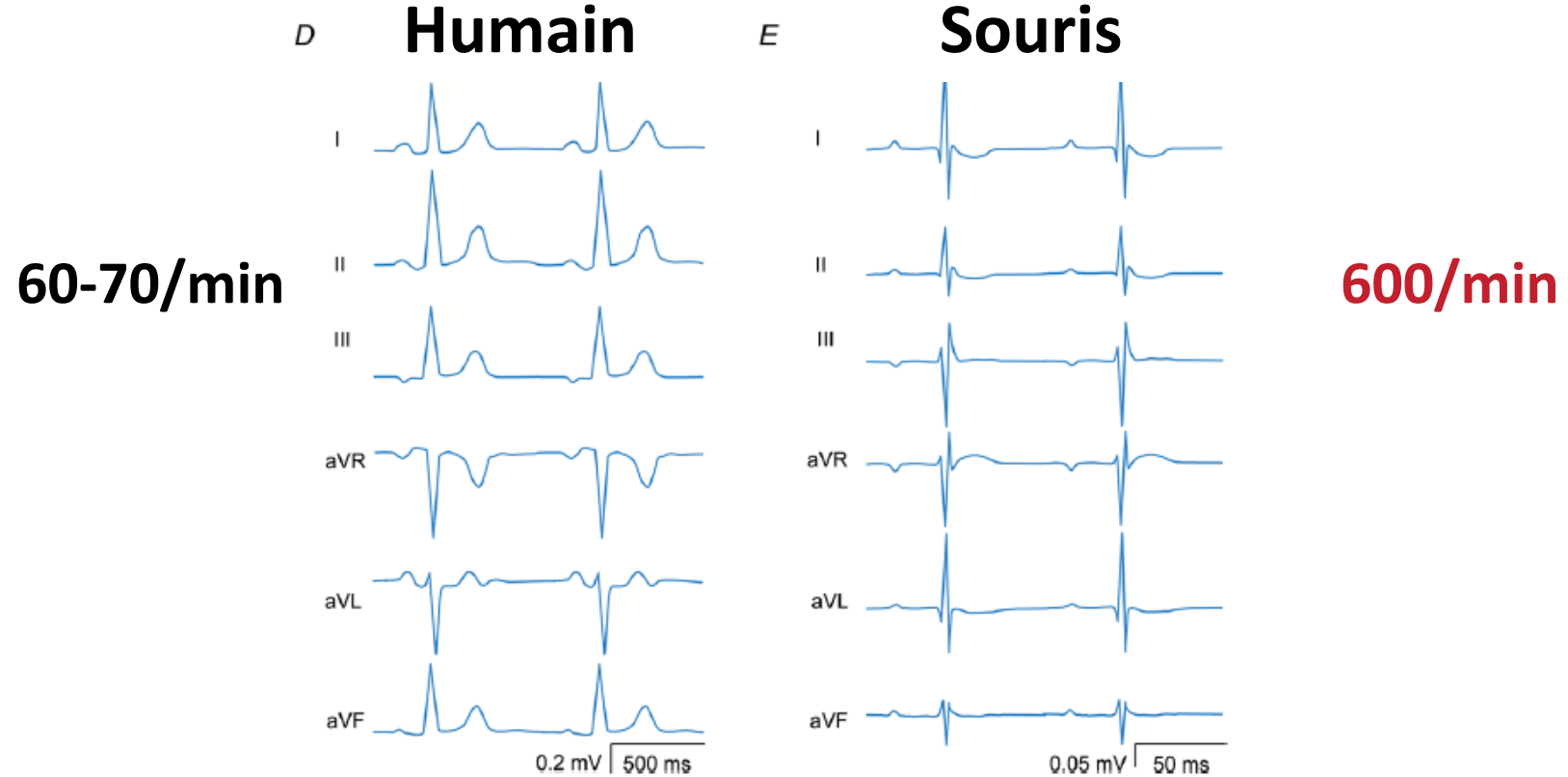
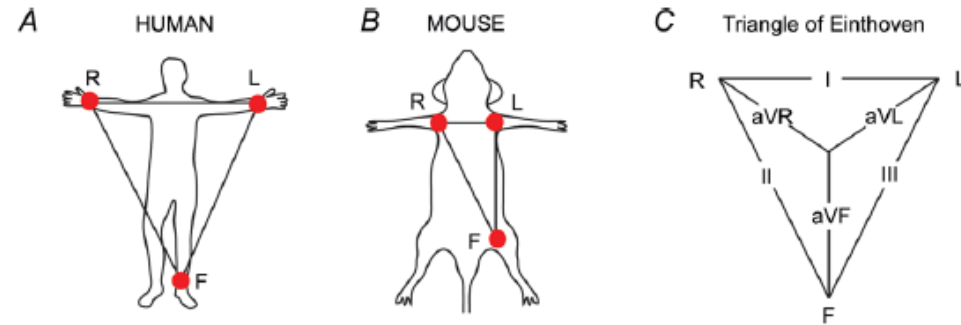
Mutations sur *KCNQ1* (Kv7.1) \Rightarrow perte de fonction



Shalaby et al, *Circulation* 1997; 96:1720-1.

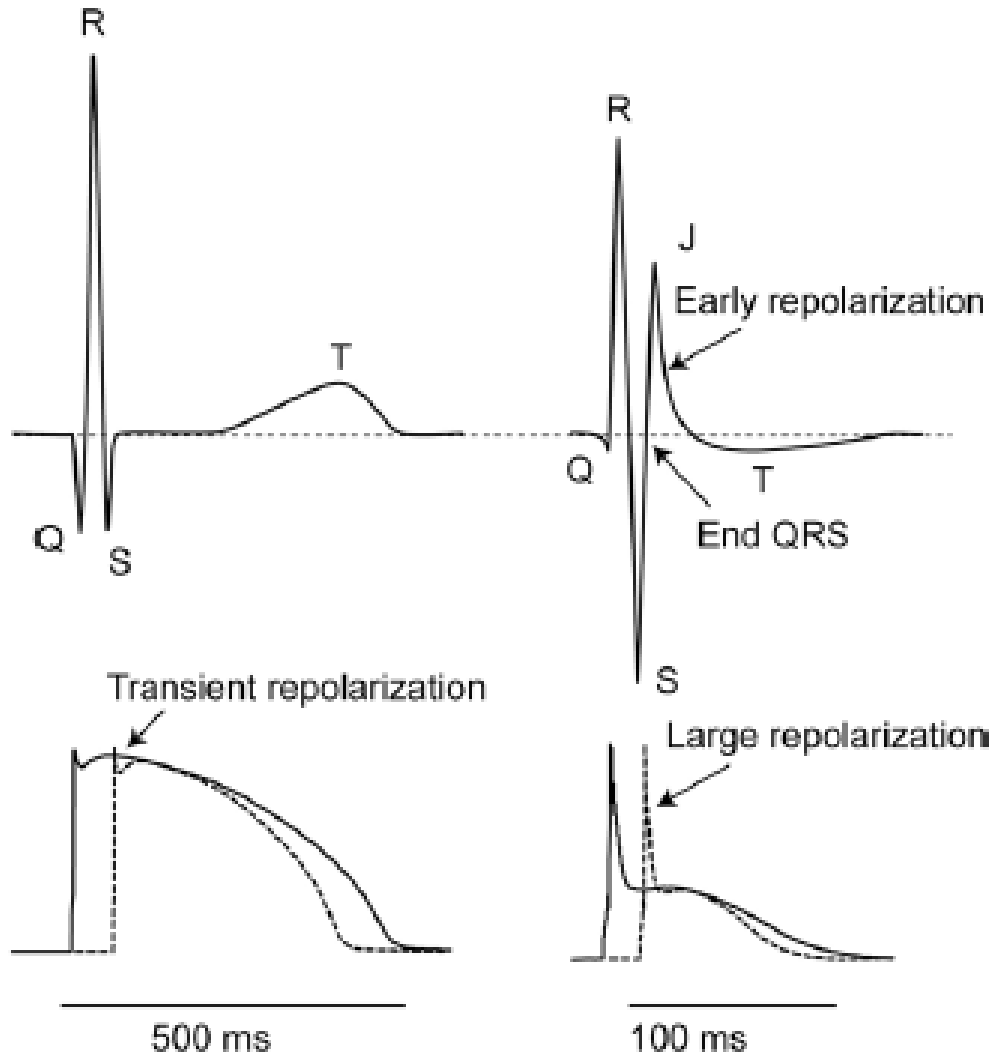


Limites du modèle murin



Limites du modèle murin : la repolarisation

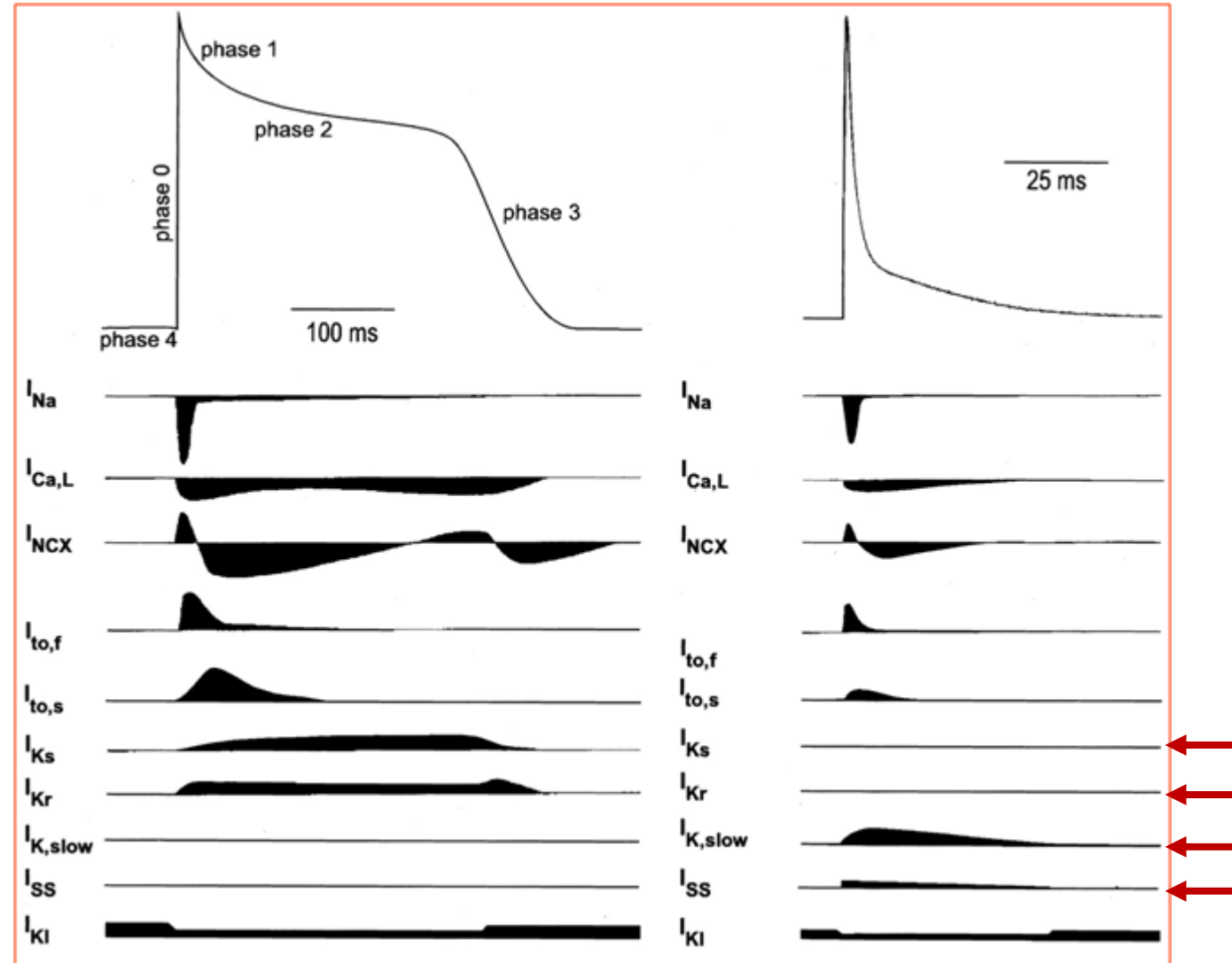
Humain



Souris

Humain

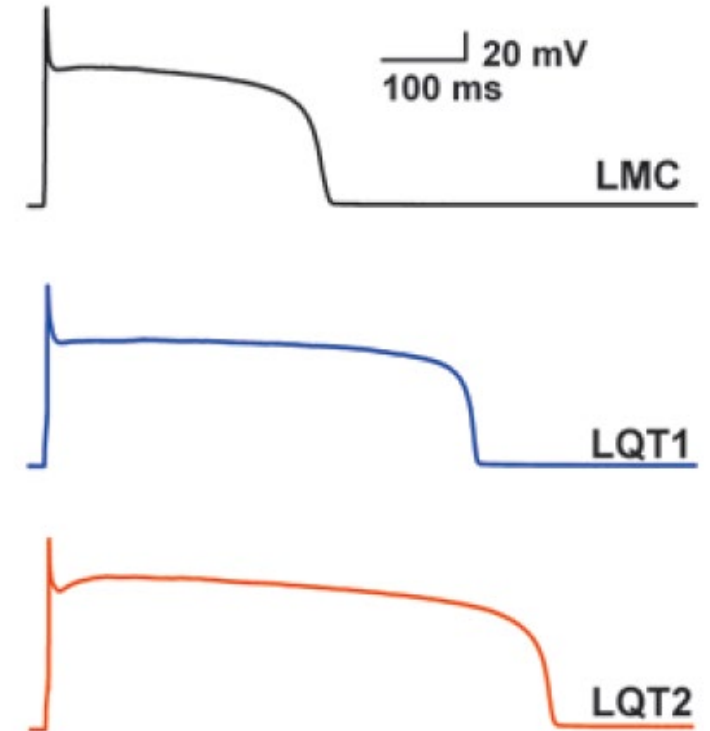
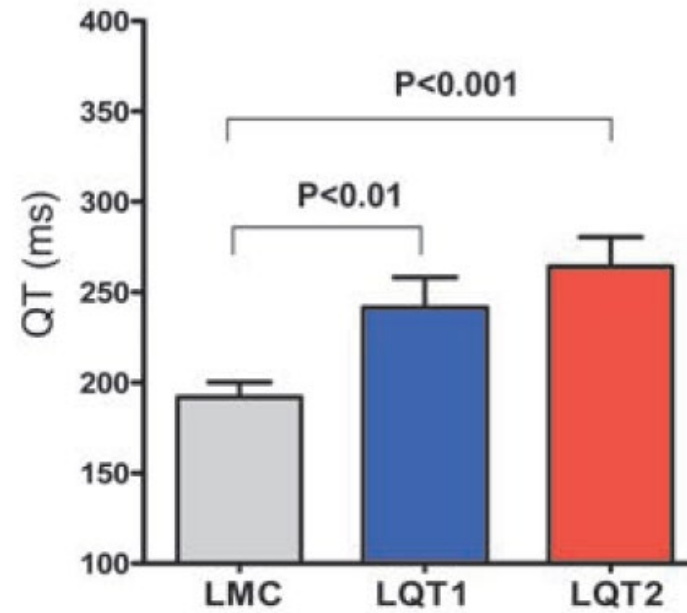
Souris



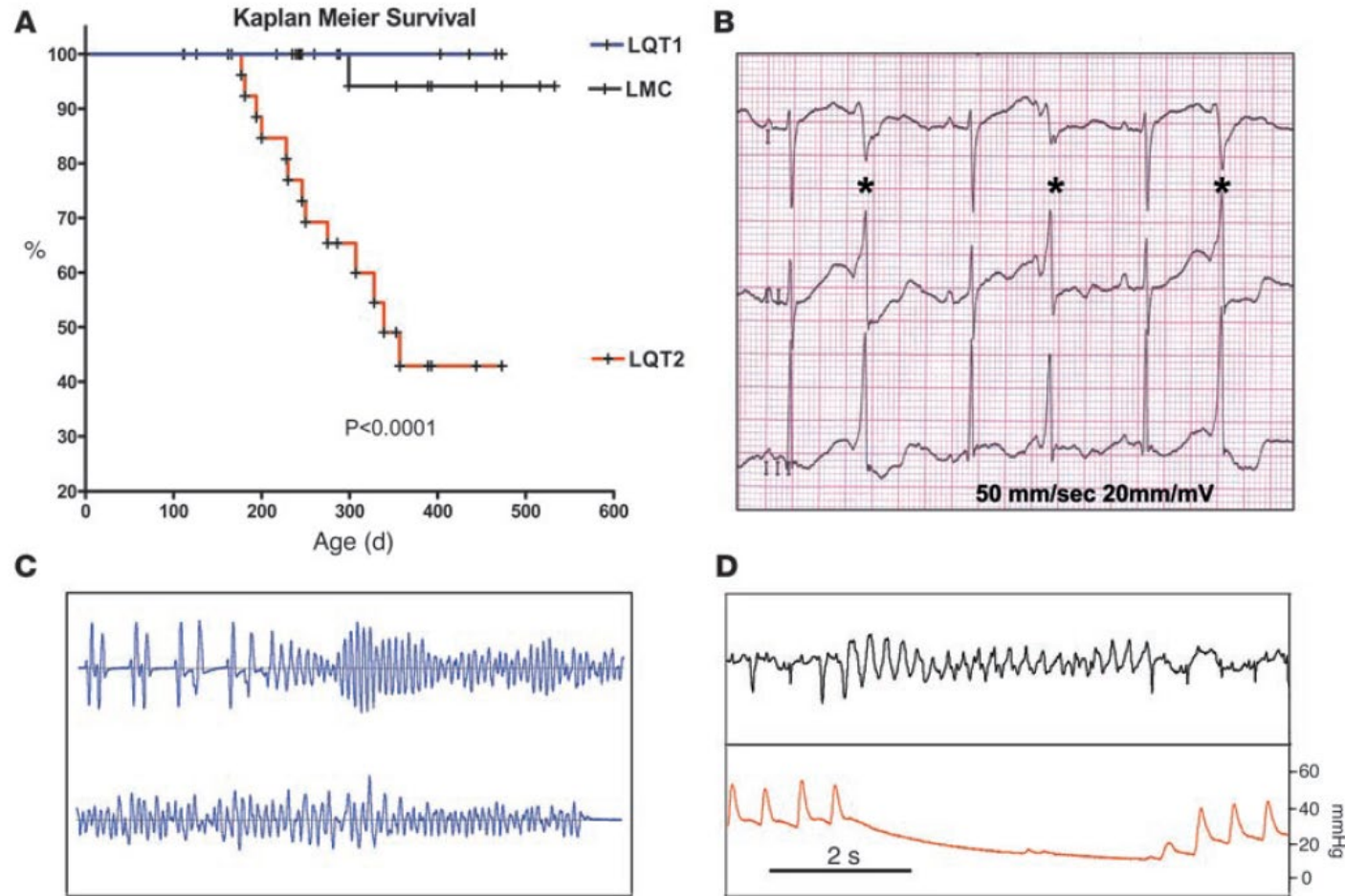
Lapins transgéniques

Surexpression de $K_v7.1$ (KvLQT1) avec mutation p.Y315S → LQT1

Surexpression de $K_v11.1$ (HERG) avec mutation p.G628S → LQT2



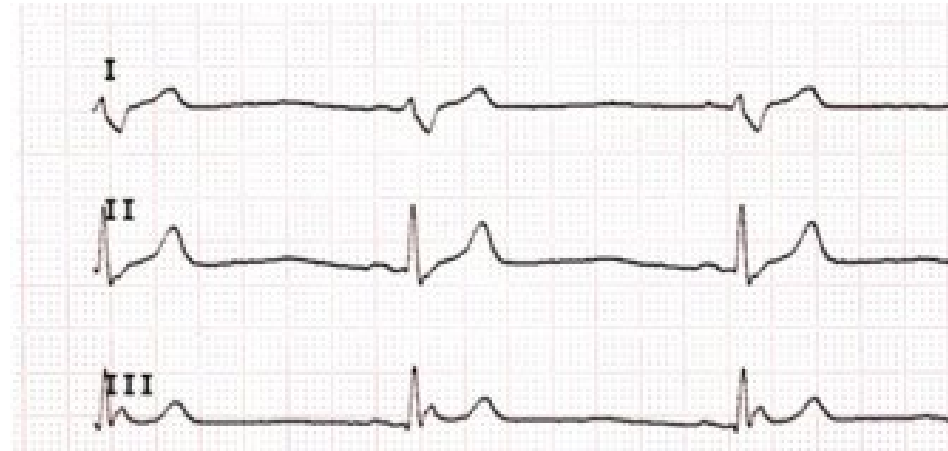
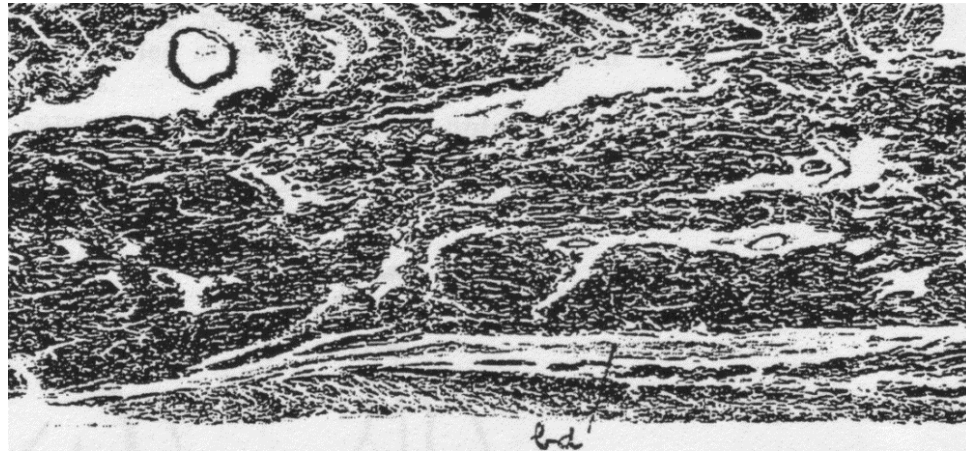
Les lapins transgéniques ont des arythmies sévères → morts subites



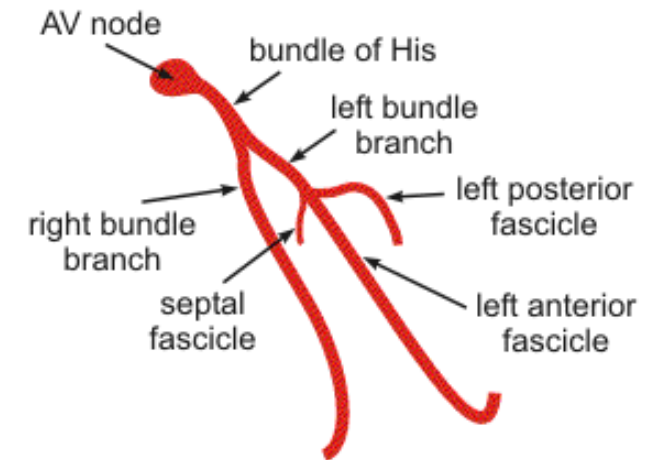
Modèle pertinent pour

1. déterminer les mécanismes des arythmies
2. tester de nouvelles approches thérapeutiques

Troubles progressifs de la conduction cardiaque

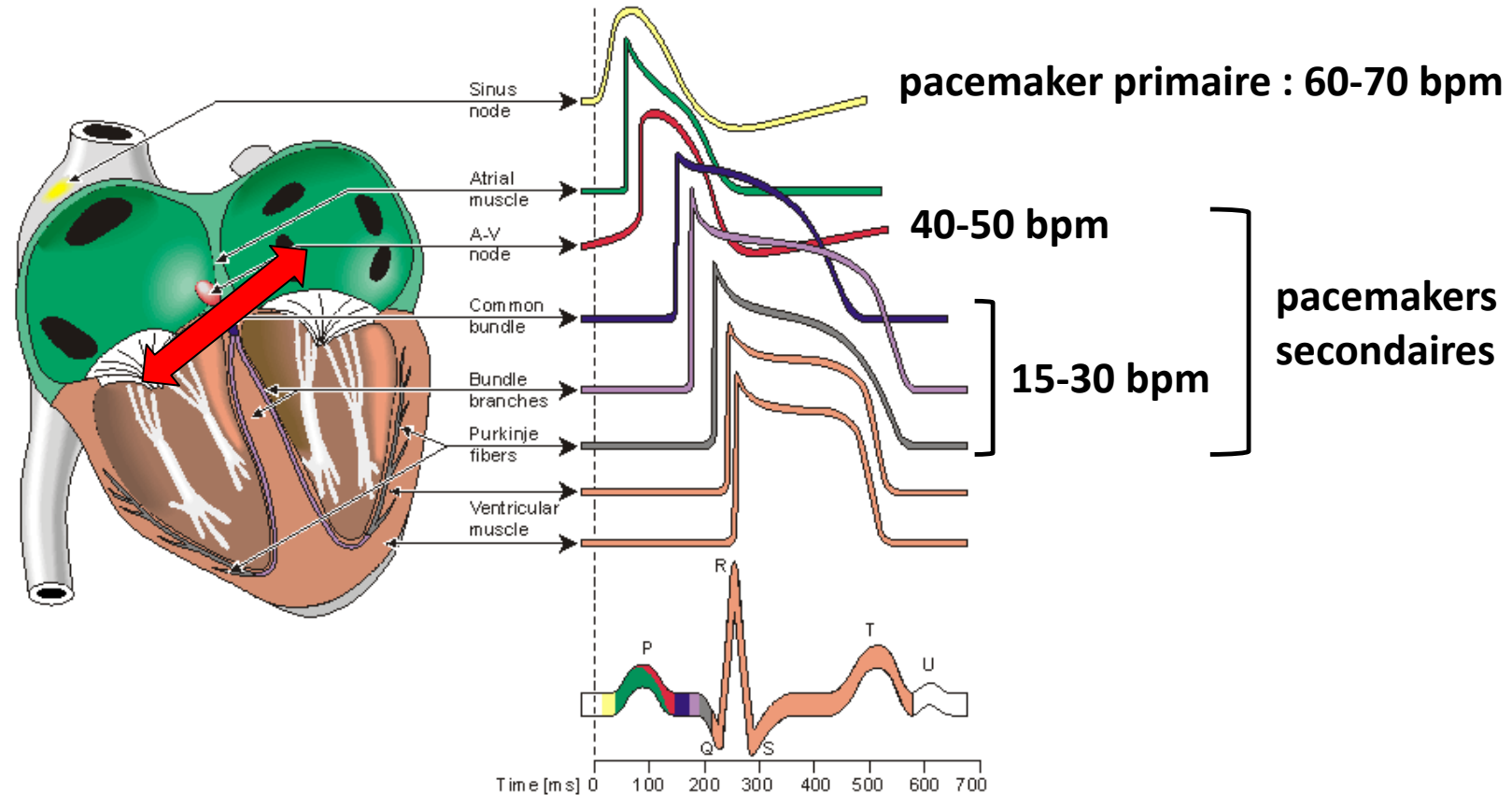


- une des principales causes d'implantation de pacemakers
- un processus lent se développant sur des décennies
- atteinte des faisceaux de His et de ses branches
- différents aspects à l'ECG: blocs de branche, BAV...
- fibrose *post-mortem*



➔ **Hypothèse de Lenègre : maladie dégénérative due à l'apparition de fibrose avec l'âge**

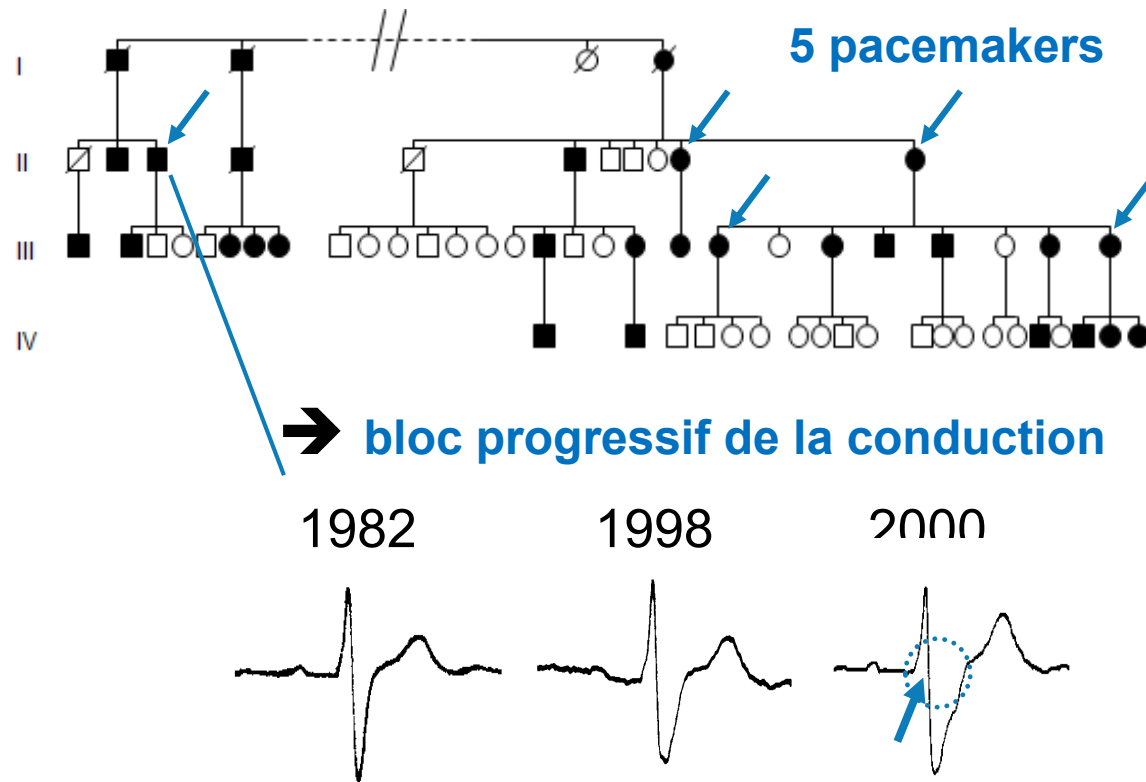
Bloc auriculo-ventriculaire



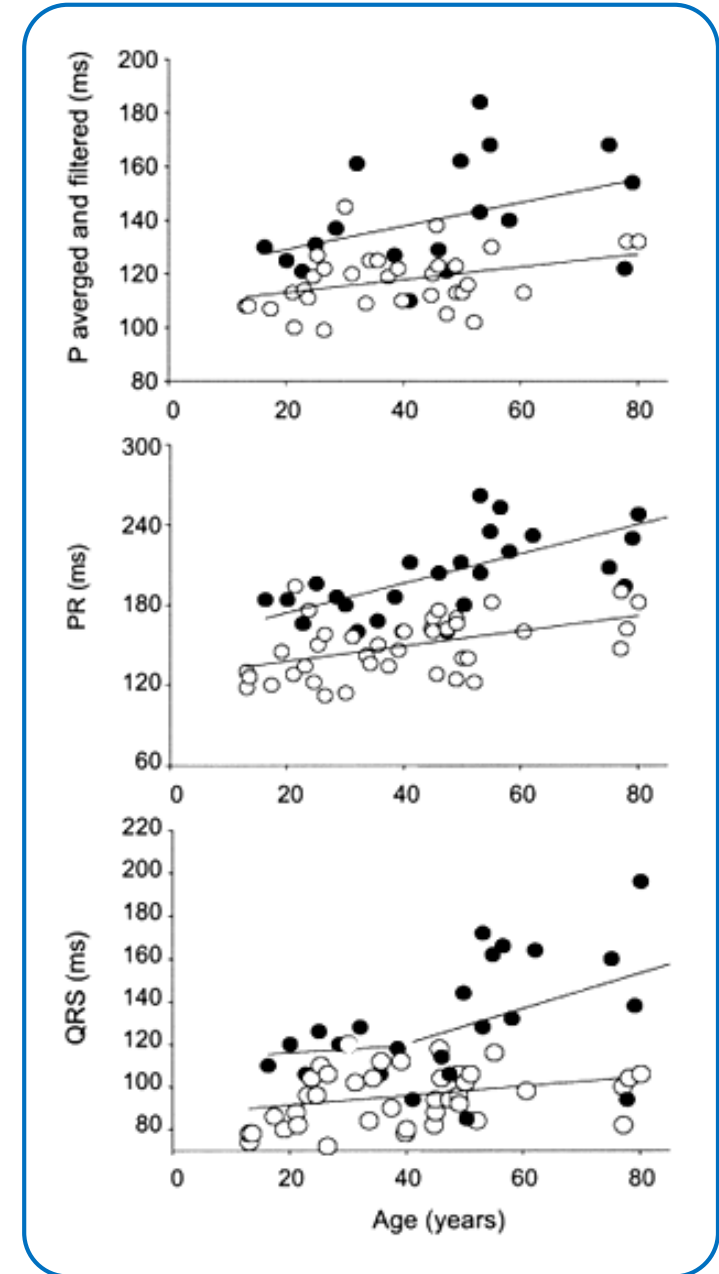
bloc auriculo-ventriculaire



Troubles progressifs de la conduction cardiaque



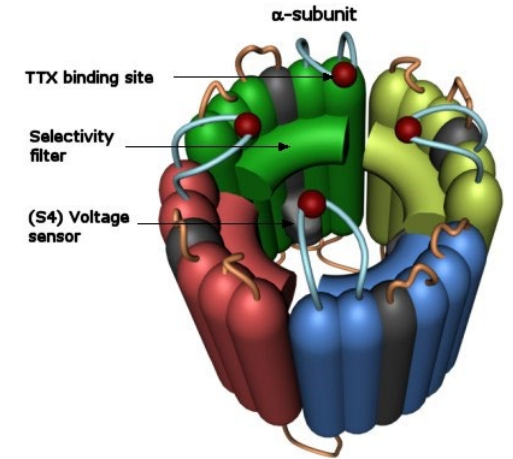
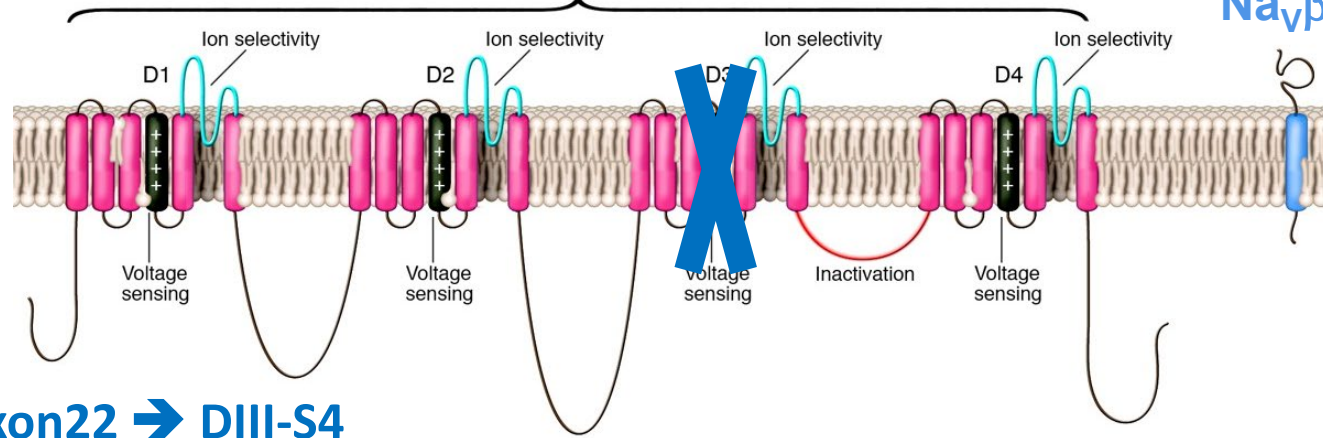
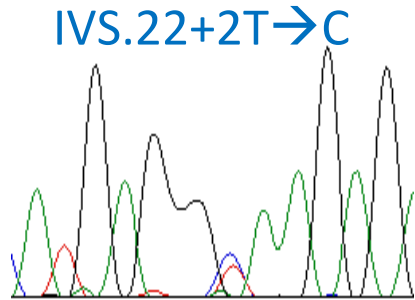
- Augmentation progressive des troubles de la conduction
- Variabilité des défauts de conduction



Le gène impliqué : *SCN5A*

Na_v1.5

Na_vβ1

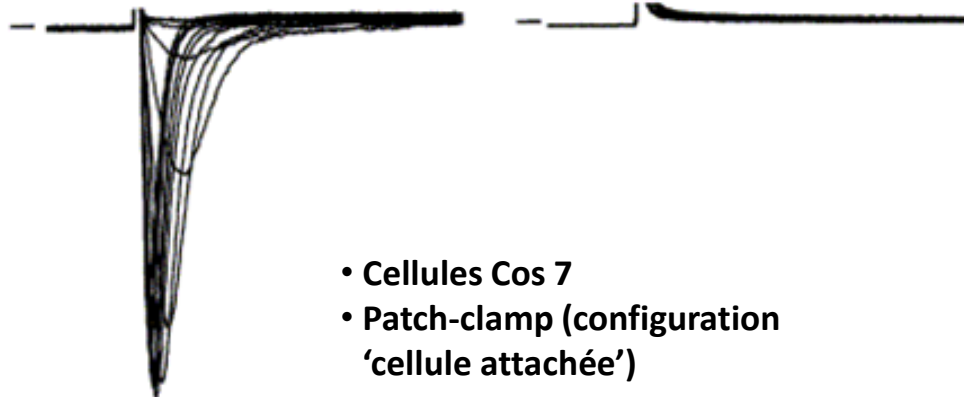


Délétion de l'exon22 → DIII-S4

Perte de fonction du canal Na_v1.5

Na_v1.5 WT + Na_vβ1

Na_v1.5 Δex.22 + Na_vβ1



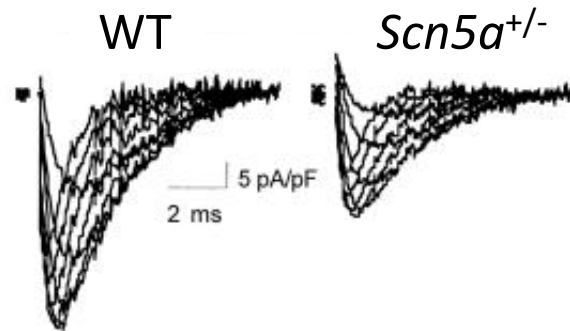
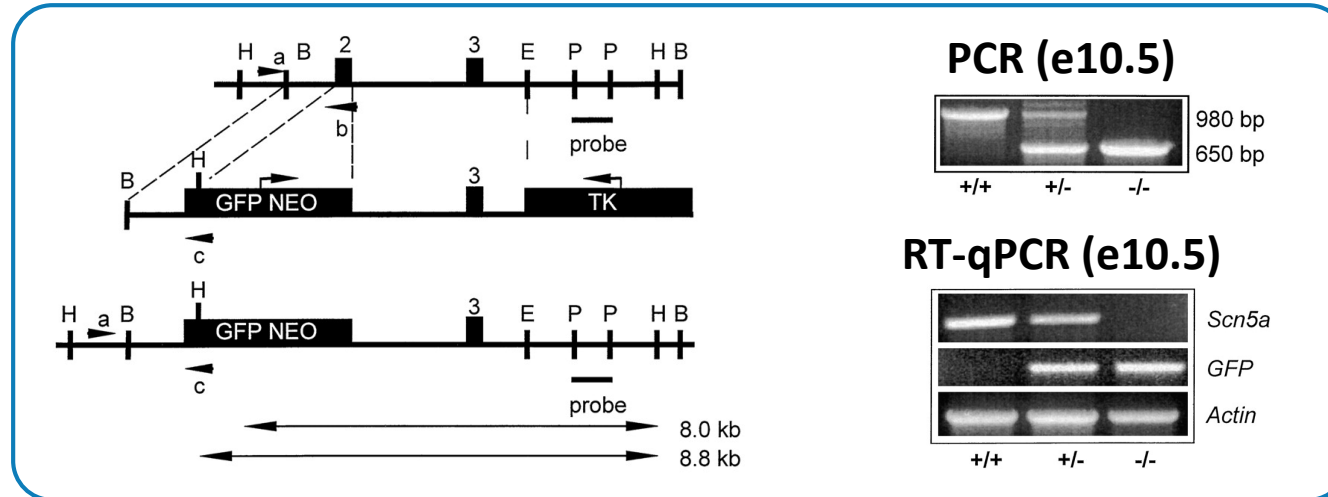
- Cellules Cos 7
- Patch-clamp (configuration 'cellule attachée')

**Haplo-insuffisance
(50% de réduction d'I_{Na})**

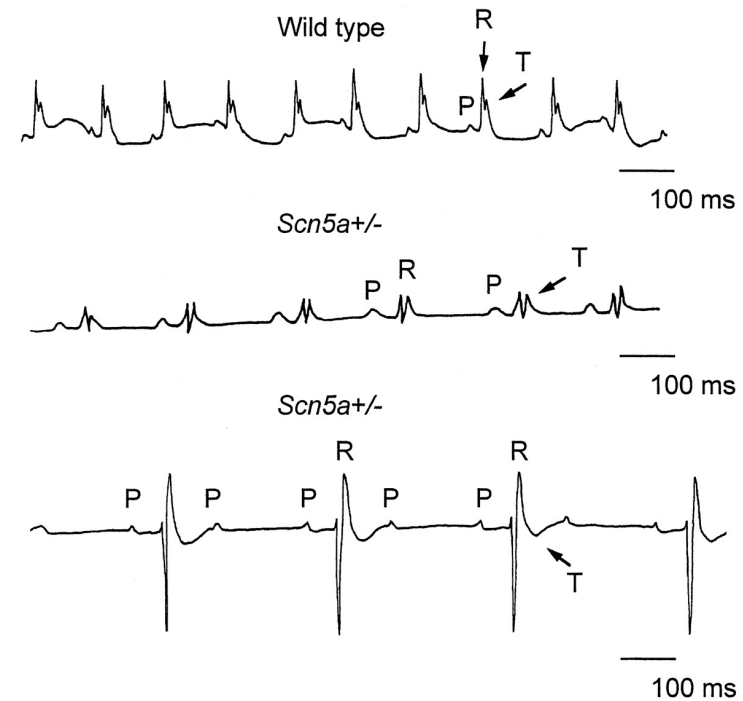


effets du vieillissement ?

La souris *Scn5a*^{+/-}



≈ 50% diminution d' I_{Na}



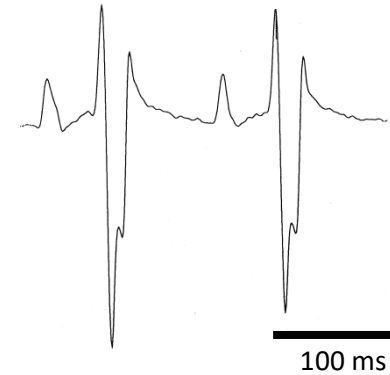
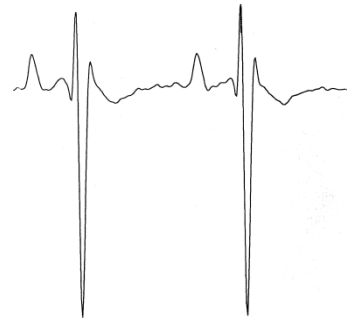
Les souris *Scn5a*^{+/-} présentent un phénotype hétérogène

10 weeks old

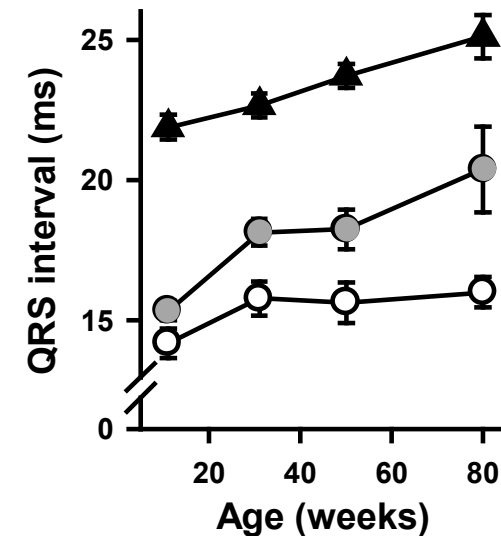
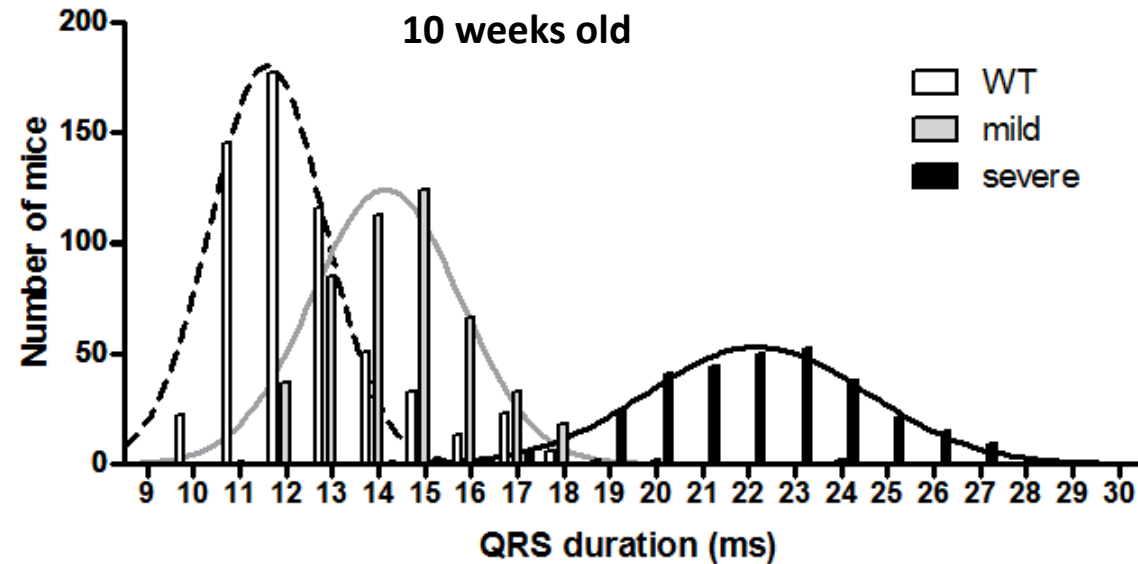
□ WT

■ mild *Scn5a*^{+/-}

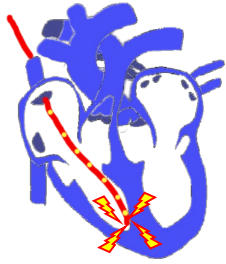
■ severe *Scn5a*^{+/-}



WT = wild type (contrôle)



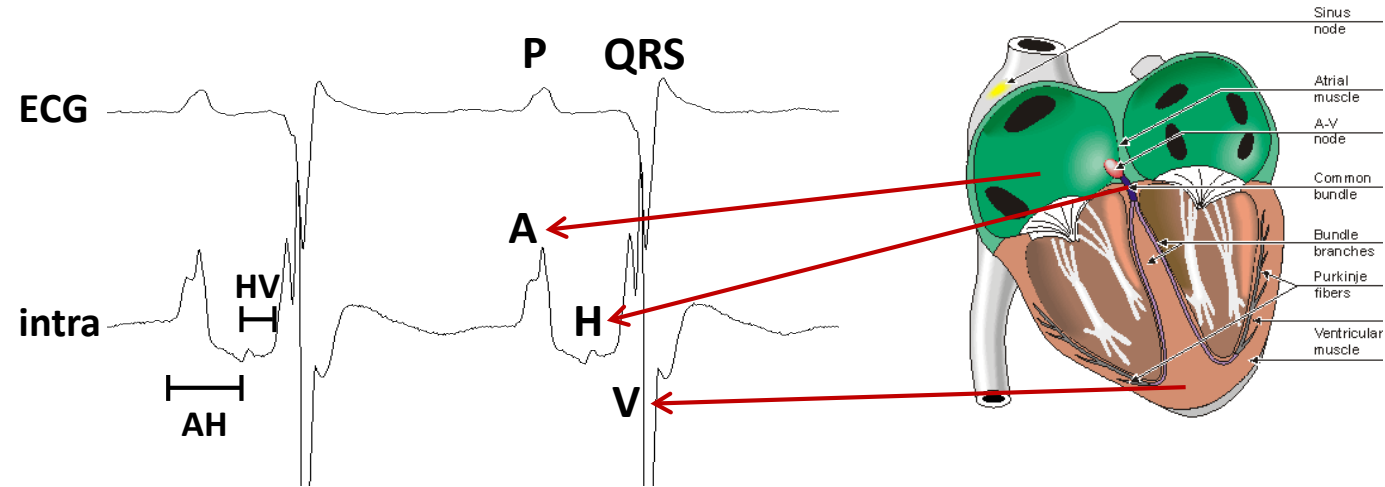
Altération de la conduction dans le réseau His-Purkinje



Wild-type
(n=10; 19 ± 1 weeks old)

AH: 33.1 ± 2.5 ms

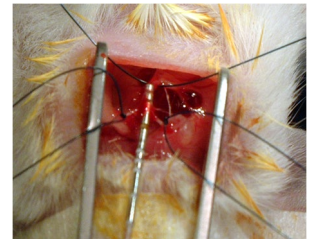
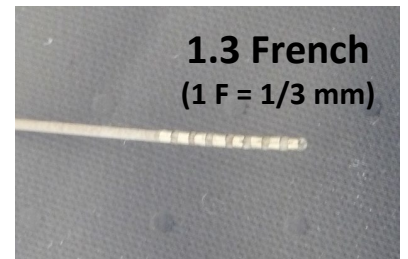
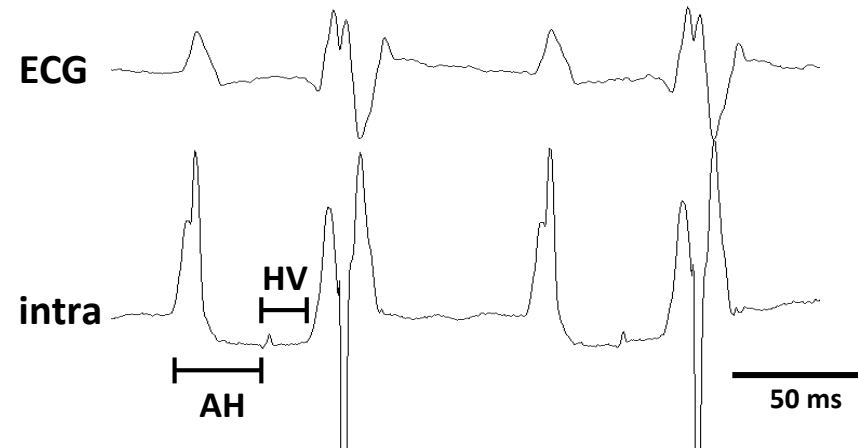
HV: 12.6 ± 1.1 ms



***Scn5a*^{+/-}**
(n=15; 21 ± 1 weeks old)

AH: 35.6 ± 1.8 ms

HV: 18.7 ± 1.7 ms **



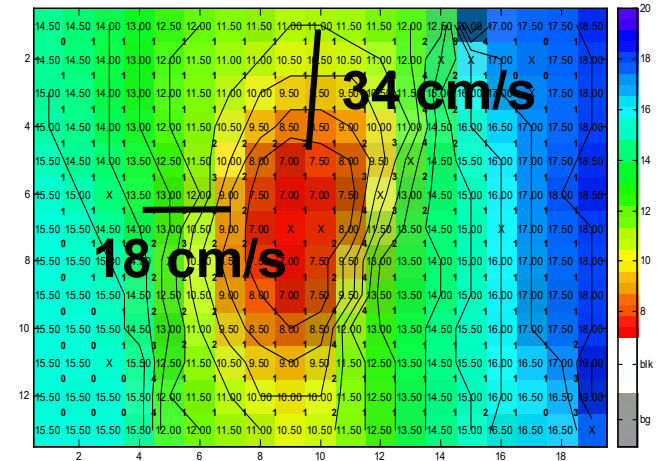
Altération de la conduction ventriculaire

technique de Langendorff

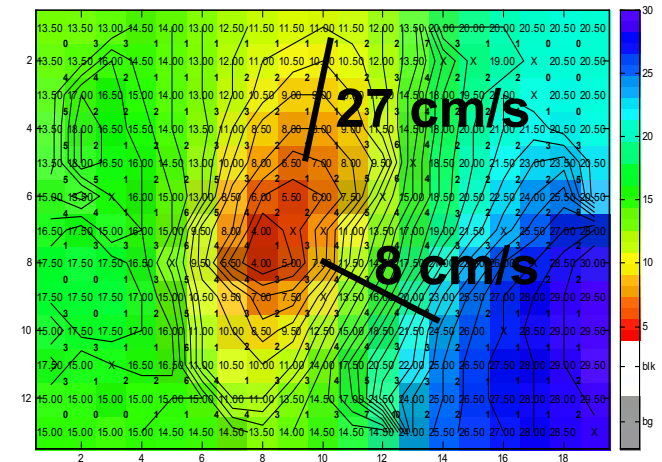


réseau d'électrodes

WT



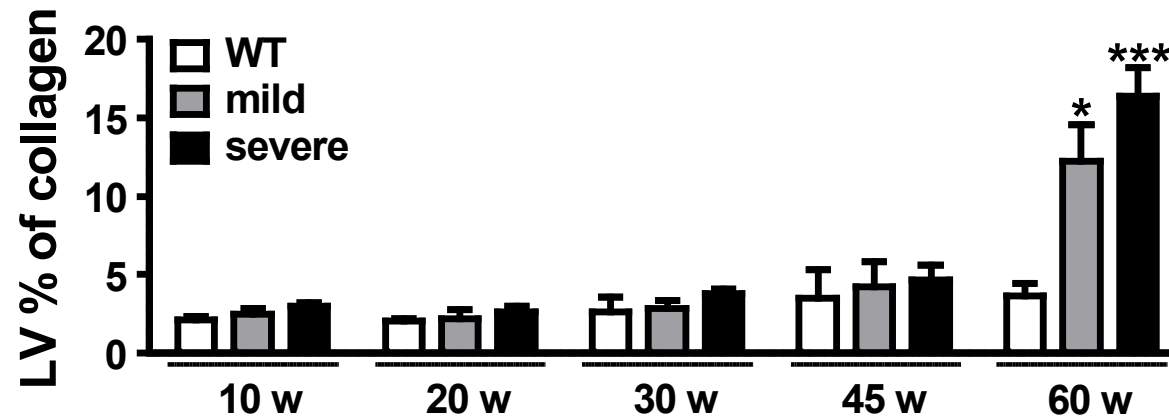
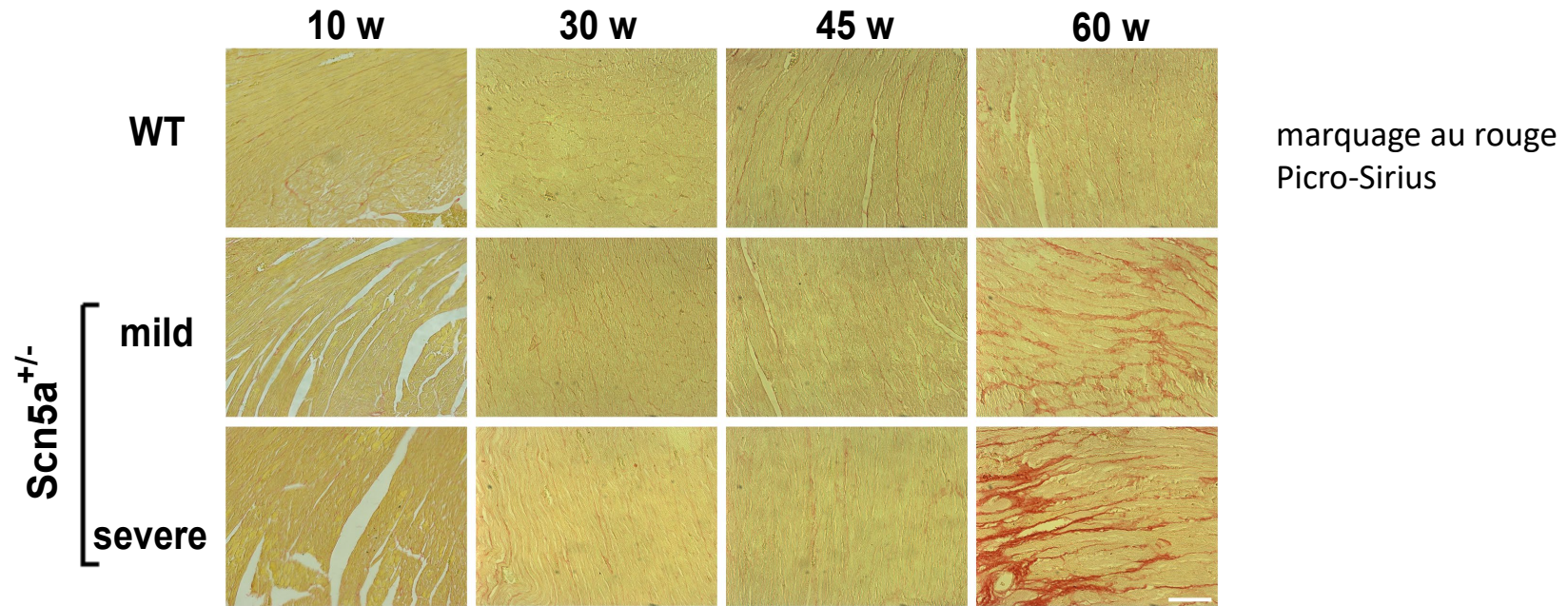
Scn5a^{+/-}



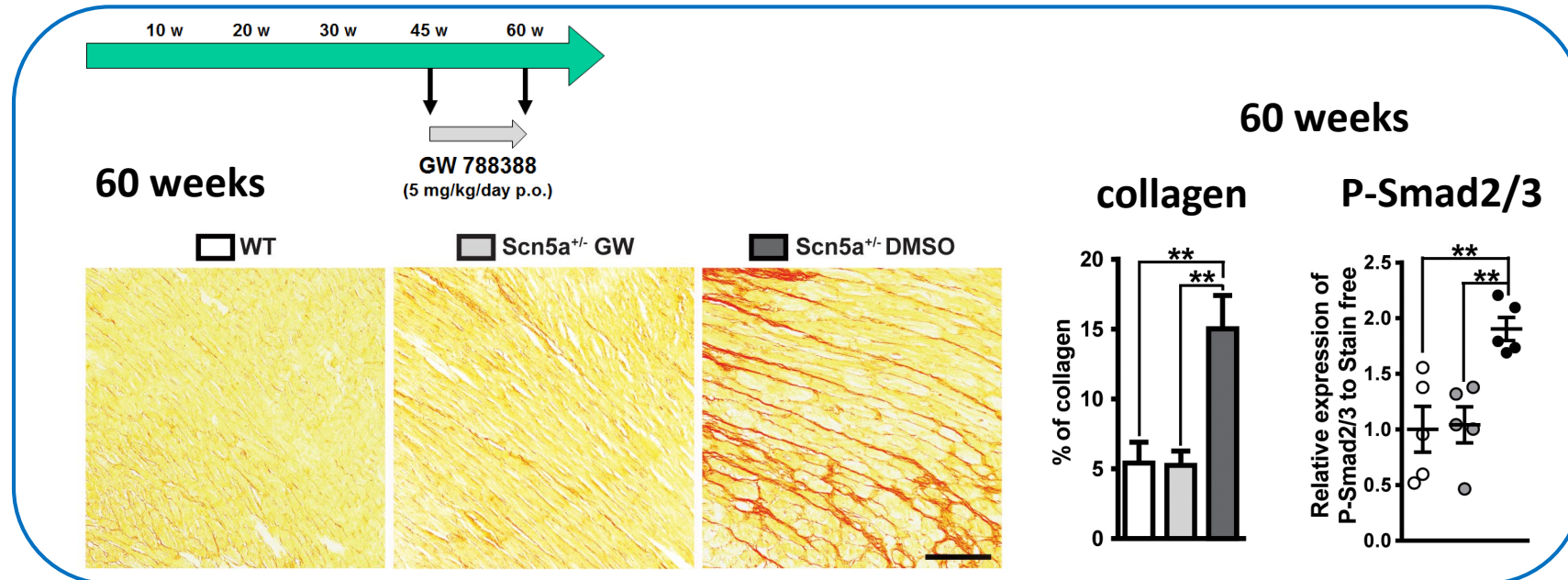
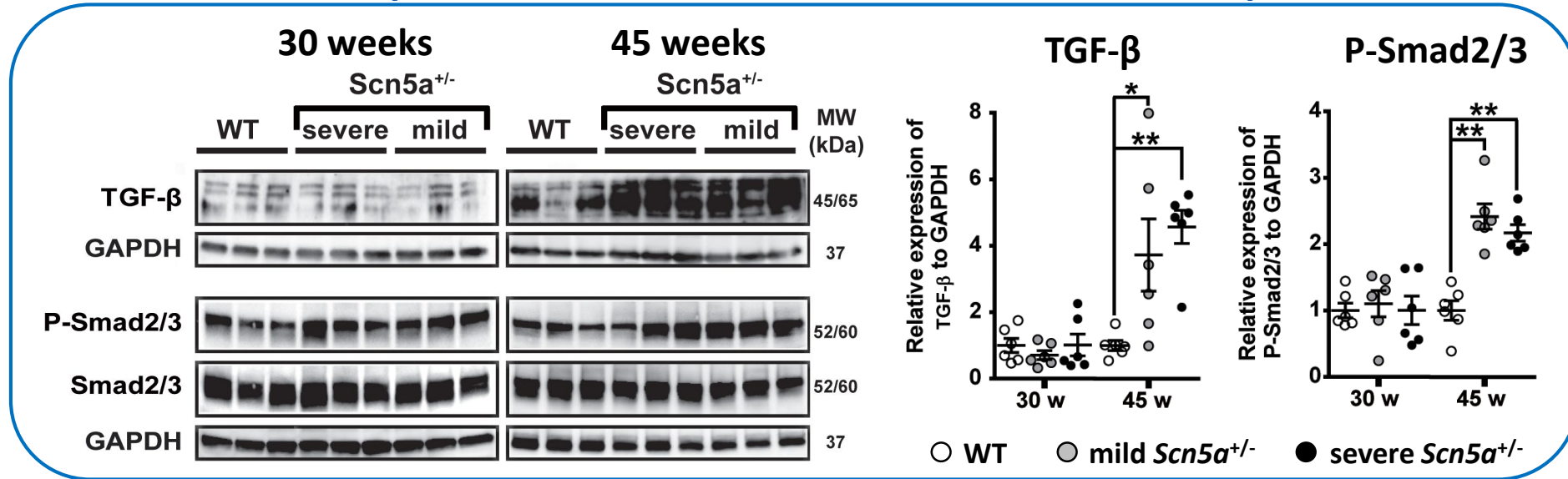
Cartographie électrique :

- ➔ conduction plus altérée chez les souris âgées
- ➔ conduction plus altérée (et plus tôt) dans le ventricule droit que dans le ventricule gauche

Apparition de fibrose au cours du vieillissement



Implication de la voie du TGF- β



Conclusion

Les souris *Scn5a*^{+/-} représentent un bon modèle de troubles de la conduction cardiaque liés à *SCN5A*.

L'haplo-insuffisance de *Scn5a* conduit à des défauts de conduction qui s'aggravent au cours du vieillissement à cause d'un développement secondaire de fibrose par l'activation de la voie du TGF- β et une diminution naturelle de l'expression de la connexine 43.

Les troubles progressifs de la conduction cardiaque liés à une perte de fonction de *SCN5A* résultent non seulement de la mutation de *SCN5A* mais aussi d'un remodelage secondaire du myocarde.

Multifocal Ectopic Purkinje-Related Premature Contractions

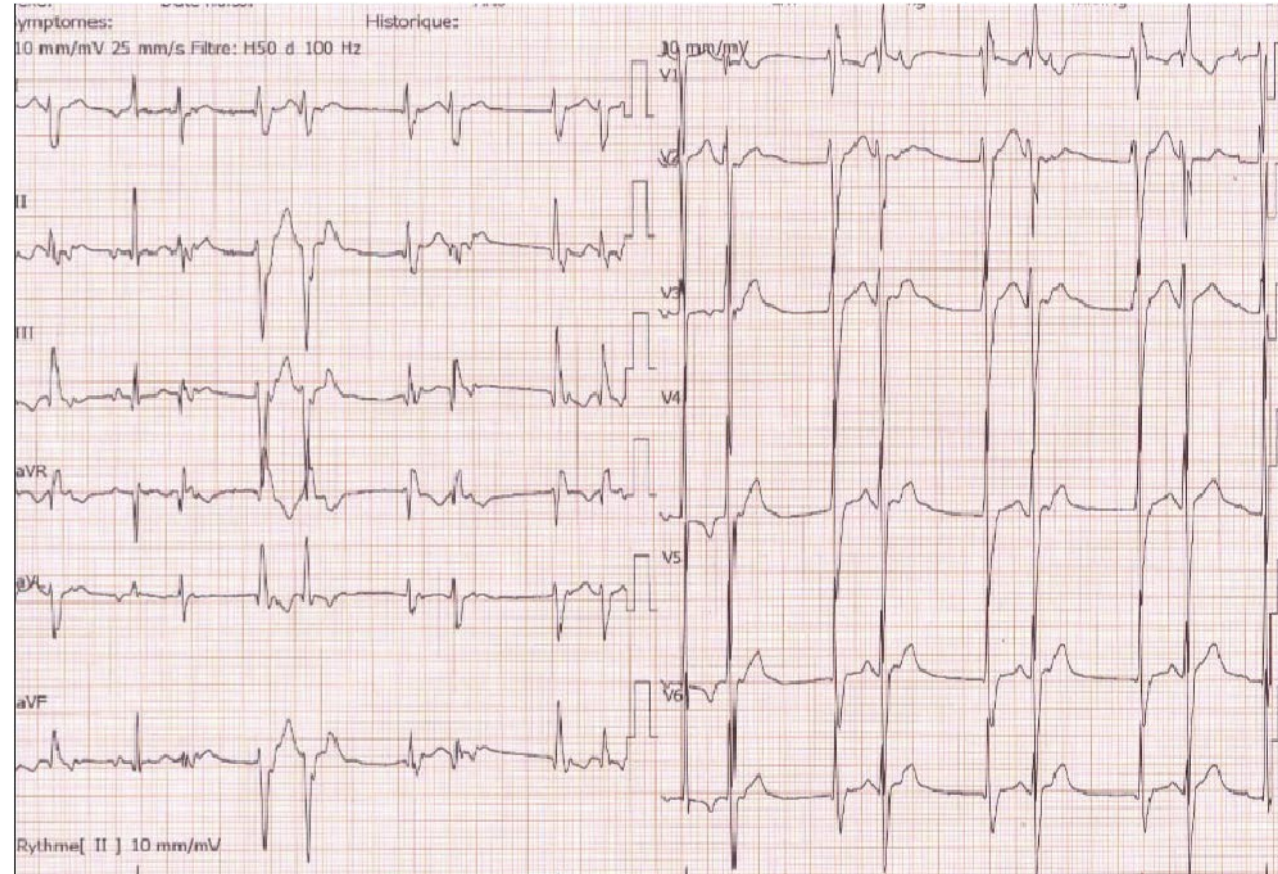
A New *SCN5A*-Related Cardiac Channelopathy

Gabriel Laurent, MD, PhD,* Samuel Saal, MD,† Mohamed Yassine Amarouch, PhD,‡§||
Delphine M. Béziau, MSc,‡§|| Roos F. J. Marsman, MSc,¶|| Laurence Faivre, MD, PhD,†
Julien Barc, PhD,‡|| Christian Dina, PhD,‡|| Geraldine Bertaux, MD,* Olivier Barthez, MD,*
Christel Thauvin-Robinet, MD, PhD,† Philippe Charron, MD, PhD,# Véronique Fressart, MD, PhD,**
Alice Maltret, MD,†† Elisabeth Villain, MD,†† Estelle Baron, BA,‡|| Jean Mérot, PhD,‡§||
Rodolphe Turpault, PhD,‡‡|| Yves Coudière, PhD,‡‡|| Flavien Charpentier, PhD,‡§||§§
Jean-Jacques Schott, PhD,‡||§§ Gildas Loussouarn, PhD,‡§|| Arthur A. M. Wilde, MD, PhD,¶||
Jean-Eric Wolf, MD, PhD,* Isabelle Baró, PhD,‡§|| Florence Kyndt, PHARM D, PhD,‡|| ||||
Vincent Probst, MD, PhD‡||§§

Dijon, Nantes, and Paris, France; and Amsterdam, the Netherlands

Phénotype du propositus

Patient III.1 (10 ans)



DDVG : diamètre du ventricule gauche en diastole
FEVG: fraction d'éjection du VG

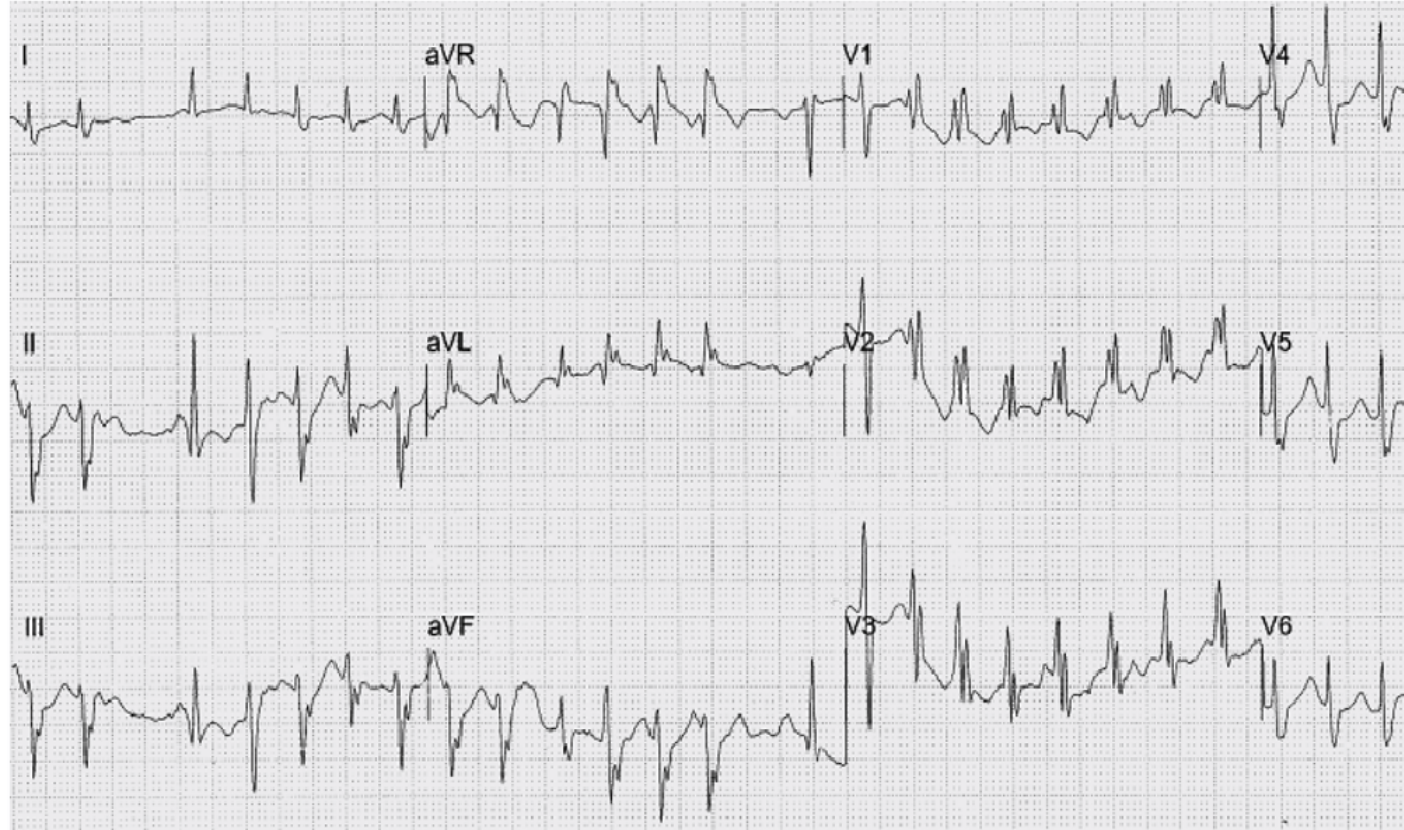
Enregistrement Holter : >50 000 extrasystoles ventriculaires (ESV) / 24h

Exercice sur tapis roulant → disparition des ESV

Echocardiographie : dilatation mineure (DDVG = 54 mm, >97^{ème} centile) ; FEVG = 62%

Phénotype du propositus

Patient III.1 (13 ans)

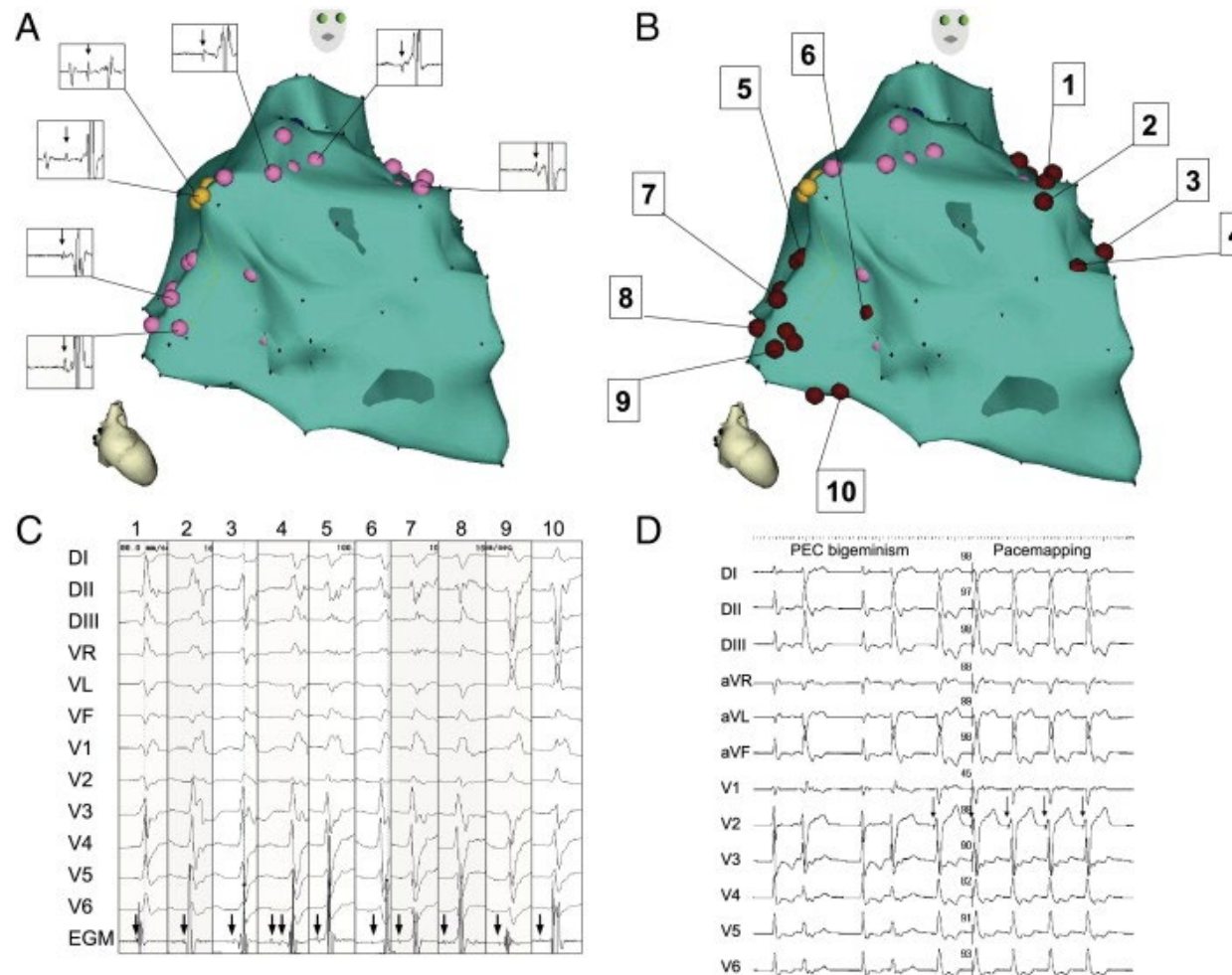


Pertes de conscience répétitives au repos (concomitantes avec tachycardie ventriculaire non soutenue)

Echocardiographie : dilatation ventriculaire (DDVG = 62 mm) et FEVG = 32%

Phénotype des patients

Patient II.4

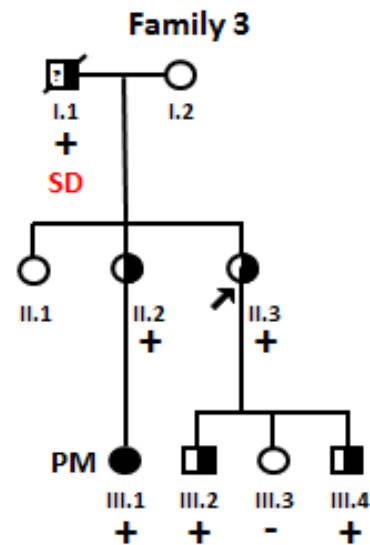
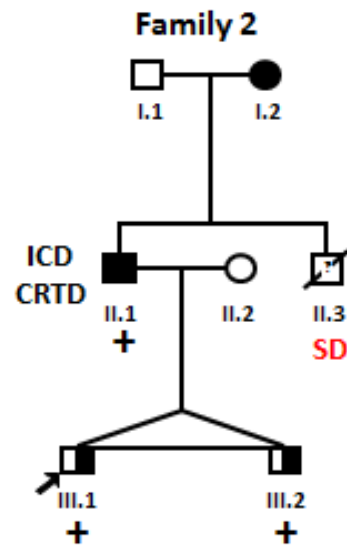
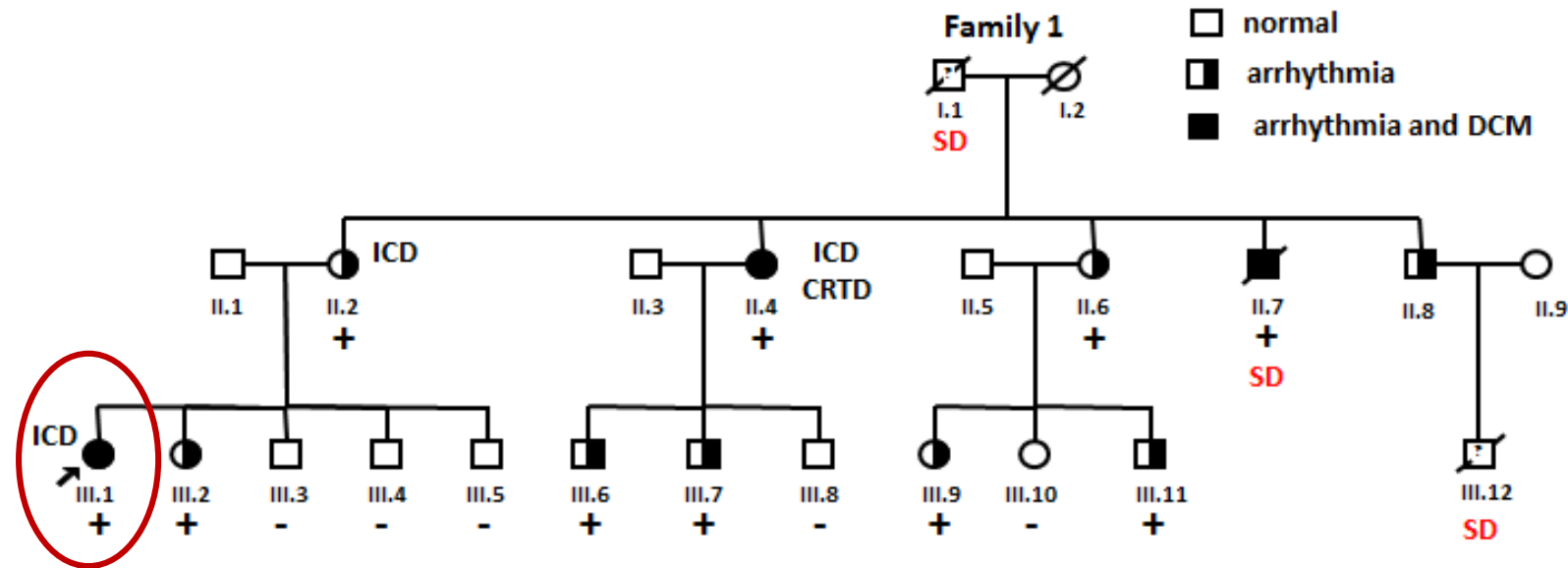


ESV = extrasystole
ventriculaire

Patient III.1

- Plus de 10 foyers d'ESV le long des faisceaux antérieur et postérieur gauches
➔ pas d'ablation possible des foyers arythmogènes
- Implantation d'un défibrillateur + hydroquinidine ➔ ↓ ESV, FEVG = 55% après 6 mois

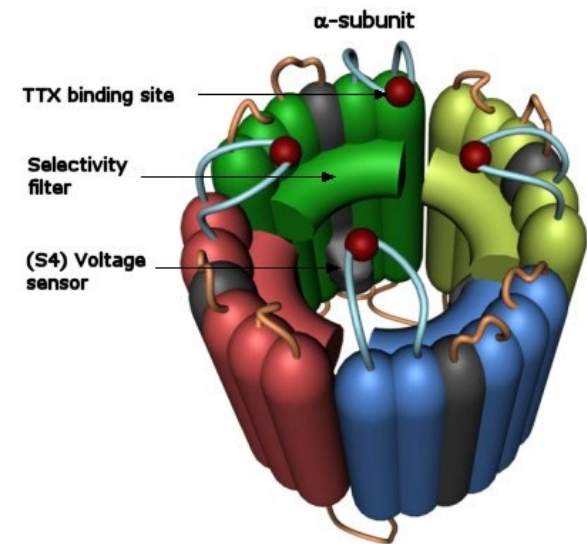
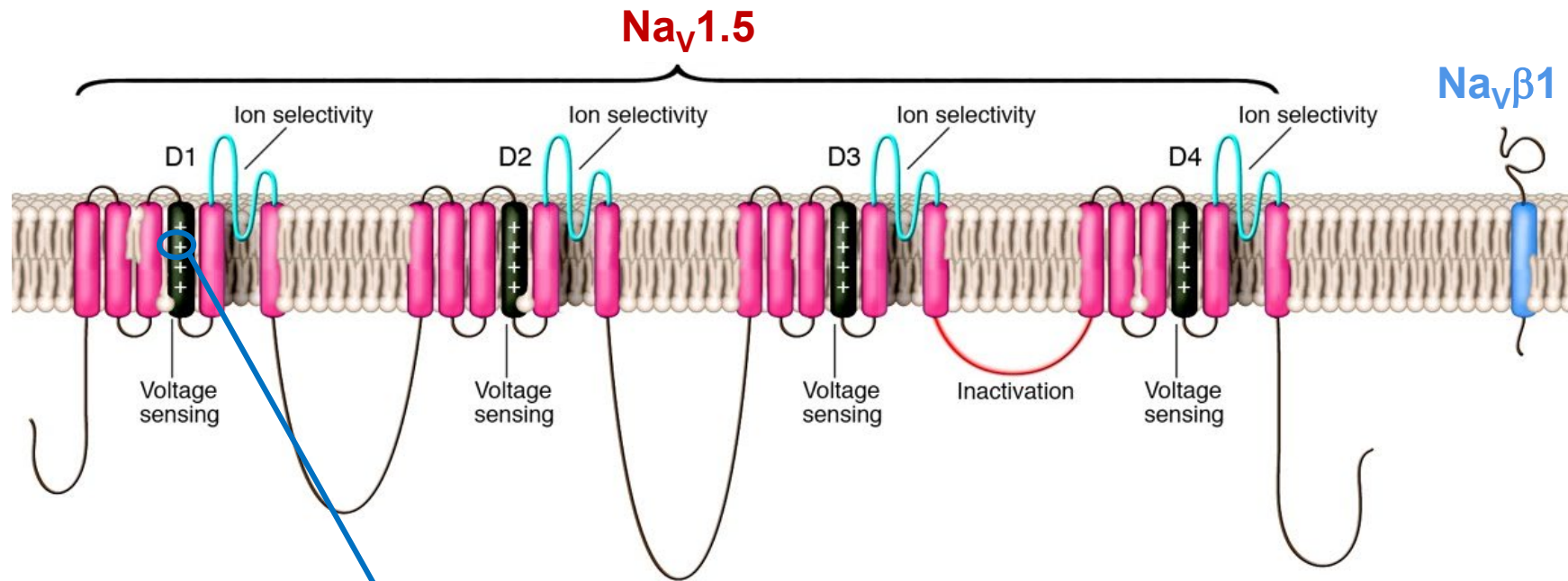
Identification d'une mutation sur *SCN5A*



DCM : dilated cardiomyopathy
SD : sudden death

+: pR222Q Nav1.5 mutation carriers

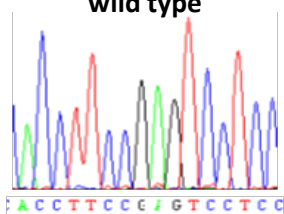
Le gène impliqué : *SCN5A* (canal $\text{Na}_v1.5$)



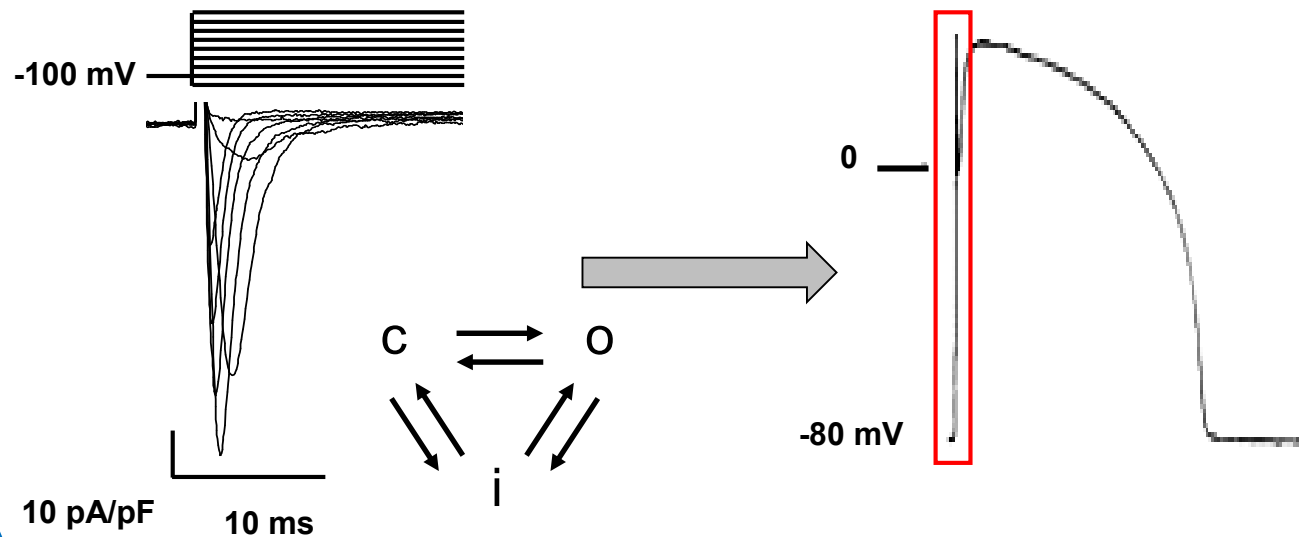
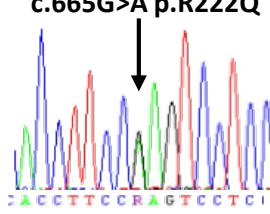
222

Human	AYTTEFVDLGNVSALR T FRVLRALKTISVISG
Rat	AYVSENI KLGNSALR T FRVLRALKTISVIPG
Mouse	AYVSENI KLGNSALR T FRVLRALKTISVIPG
Dog	AYTTEFVDLGNVSALR T FRVLRALKTISVISG
Zebrafish	AYVTEFVDLGNVSALR T FRVLRALKTISVIPG

wild type



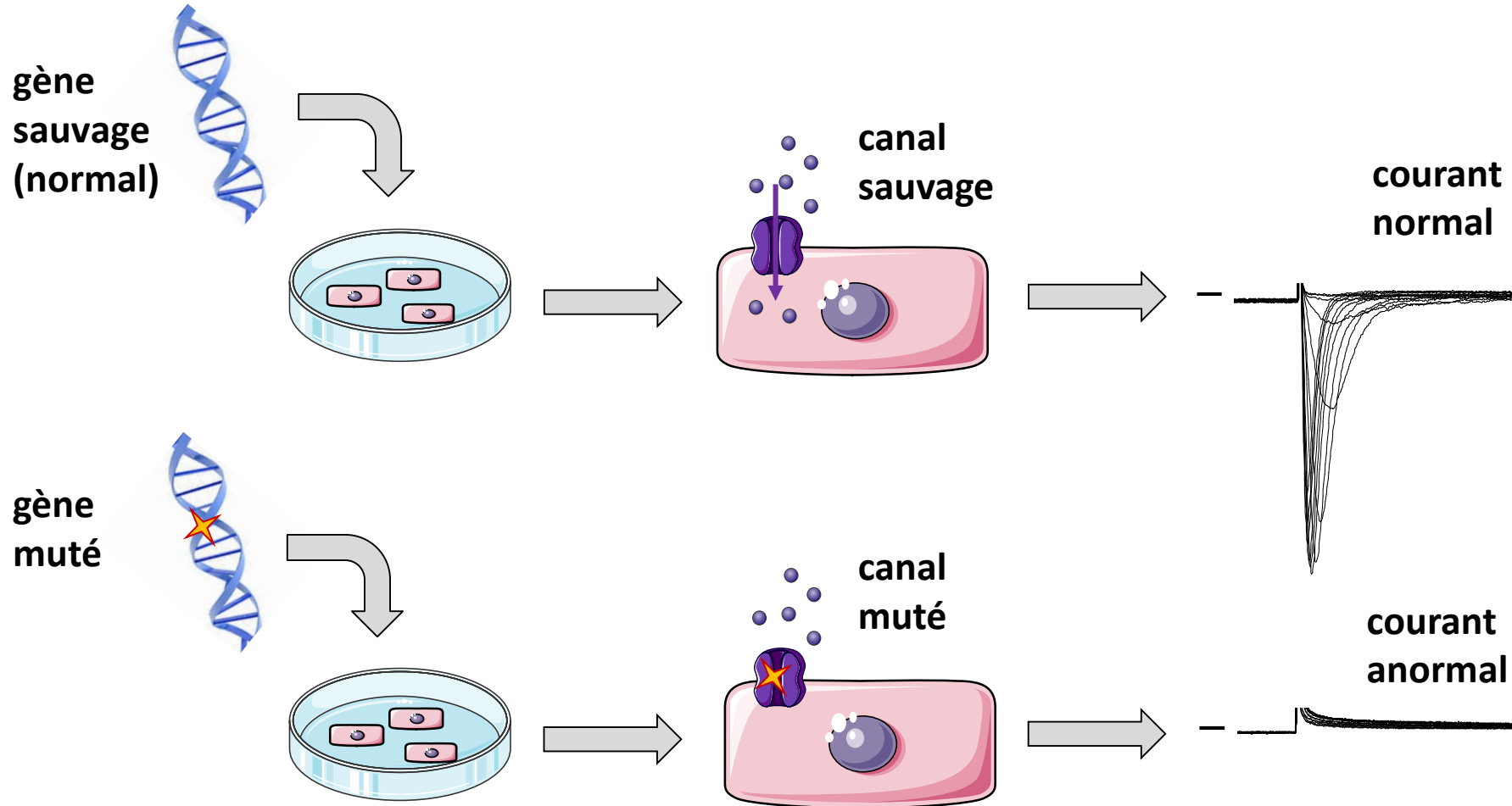
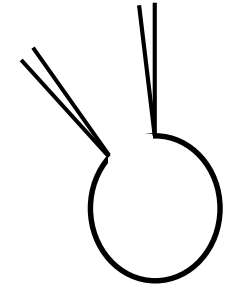
c.665G>A p.R222Q



Caractérisation des effets des mutations

- nécessité de développer des modèles cellulaires alternatifs aux cardiomyocytes des patients
- cellules en culture ne possédant pas les canaux ioniques cardiaques

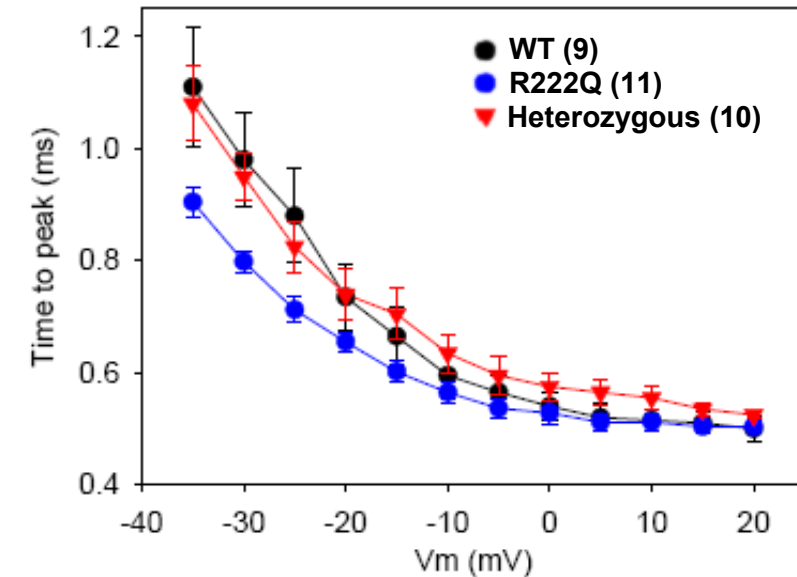
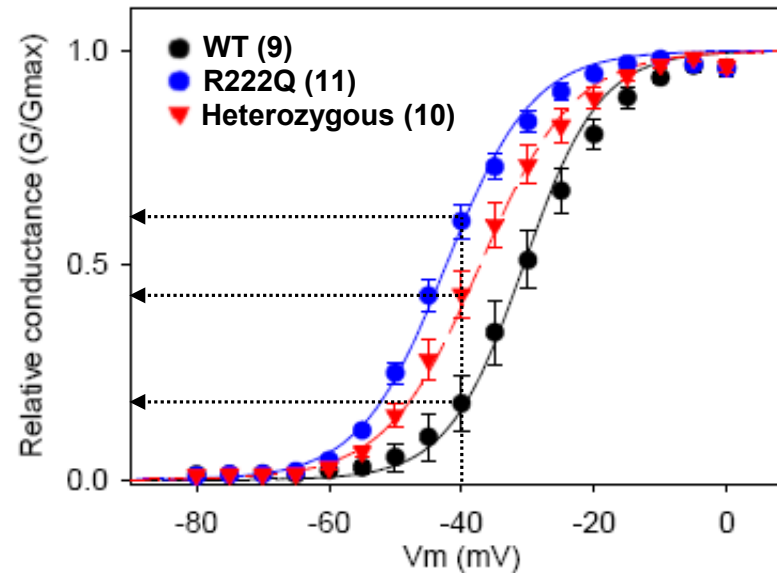
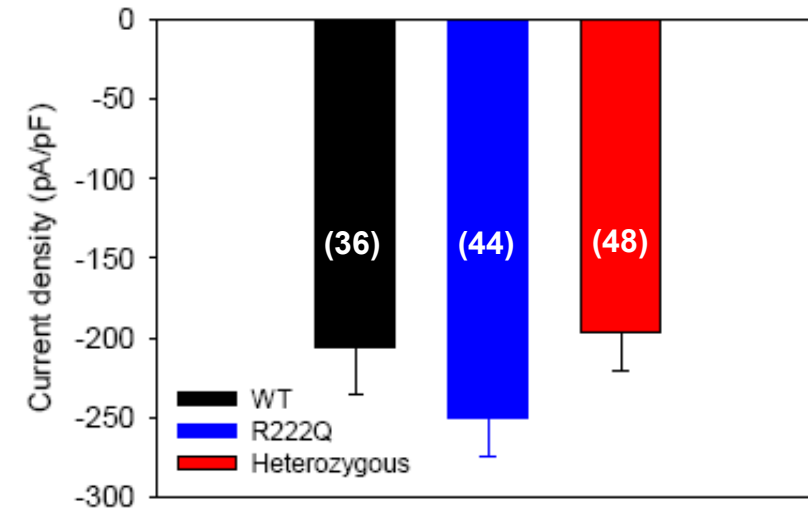
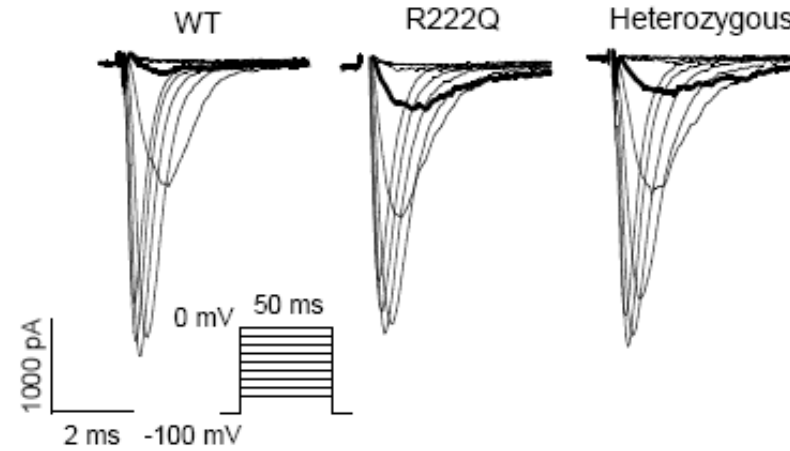
patch-clamp



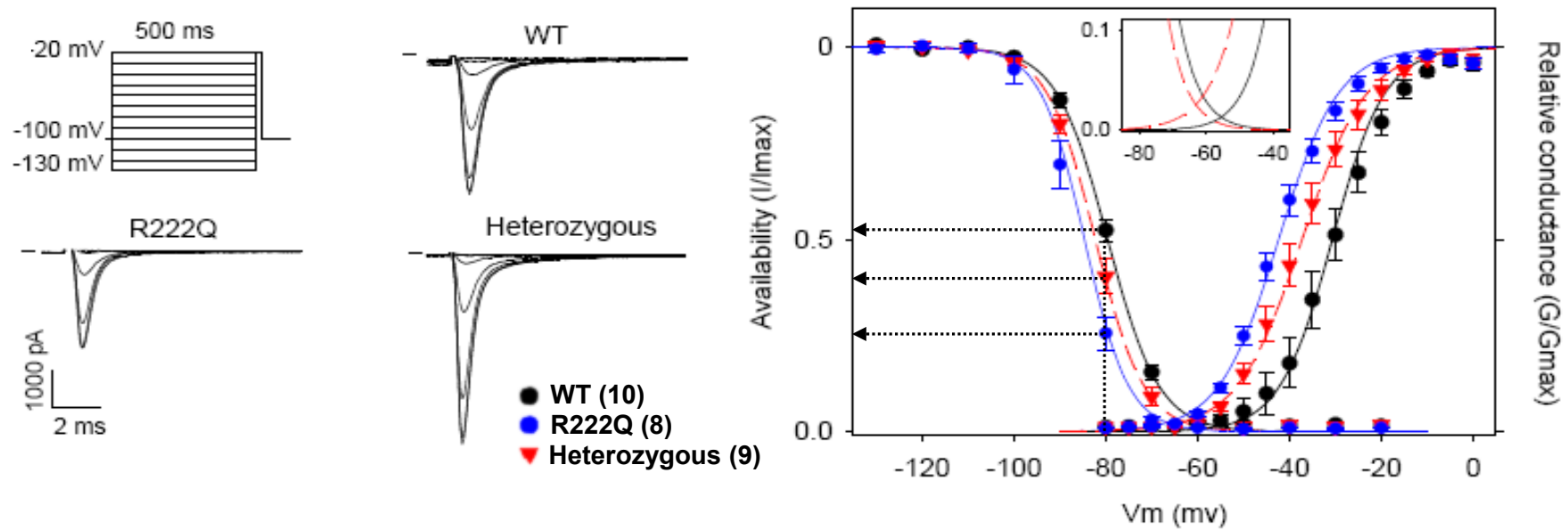
Conséquences biophysiques de la mutation

$\text{Na}_v1.5 + \text{Na}_v\beta1$

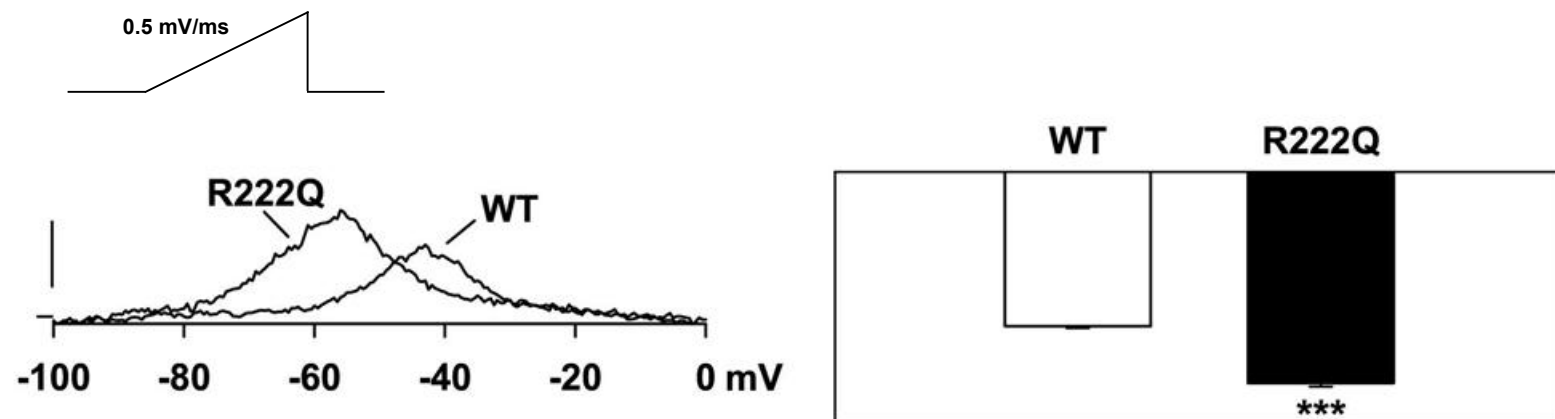
- Cellules Cos 7
- Patch-clamp (configuration 'cellule attachée')



Conséquences biophysiques de la mutation



Courant de fenêtrage Na^+ sensible à la tétrodotoxine ($30 \mu M$)



Conséquences biophysiques de la mutation

- Déplacement vers des potentiels plus négatifs de la courbe d'activation
→ **plus de courant (gain de fonction)**
- Déplacement (plus faible) vers des potentiels plus négatifs de la courbe d'inactivation → **moins de courant (perte de fonction)**
- Augmentation du courant de fenêtre Na^+ , déplacé vers des potentiels plus négatifs
→ **courant persistant (gain de fonction)**
→ effets sur la repolarisation ?
- Accélération des cinétiques d'inactivation → **moins de courant (perte de fonction)**

**Quelles sont les conséquences physiologiques
de ces différentes anomalies ?**

Modélisation mathématique

IKs current

$$IK_S = G_{KS} \cdot x_f \cdot x_s \cdot (V - E_K)$$

$$E_K = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K]_o}{[K]_i}$$

$$G_{KS} = 0.0281$$

$$\alpha_s = k_{as} \cdot \frac{(V - V_{is})}{1 - \exp(-\lambda_{as} \cdot (V - V_{is}))}$$

$$\beta_s = k_{\beta s} \cdot \exp(\lambda_{bs} \cdot V)$$

$$\alpha_f = k_{af} \cdot \frac{(V - V_{if})}{1 - \exp(-\lambda_{af} \cdot (V - V_{if}))}$$

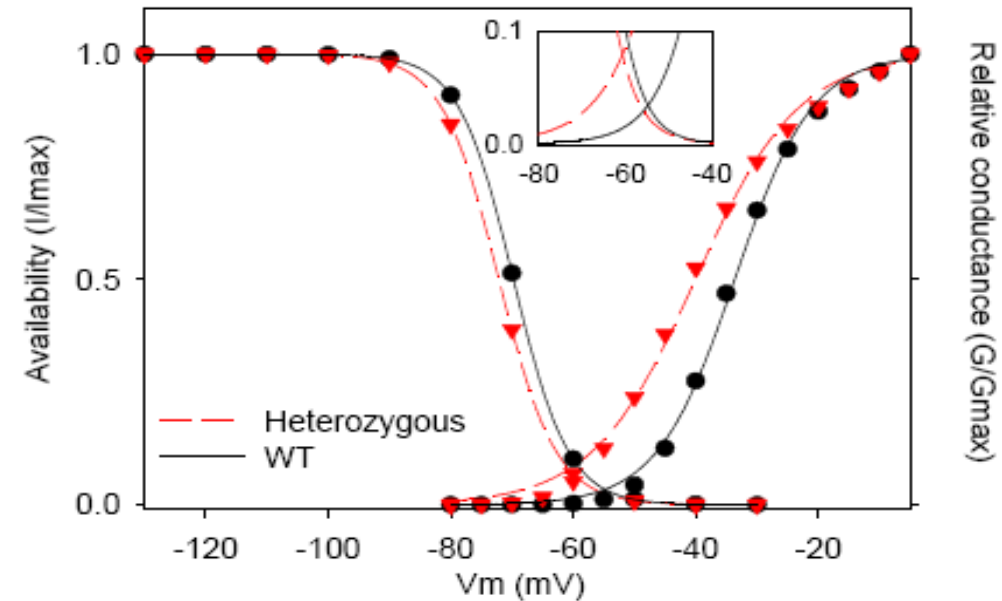
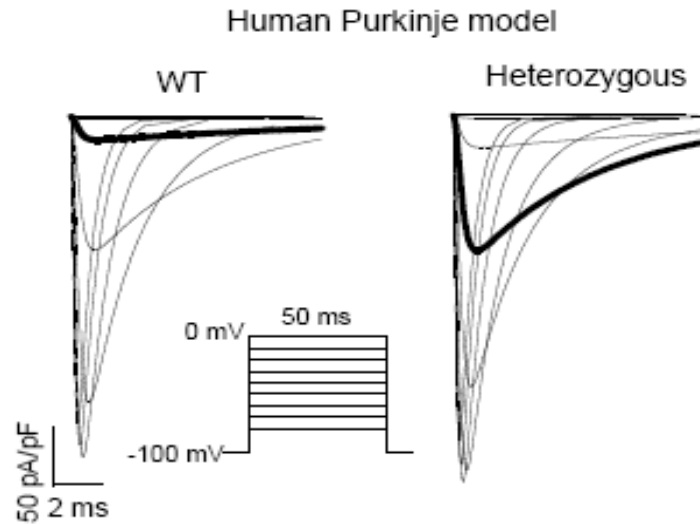
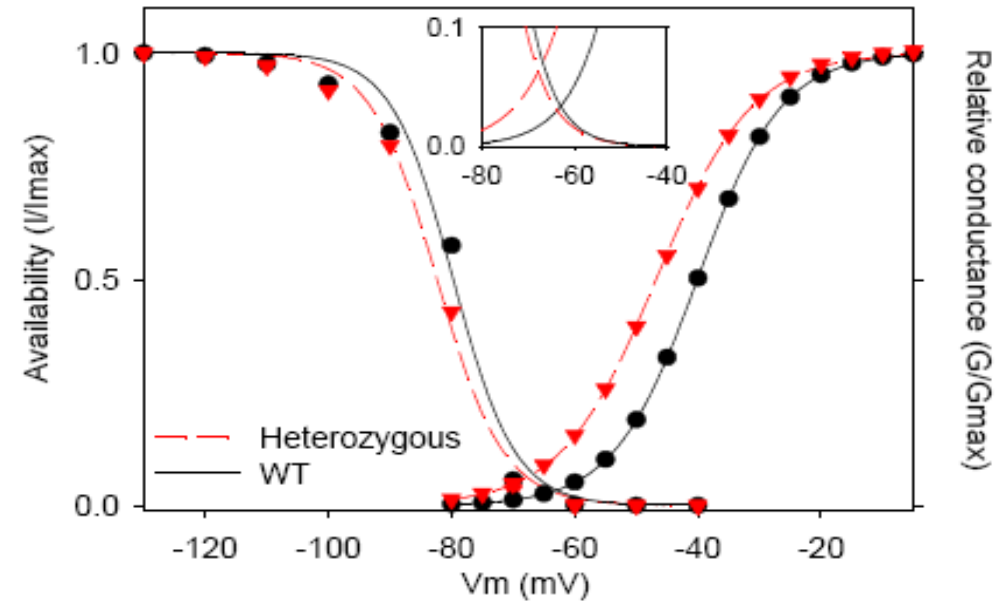
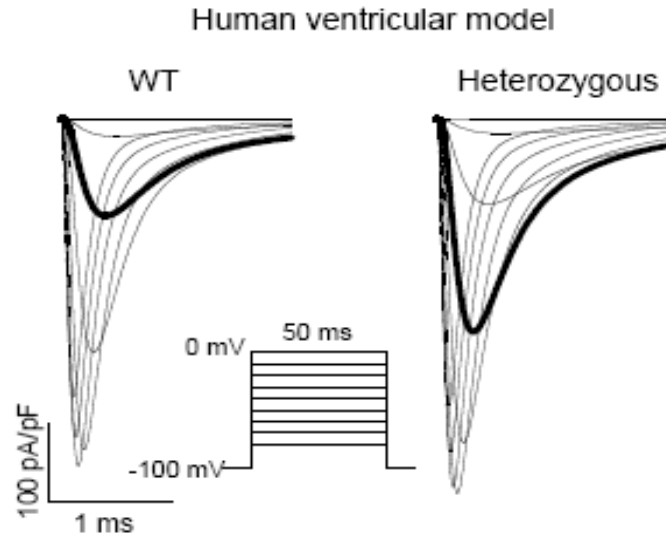
$$\beta_f = k_{\beta f} \cdot \exp(\lambda_{bf} \cdot V)$$

$$dx_s/dt = \alpha_s \cdot (1 - x_s) - \beta_s \cdot x_s$$

$$dx_f/dt = \alpha_f \cdot (1 - x_f) - \beta_f \cdot x_f$$

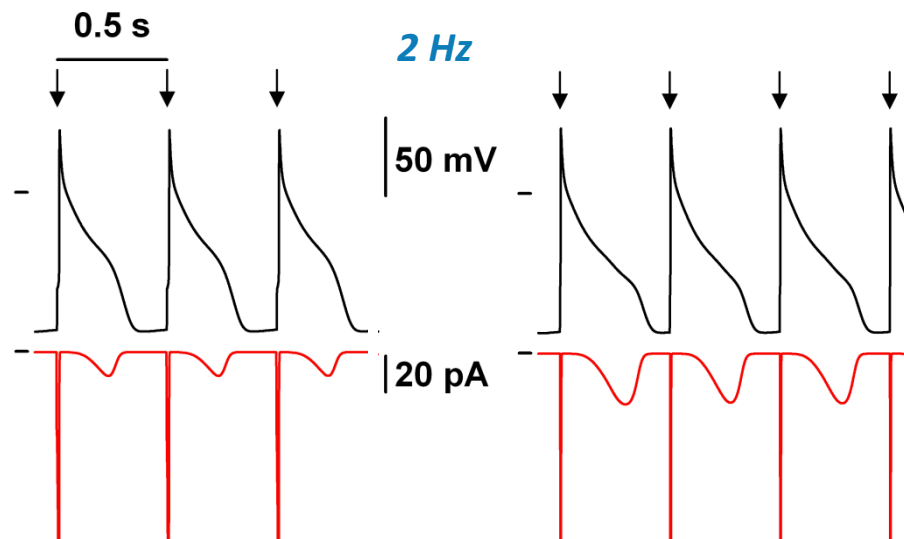
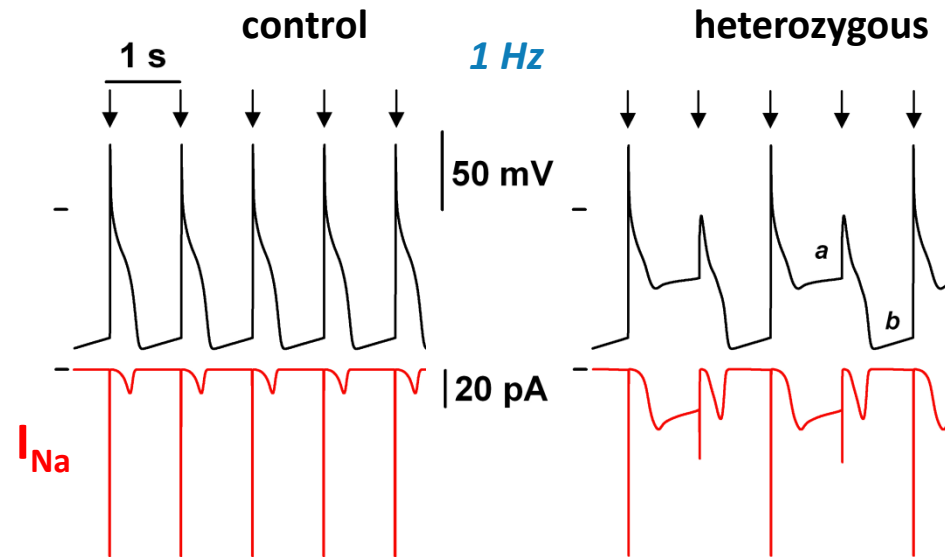
Rate constant	Value
k_{as}	0.033 msec ⁻¹
$k_{\beta s}$	0.0001 msec ⁻¹
λ_{as}	0.130 mV ⁻¹
λ_{bs}	-0.015 mV ⁻¹
V_{is}	-11 mV
k_{af}	0.146 msec ⁻¹
$k_{\beta f}$	0.00091 msec ⁻¹
λ_{af}	0.078 mV ⁻¹
λ_{bf}	-0.028 mV ⁻¹

Modélisation mathématique

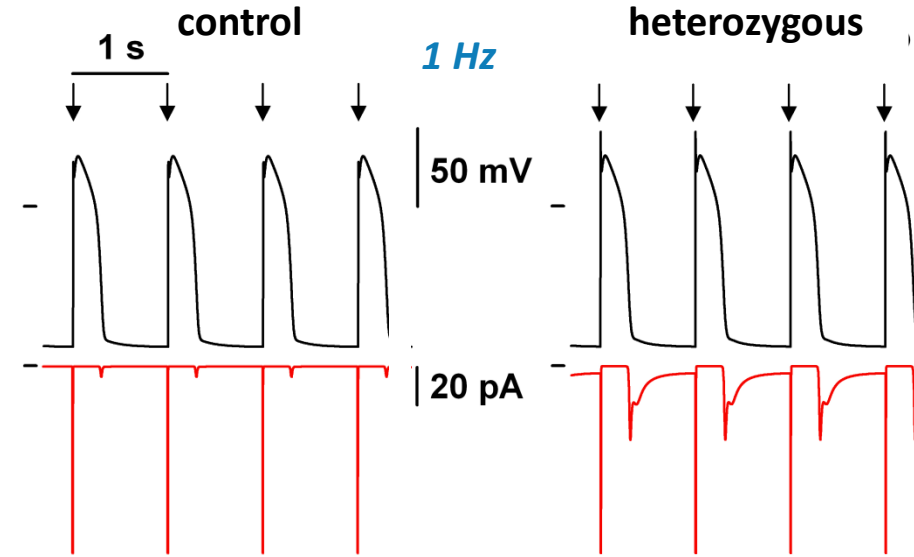


Potentiels d'action des modèles unicellulaires

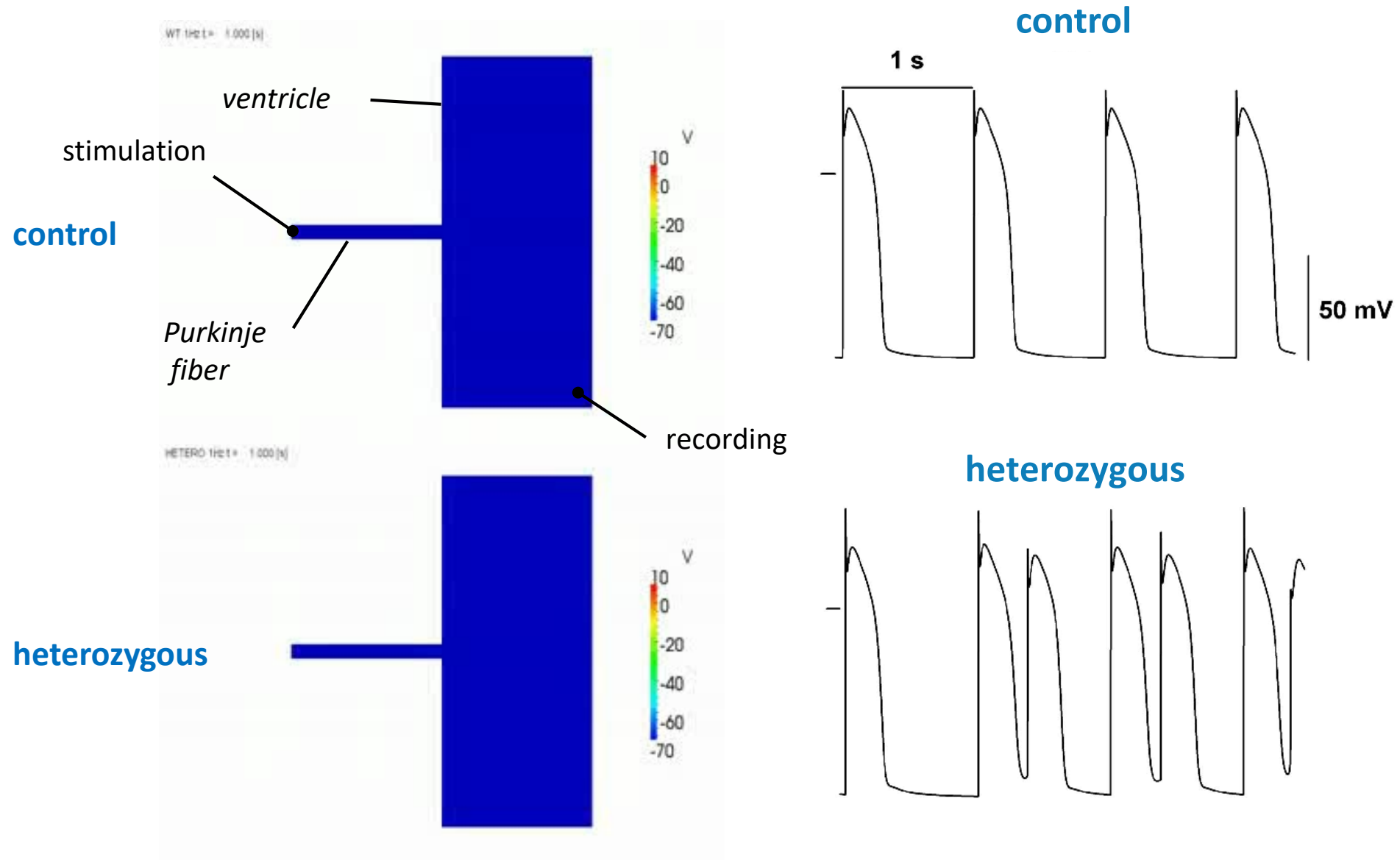
Purkinje cell



Left ventricular cell



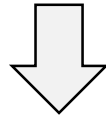
Modèle multicellulaire



Conclusion


La mutation p.R222Q de *SCN5A* :

- a de nombreux effets sur les propriétés biophysiques du canal $\text{Na}_v1.5$
- affecte peu l'activité électrique du myocarde ventriculaire (légère augmentation de l'excitabilité)
- prolonge la repolarisation dans les fibres de Purkinje



la repolarisation anormale des fibres de Purkinje déclenche des potentiels d'action prématurés dans le myocarde ventriculaire

RRAD mutation causes electrical and cytoskeletal defects in cardiomyocytes derived from a familial case of Brugada syndrome

Nadjet Belbachir^{1,2†}, Vincent Portero^{1†}, Zeina R Al Sayed¹, Jean-Baptiste Gourraud^{1,3}, Florian Dilasser¹, Laurence Jesel⁴, Hongchao Guo², Haodi Wu², Nathalie Gaborit¹, Christophe Guilluy⁵, Aurore Girardeau¹, Stephanie Bonnaud^{1,3}, Floriane Simonet^{1,3}, Matilde Karakachoff^{1,3}, Sabine Pattier³, Carol Scott⁶, Sophie Burel¹, Céline Marionneau¹, Caroline Chariou⁷, Anne Gaignerie⁷, Laurent David^{7,8}, Emmanuelle Genin⁹, Jean-François Deleuze¹⁰, Christian Dina^{1,3}, Vincent Sauzeau¹, Gervaise Loirand¹, Isabelle Baró¹, Jean-Jacques Schott^{1,3}, Vincent Probst^{1,3}, Joseph C. Wu ², Richard Redon^{1,3‡}, Flavien Charpentier^{1,3*‡}, and Solena Le Scouarnec^{1*‡}

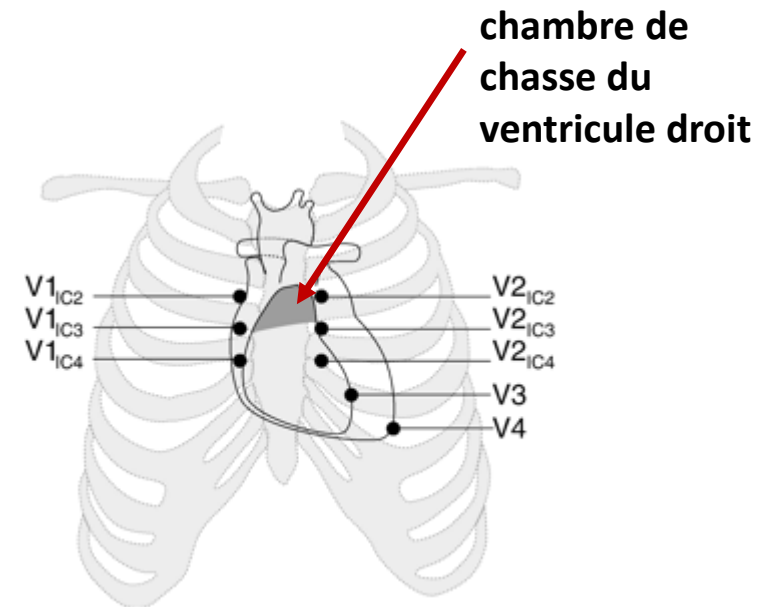
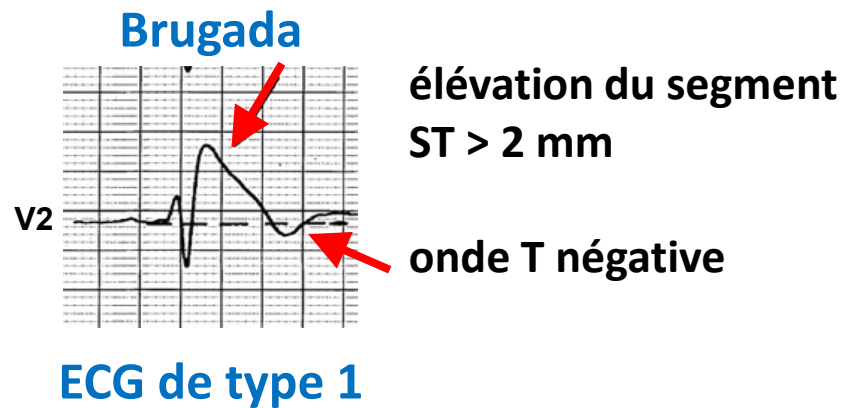
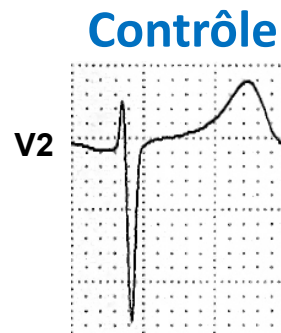
¹l'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes cedex 1, France; ²Division of Cardiovascular Medicine, Department of Medicine, Stanford Cardiovascular Institute, Institute for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA; ³l'institut du thorax, CHU Nantes, Nantes, France; ⁴CHU Strasbourg, Service de Cardiologie, Strasbourg, France; ⁵Institute for Advanced Biosciences, INSERM, CNRS, Grenoble, France; ⁶The Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, UK; ⁷INSERM, CNRS, UNIV Nantes, CHU Nantes, SFR François Bonamy, iPSC core facility, Nantes, France; ⁸Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR 1064, INSERM, UNIV Nantes, Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), CHU Nantes, Nantes, France; ⁹Inserm UMR-1078, CHRU Brest, University Brest, Brest, France; and ¹⁰Centre National de Recherche en Génomique Humaine, Institut de Génomique, CEA, Evry, France

Received 8 November 2017; revised 13 April 2018; editorial decision 26 April 2019; accepted 2 May 2019; online publish-ahead-of-print 21 May 2019

See page 3094 for the editorial comment on this article (doi: 10.1093/eurheartj/ehz448)

Le syndrome de Brugada

- maladie rare (1-5/10 000), affectant principalement les hommes ($\approx 80\%$)
- pas de signes cliniques d'anomalies structurales cardiaques
- complications : tachycardie et/ou fibrillation ventriculaire ➔ **syncope et mort subite**
- à l'origine de près de 20% des morts subites des patients avec un cœur structurellement normal
- diagnostic : signe typique mais labile sur les dérivations précordiales droites (V1-V3) de l'ECG
 - ➔ condition basale
 - ➔ après test pharmacologique (ajmaline, flecainide...)



- traitement : implantation d'un défibrillateur chez les patients symptomatiques

Le syndrome de Brugada : une canalopathie complexe

- > 25 gènes associés au SBr (approches gènes candidats)
- *SCN5A* : 20-25% de tous les cas identifiés
➔ perte de fonction du canal Nav1.5
- autres gènes : <1%
- 70-75% des patients sans gène identifié
- > 60% des cas sont sporadiques
- pénétrance faible
- phénocopies fréquentes

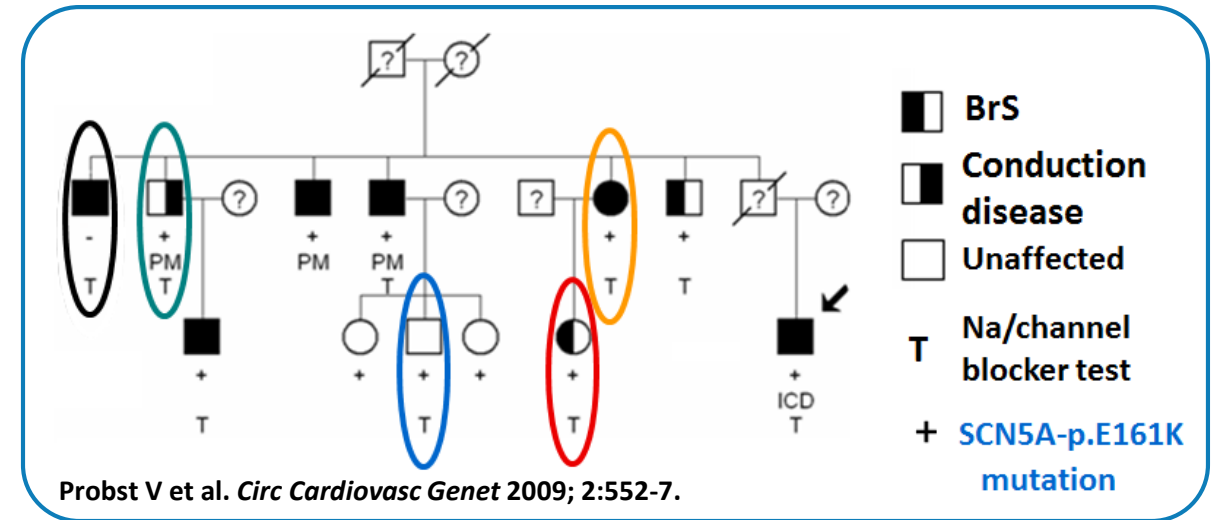
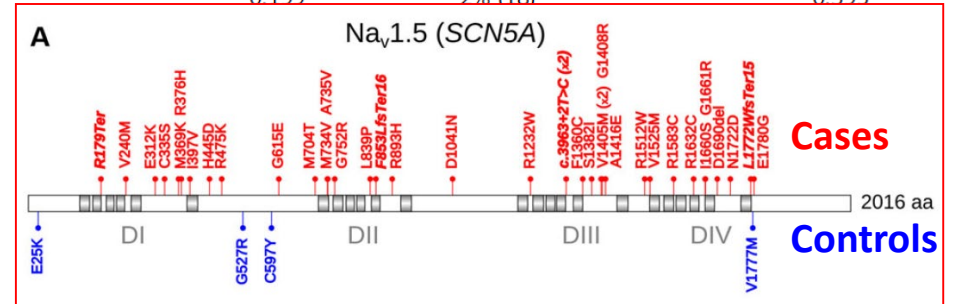


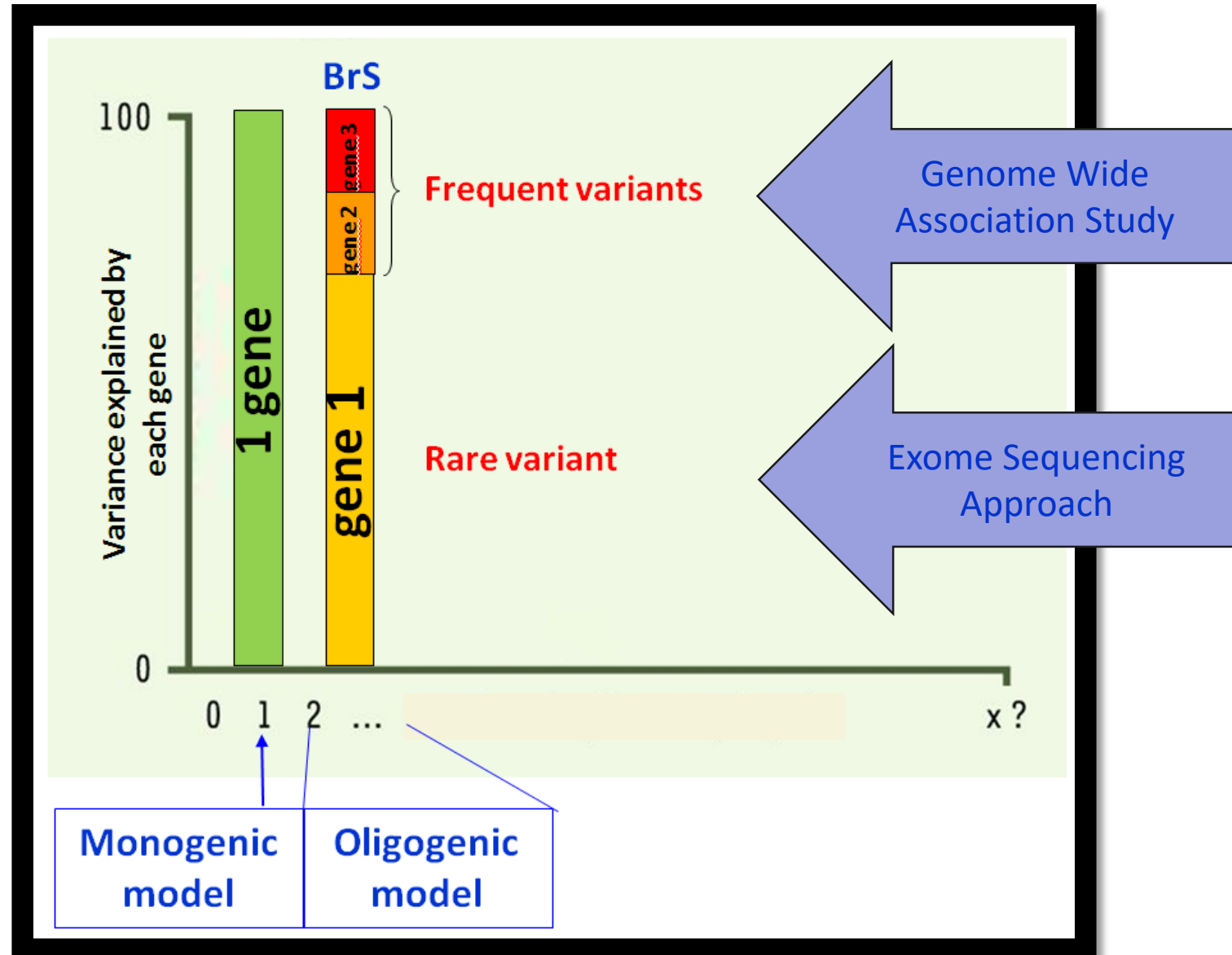
Table 1 Burden tests results for 45 genes linked to cardiac arrhythmias

Gene	BrS cases (n = 167)	Internal controls (n = 167)	P-value 1	UK10K controls (n = 881)	P-value 2
BrS-susceptibility genes					
SCN5A	20.4% (34)	2.4% (4)	1.4×10^{-7a}	2.4% (21)	1.7×10^{-15a}
SCN10A	6% (10)	2.4% (4)	0.170	3.5% (31)	0.131
CACNA1C	3% (5)	6.6% (11)	0.199	2% (18)	0.395
PKP2	3% (5)	2.4% (4)			
CACNB2	1.8% (3)	1.2% (2)			
KCNH2	1.2% (2)	3.6% (6)			
TRPM4	1.2% (2)	3% (5)			
KCND3	0.6% (1)	1.2% (2)			
CACNA2D1	0.6% (1)	0.6% (1)			
HEY2	0.6% (1)	0.6% (1)			
SCN2B	0.6% (1)	0.6% (1)			
SCN3B	0.6% (1)	0.6% (1)			



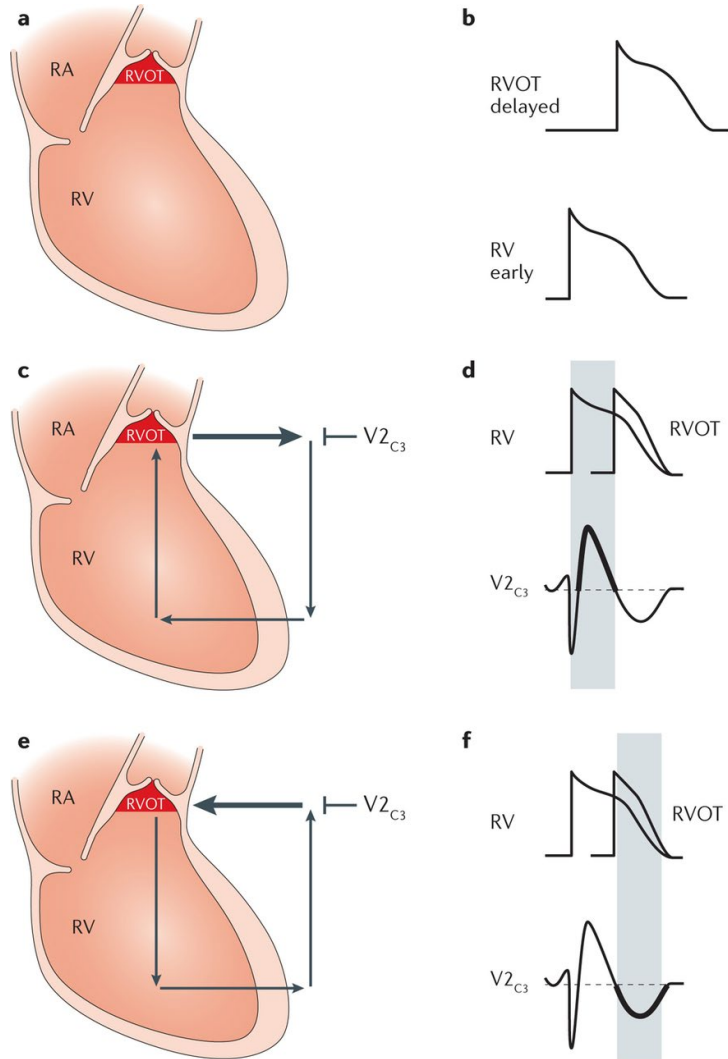
Le Scouarnec S et al. *Hum Molec Genet* 2015; 24: 2757-63.

Le syndrome de Brugada : une maladie oligogénique



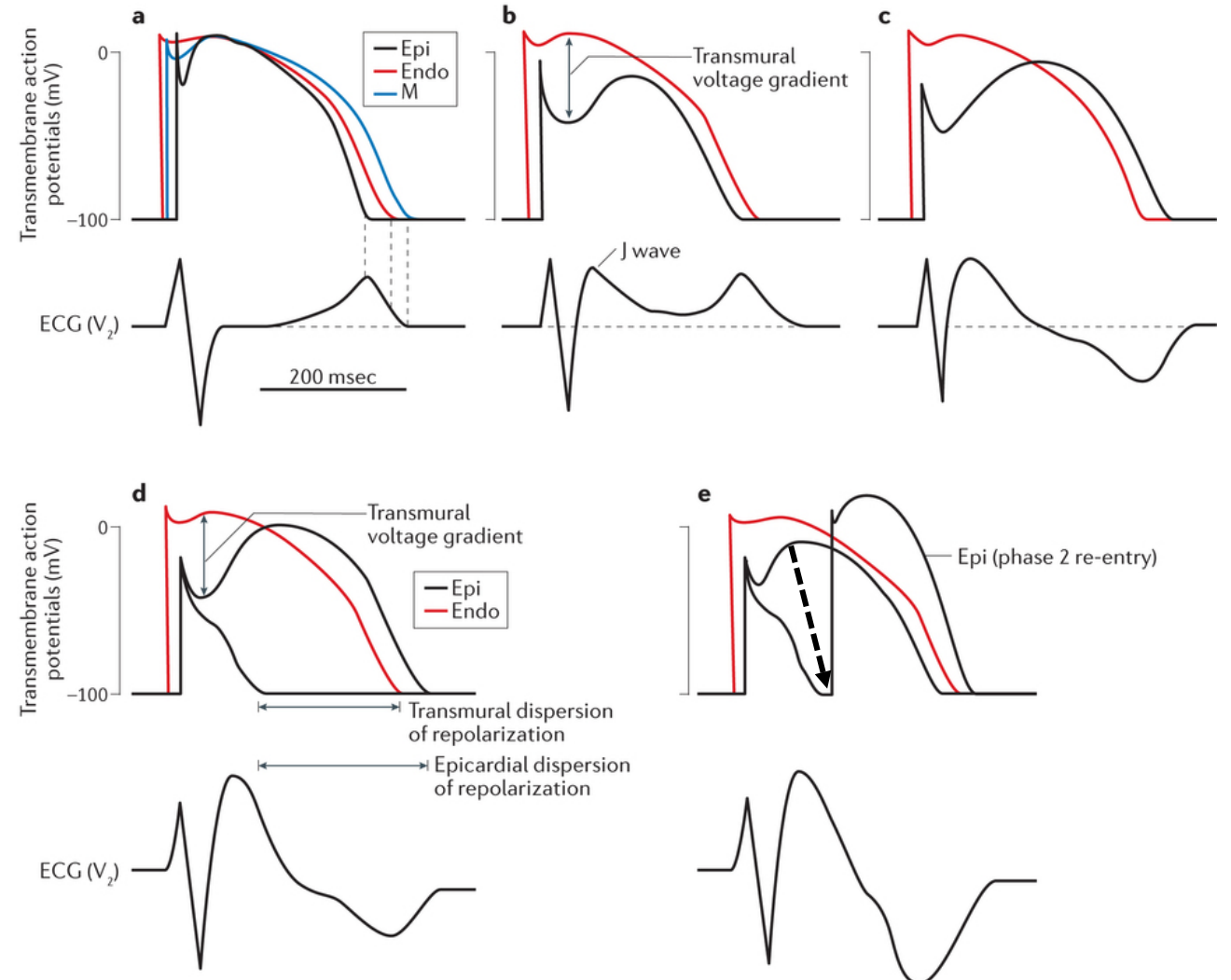
Hypothèses physiopathologiques

Conduction disorder




Meregalli et al, *Cardiovasc Res* 2005; 67: 367-78.

Repolarization disorder



Antzelevitch et al, *J Cardiovasc Electrophysiol* 2001; 12:268-72.

RRAD mutation causes electrical and cytoskeletal defects in cardiomyocytes derived from a familial case of Brugada syndrome

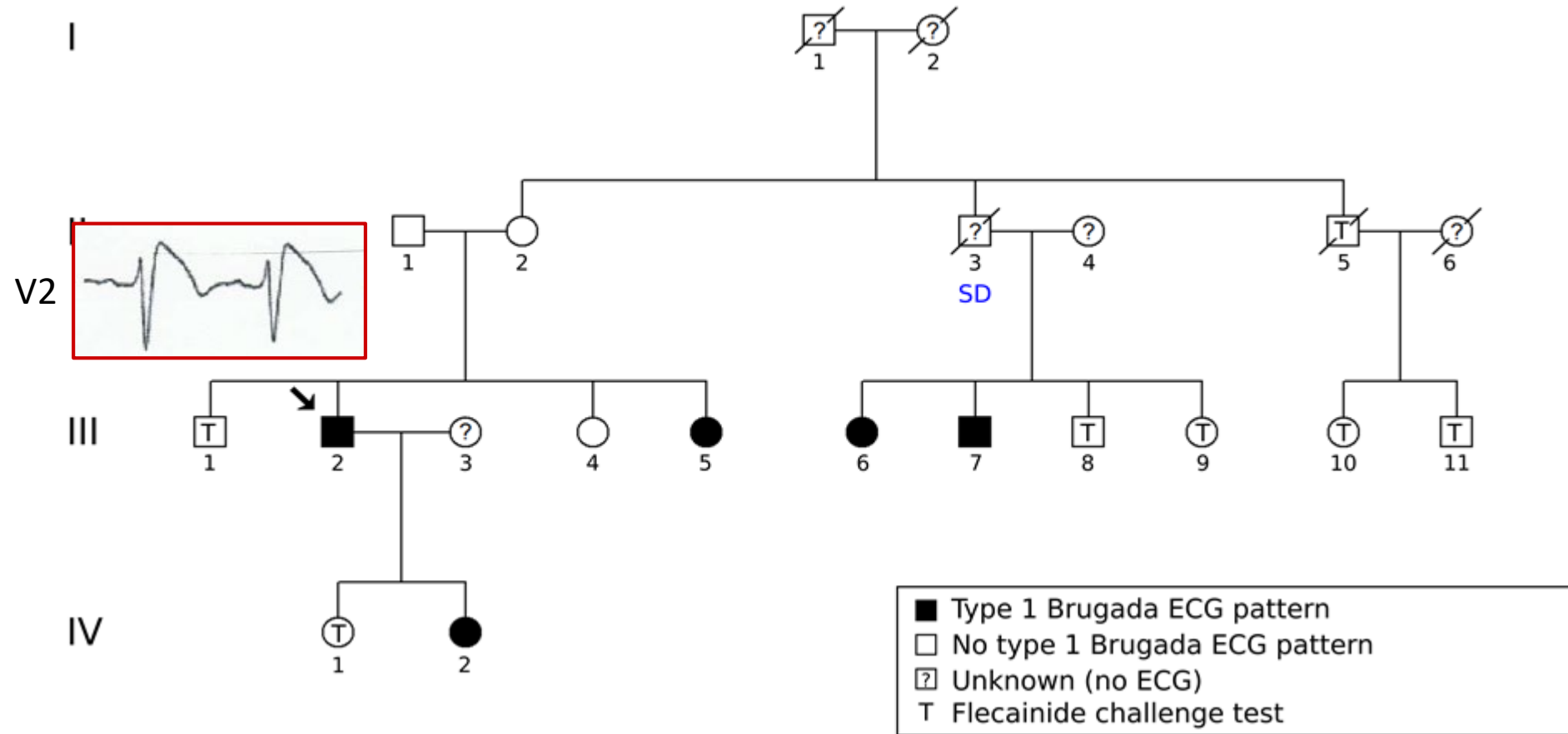
Nadjet Belbachir^{1,2†}, Vincent Portero^{1†}, Zeina R Al Sayed¹, Jean-Baptiste Gourraud^{1,3}, Florian Dilasser¹, Laurence Jesel⁴, Hongchao Guo², Haodi Wu², Nathalie Gaborit¹, Christophe Guilluy⁵, Aurore Girardeau¹, Stephanie Bonnaud^{1,3}, Floriane Simonet^{1,3}, Matilde Karakachoff^{1,3}, Sabine Pattier³, Carol Scott⁶, Sophie Burel¹, Céline Marionneau¹, Caroline Chariou⁷, Anne Gaignerie⁷, Laurent David^{7,8}, Emmanuelle Genin⁹, Jean-François Deleuze¹⁰, Christian Dina^{1,3}, Vincent Sauzeau¹, Gervaise Loirand¹, Isabelle Baró¹, Jean-Jacques Schott^{1,3}, Vincent Probst^{1,3}, Joseph C. Wu ², Richard Redon^{1,3‡}, Flavien Charpentier^{1,3*‡}, and Solena Le Scouarnec^{1*‡}

¹l'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes cedex 1, France; ²Division of Cardiovascular Medicine, Department of Medicine, Stanford Cardiovascular Institute, Institute for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA; ³l'institut du thorax, CHU Nantes, Nantes, France; ⁴CHU Strasbourg, Service de Cardiologie, Strasbourg, France; ⁵Institute for Advanced Biosciences, INSERM, CNRS, Grenoble, France; ⁶The Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, UK; ⁷INSERM, CNRS, UNIV Nantes, CHU Nantes, SFR François Bonamy, iPSC core facility, Nantes, France; ⁸Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR 1064, INSERM, UNIV Nantes, Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), CHU Nantes, Nantes, France; ⁹Inserm UMR-1078, CHRU Brest, University Brest, Brest, France; and ¹⁰Centre National de Recherche en Génomique Humaine, Institut de Génomique, CEA, Evry, France

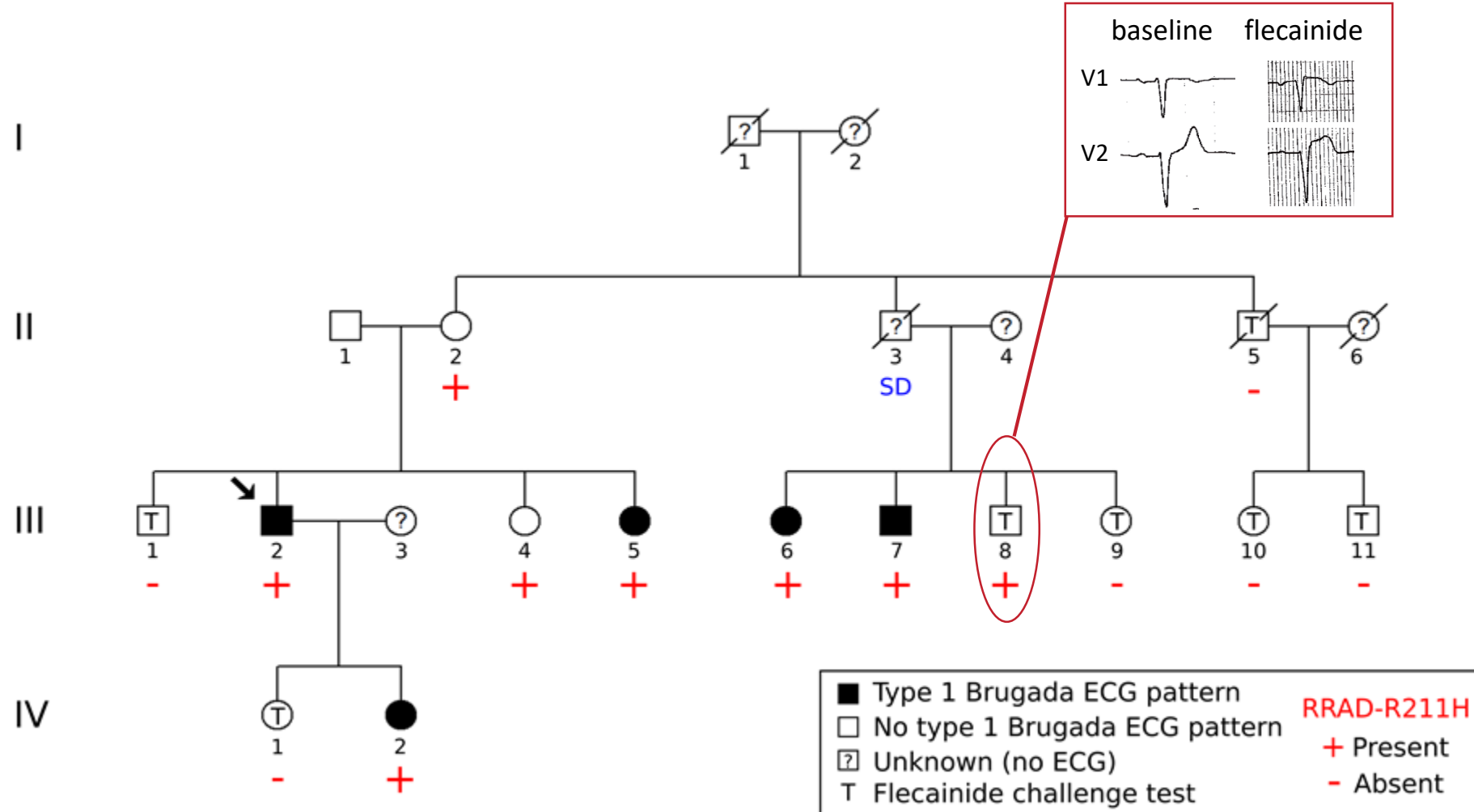
Received 8 November 2017; revised 13 April 2018; editorial decision 26 April 2019; accepted 2 May 2019; online publish-ahead-of-print 21 May 2019

See page 3094 for the editorial comment on this article (doi: 10.1093/eurheartj/ehz448)

Une forme familiale du syndrome de Brugada

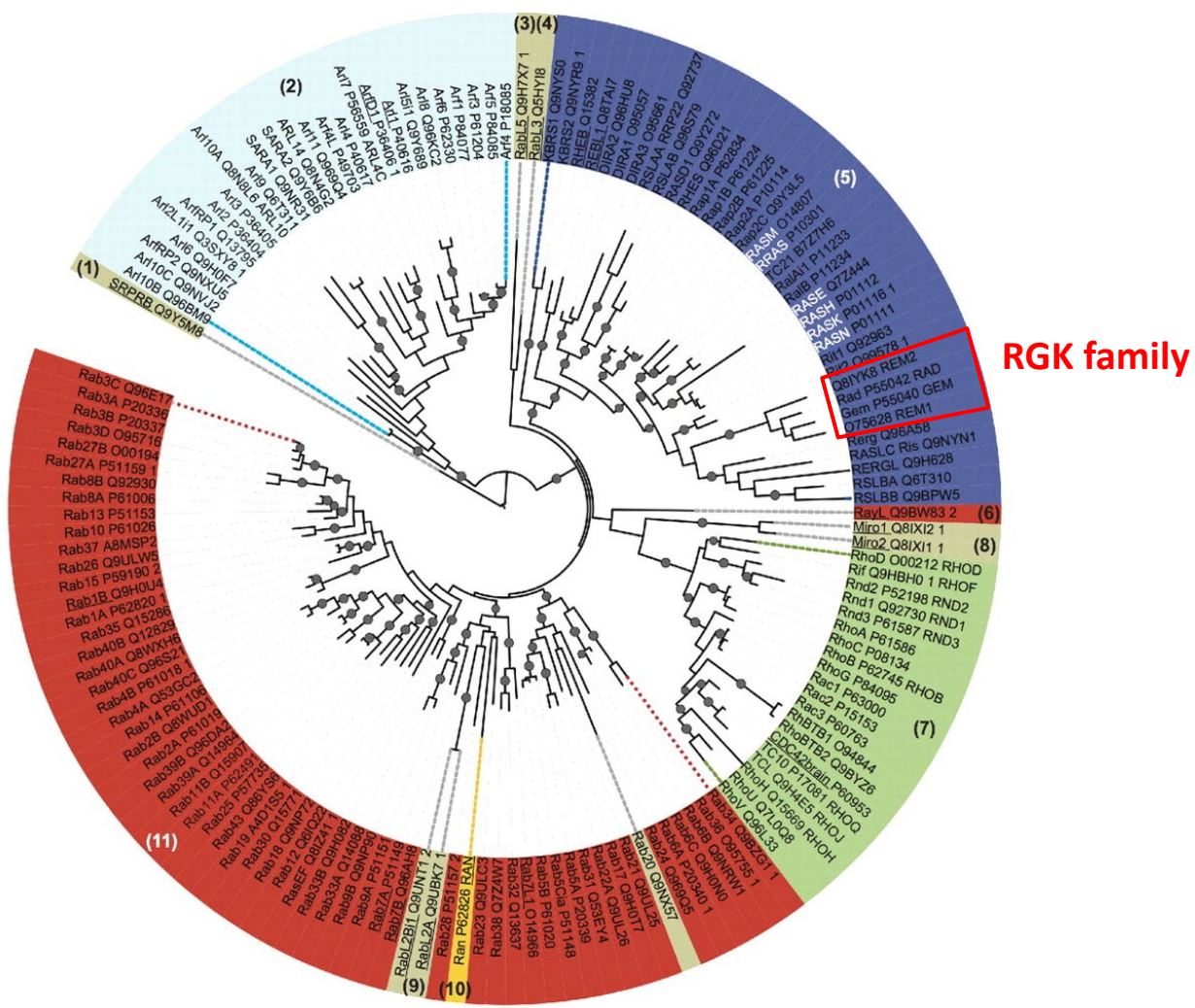


Un nouveau gène impliqué dans le syndrome de Brugada : *RRAD*



+ 3 mutations non-sens additionnelles chez 3/186 patients avec syndrome de Brugada non liés à la famille

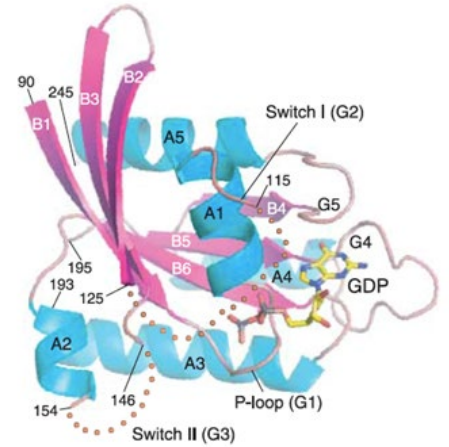
La GTPase Rad (Ras Associated with Diabetes)



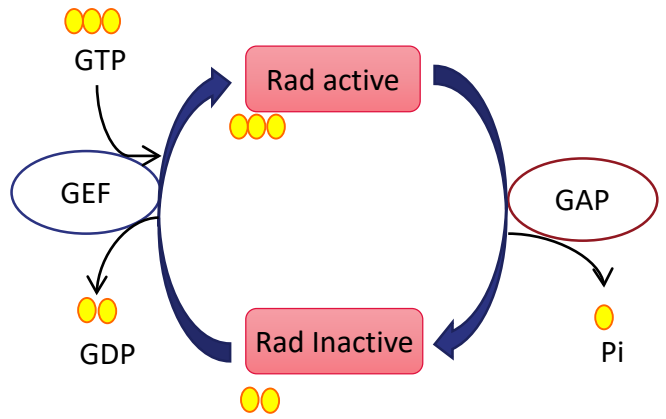
Famille RGK

Rad

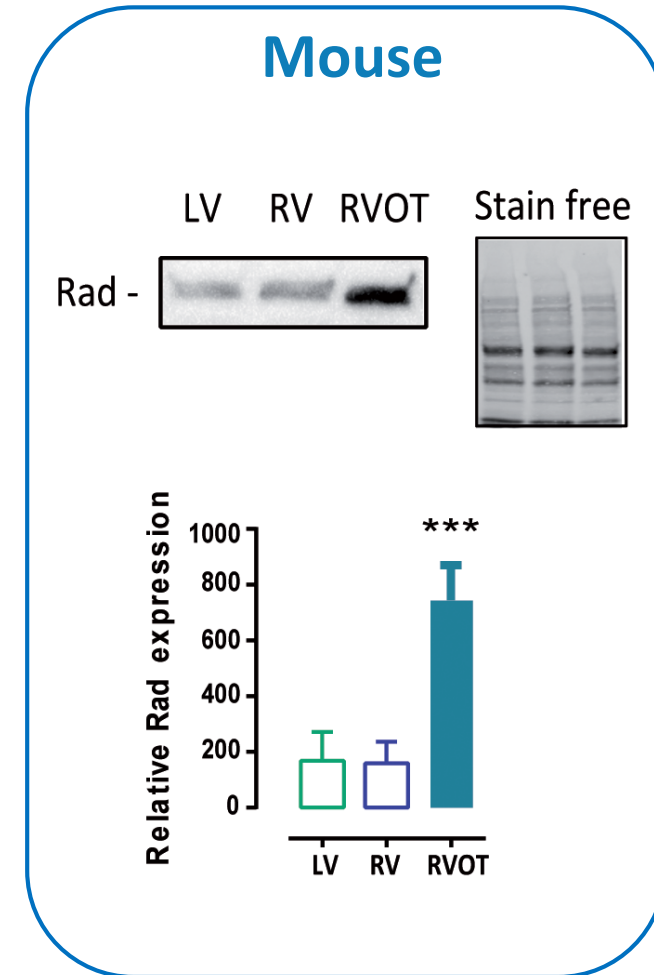
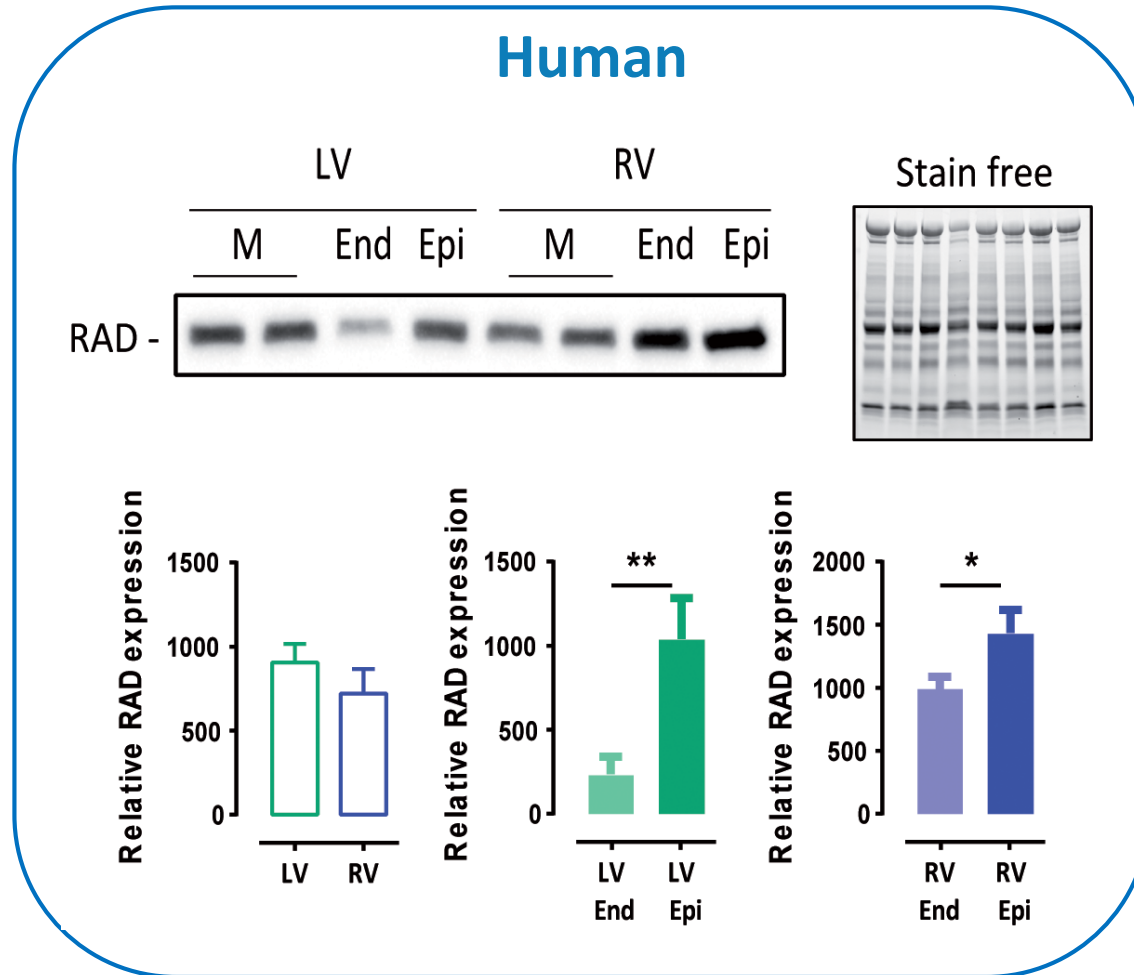
- Gem
- Rem
- Rem2



Activité GTPasique de Rad



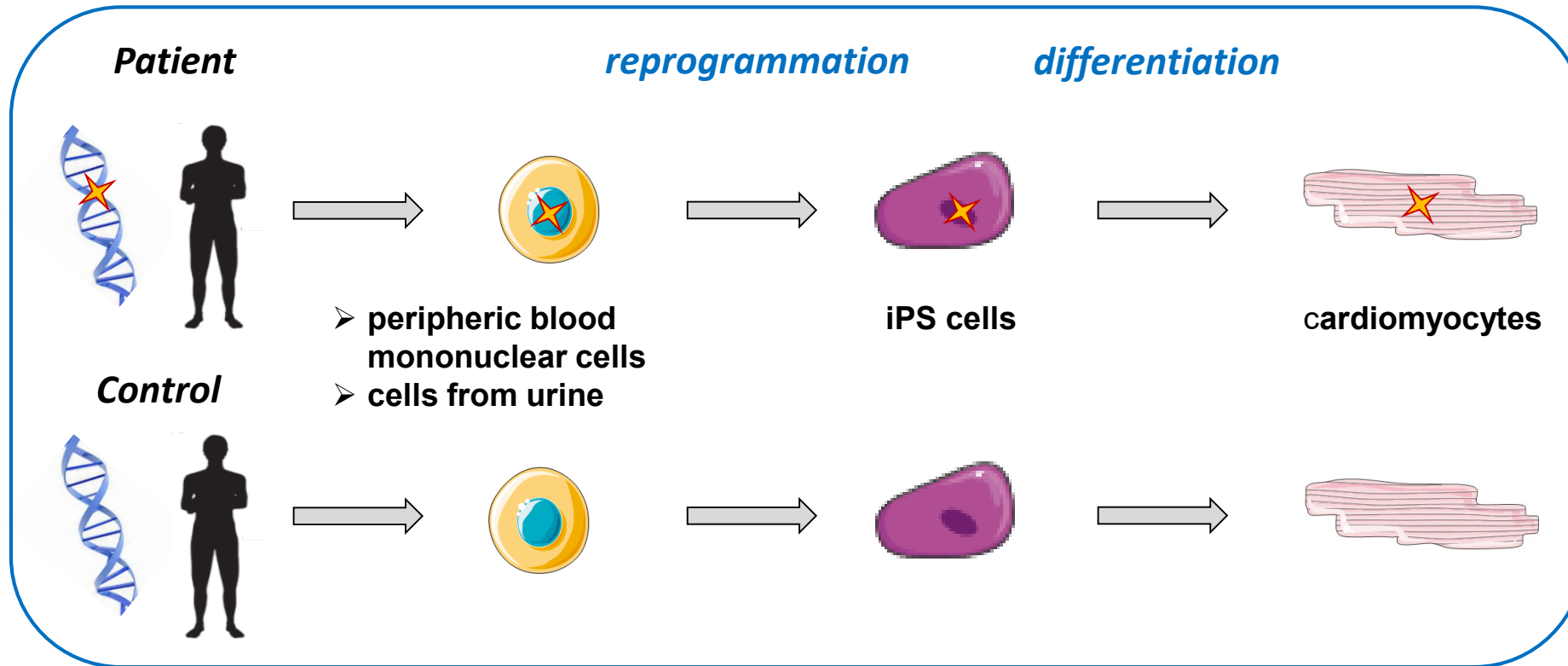
Expression cardiaque de la GTPase Rad



LV: left ventricle; RV: right ventricle
End: subendomyocardium; Epi: subepicardium;
M: midmyocardium

RVOT: right ventricular outflow tract

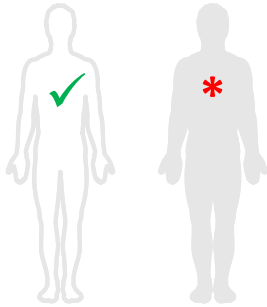
Les cellules souches pluripotentes induites (iPS) : des modèles personnalisés d'arythmies héréditaires



➔ cardiomyocytes avec : - la mutation du patient
- le profil génétique du patient

Sélection des individus pour la différenciation des cellules iPS

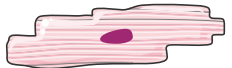
Ctl1 BrS1



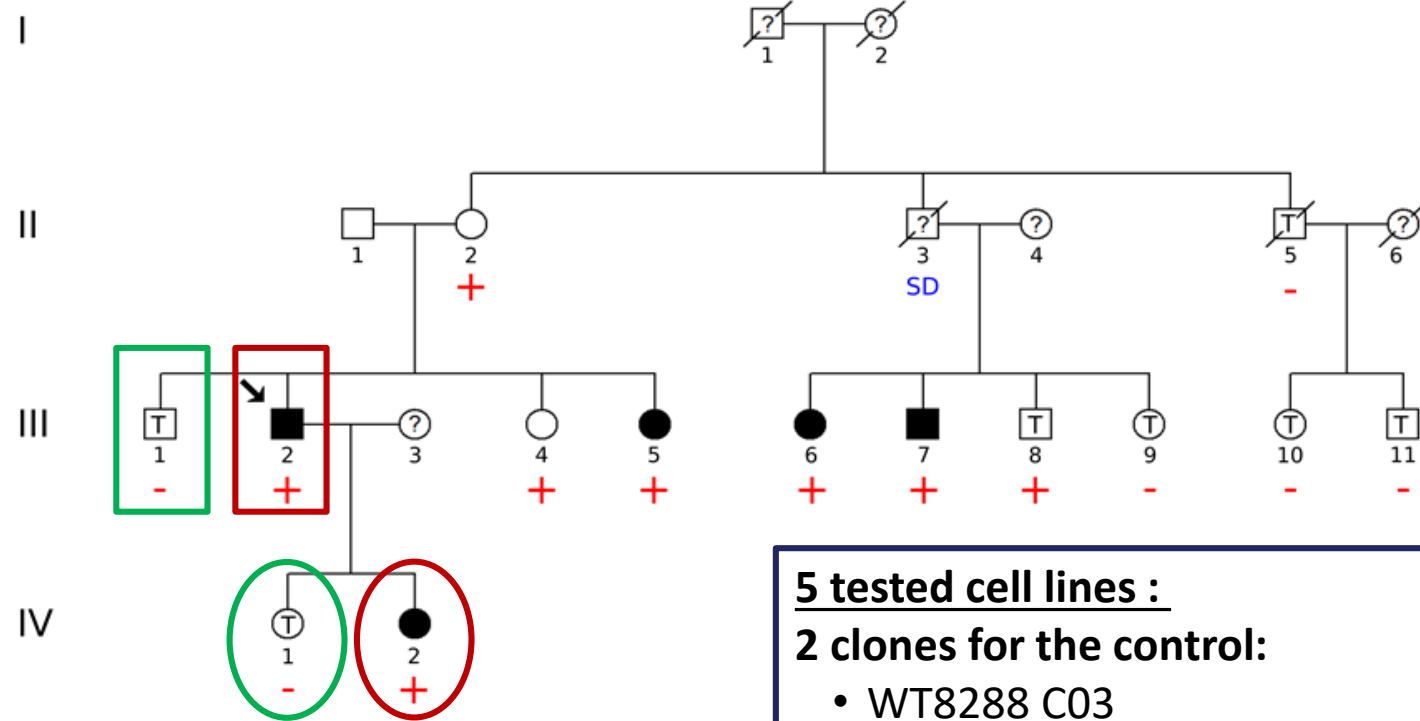
PBMCs



iPSCs



Cardiomyocytes (iPSC-CM)



5 tested cell lines :

2 clones for the control:

- WT8288 C03
- WT8288 C04

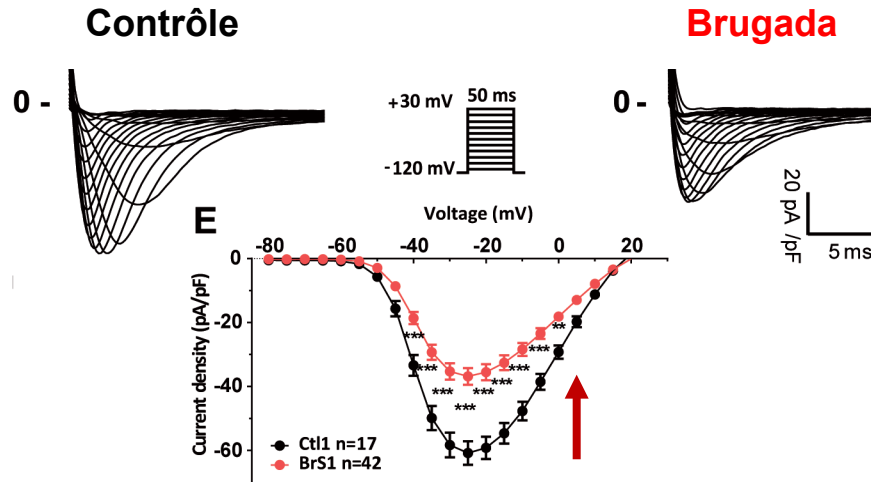
3 clones for the Brs patient:

- BR334 C01
- BR334 C02
- BR334 C03

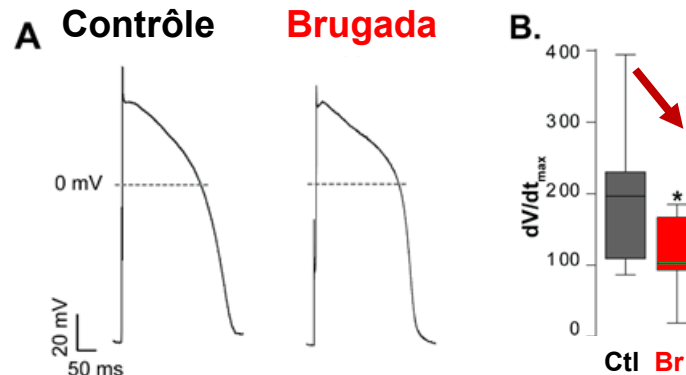
~ 3 differentiations/clone/exp^t

Les cellules du patient présentent une diminution d' I_{Na}

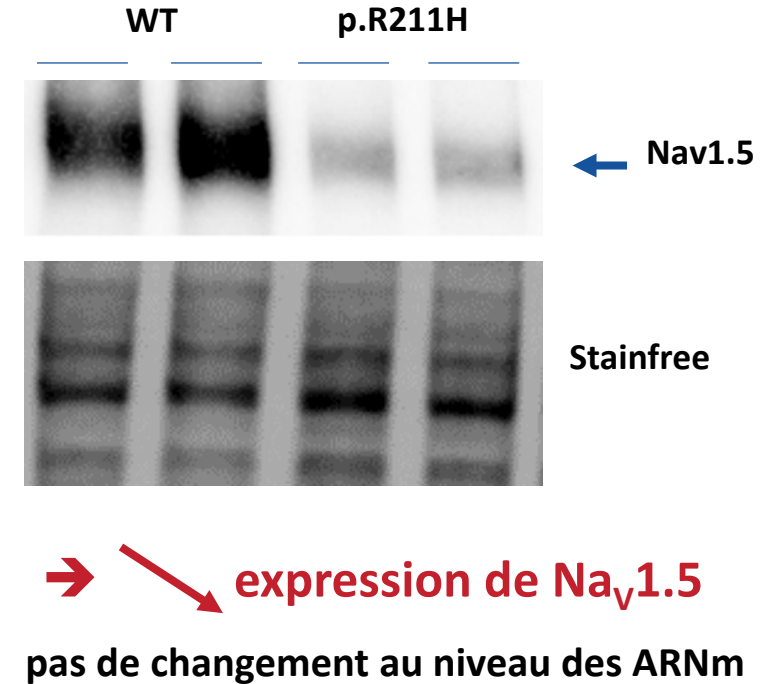
Diminution de I_{Na}



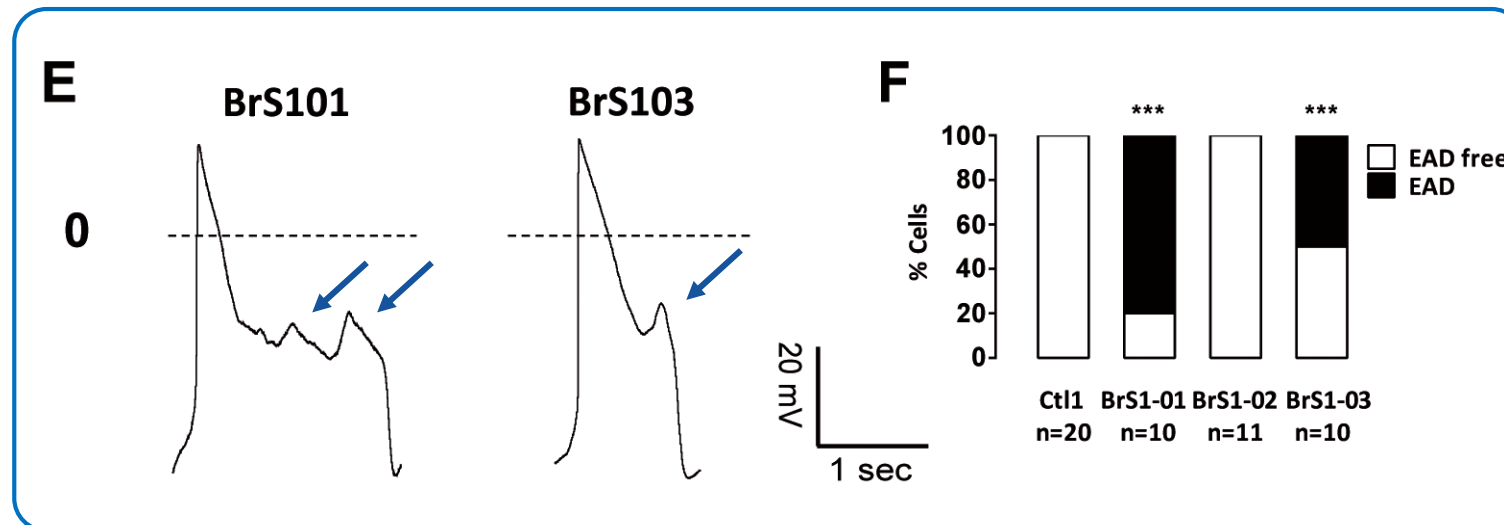
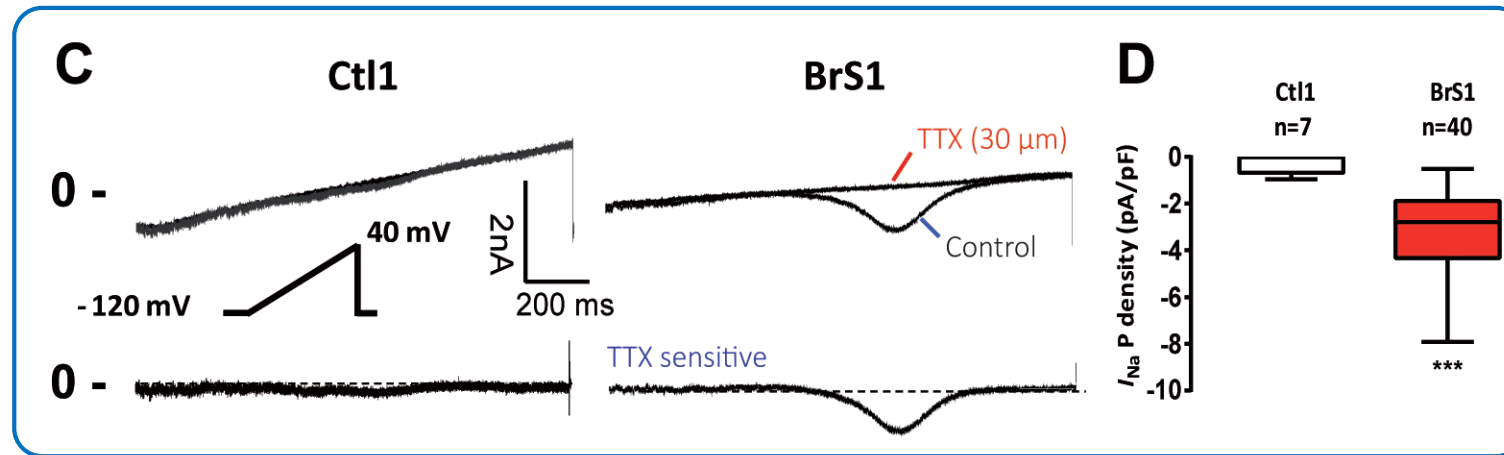
Ralentissement de la phase de dépolarisation du potentiel d'action



Western blot

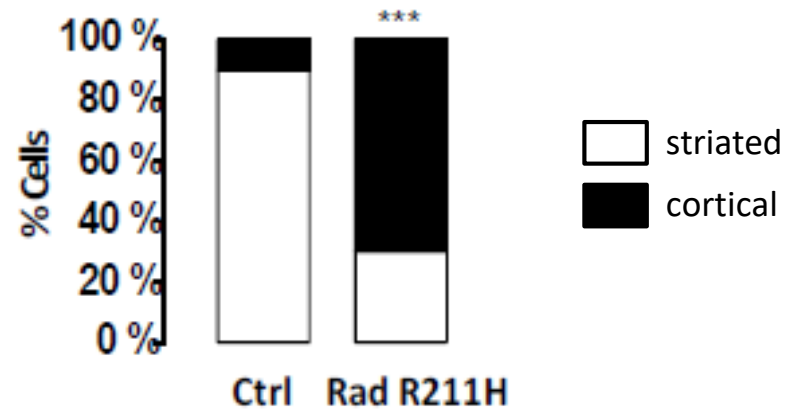
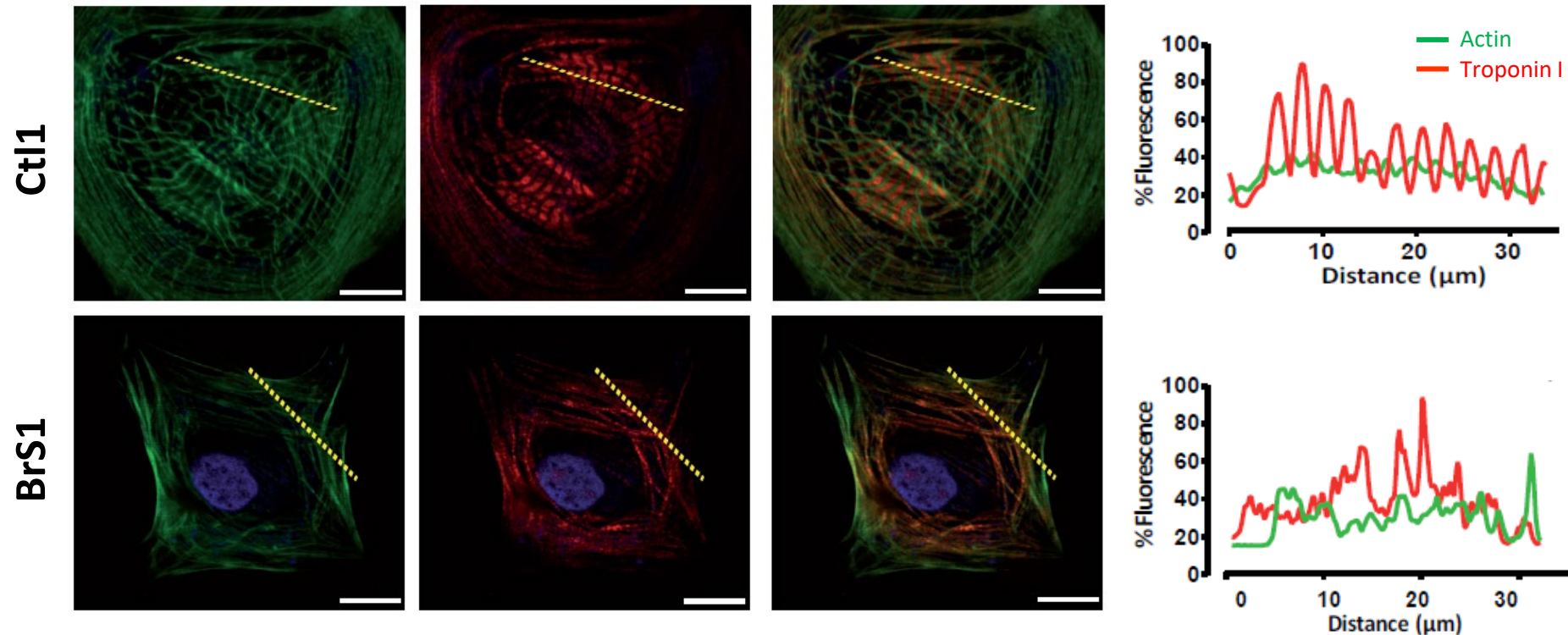


Les cellules du patient présentent un courant Na^+ persistant



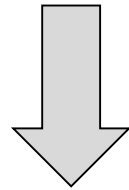
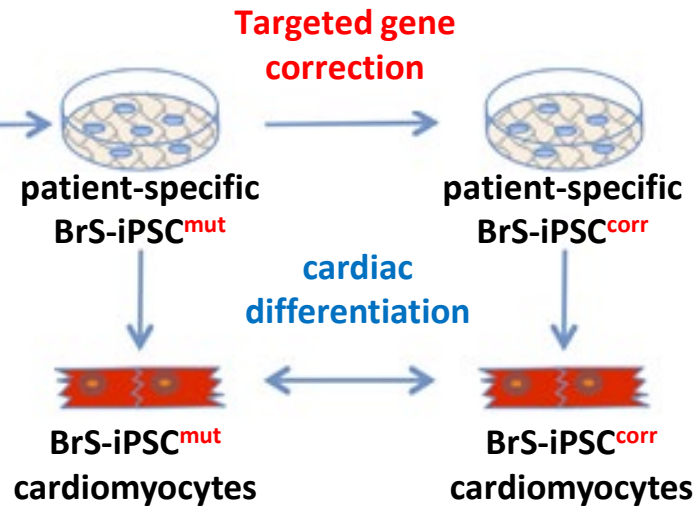
EAD = early afterdepolarization (post-dépolarisation précoce)

Les cellules des patients ont des anomalies du cytosquelette



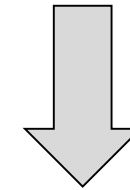
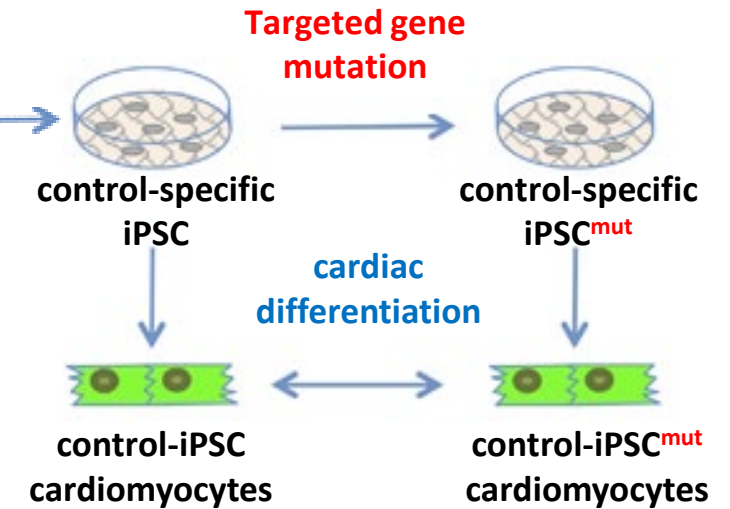
Contrôle isogénique

patient



La mutation est (n'est pas)
nécessaire à l'apparition du
phénotype

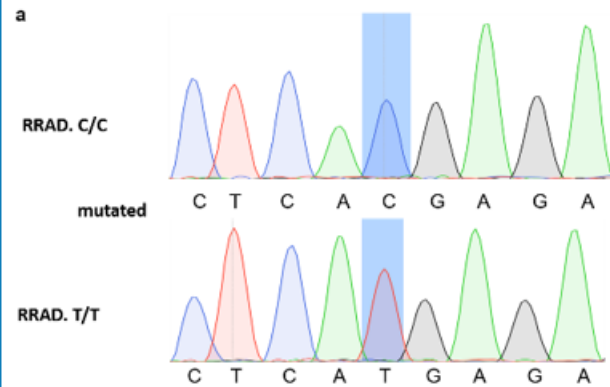
control



La mutation est (n'est pas)
responsable du
phénotype

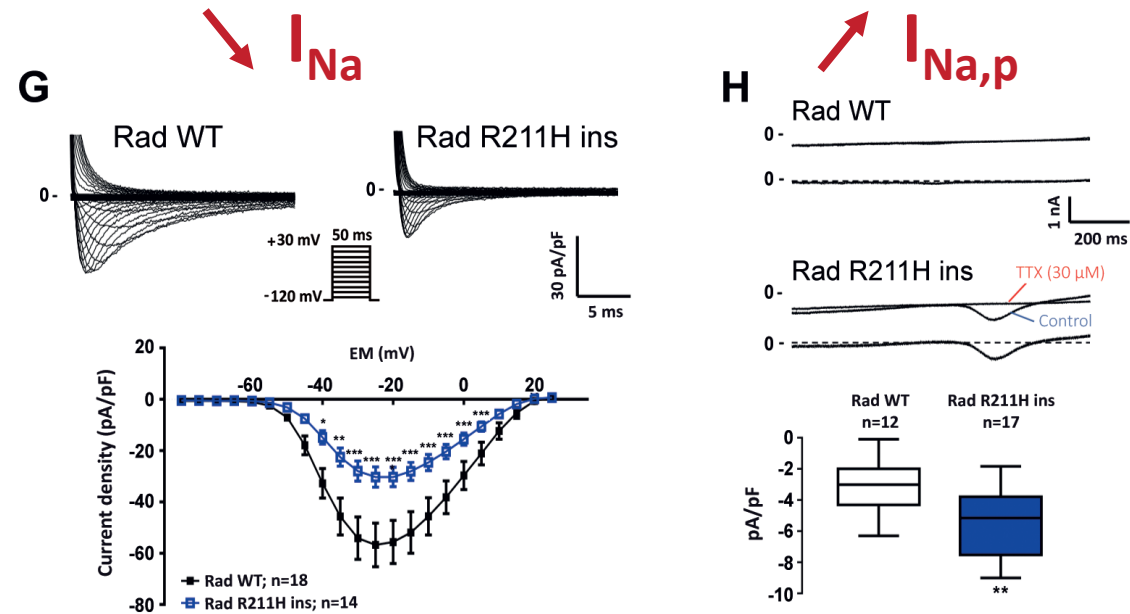
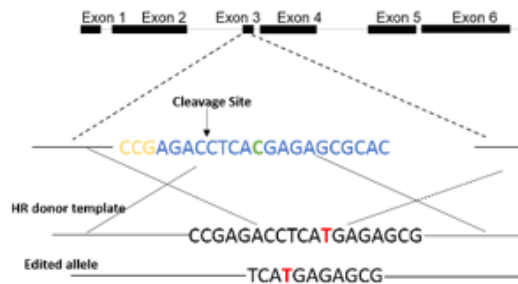
Effets de l'insertion du variant dans des cellules contrôles

Edition de génome (CRISPR/Cas9)

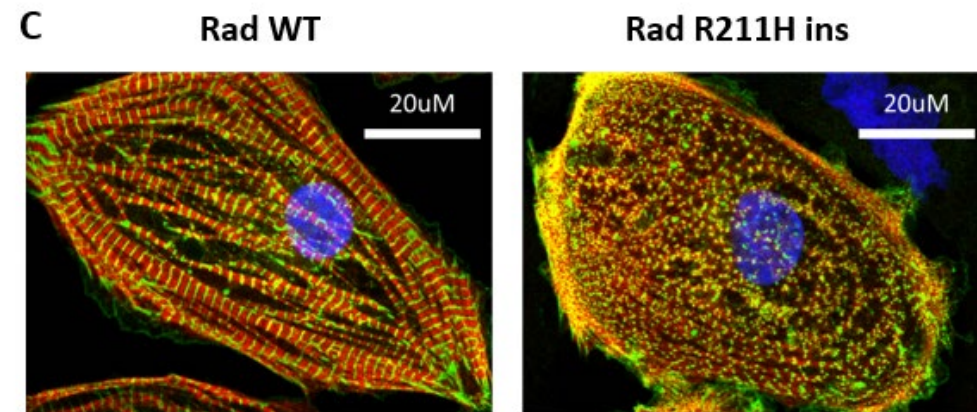


b


RRAD locus



Défauts structuraux



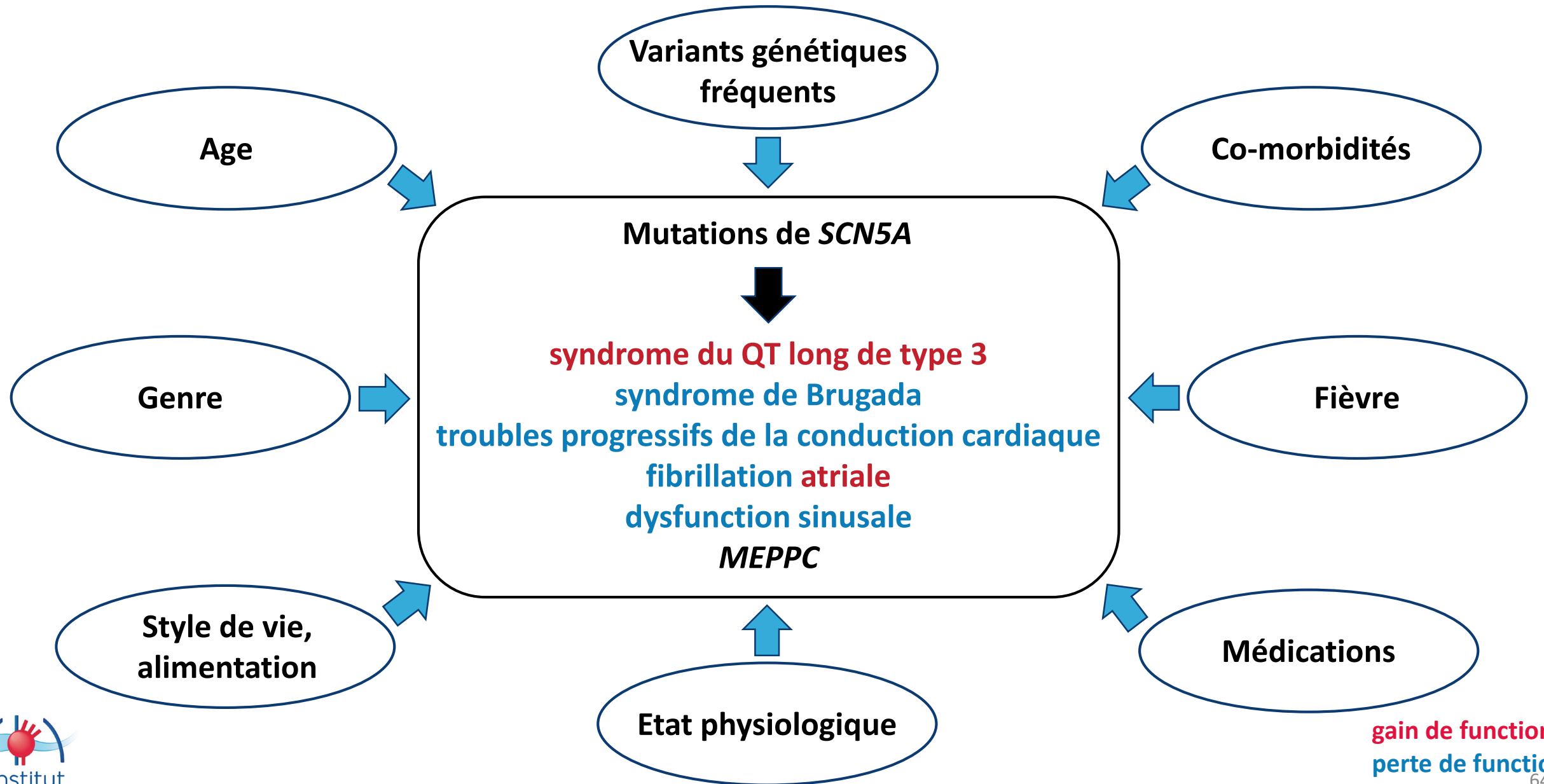
Conclusion

- ✓ Identification d'un **nouveau gène/variant** impliqué dans le syndrome de Brugada : ***RRAD* p.R211H**
- ✓ Dans les cardiomyocytes humains, le variant ***RRAD* p.R211H**
 - réduit l'amplitude des courants Na^+ et Ca^{2+}
 - diminue la vitesse de dépolarisation des potentiels d'action
 - induit un courant Na^+ persistant
 - prolonge les potentiels d'action et déclenche des post-dépolarisations précoces
 - induit des anomalies structurales

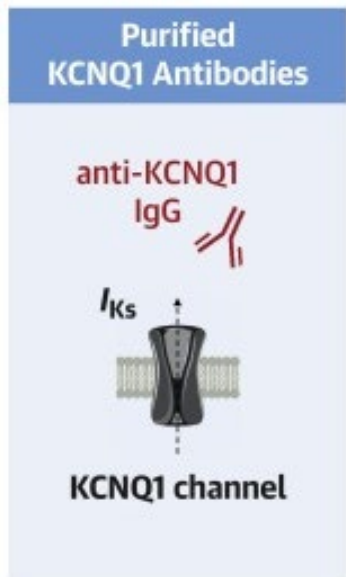
mécanismes ?

➔ **conséquences structurales dans le tissu cardiaque (souris knock-in) ?**
- ✓ Le modèle isogénique
 - valide que le variant de ***RRAD*** est suffisant pour provoquer un phénotype arythmogène

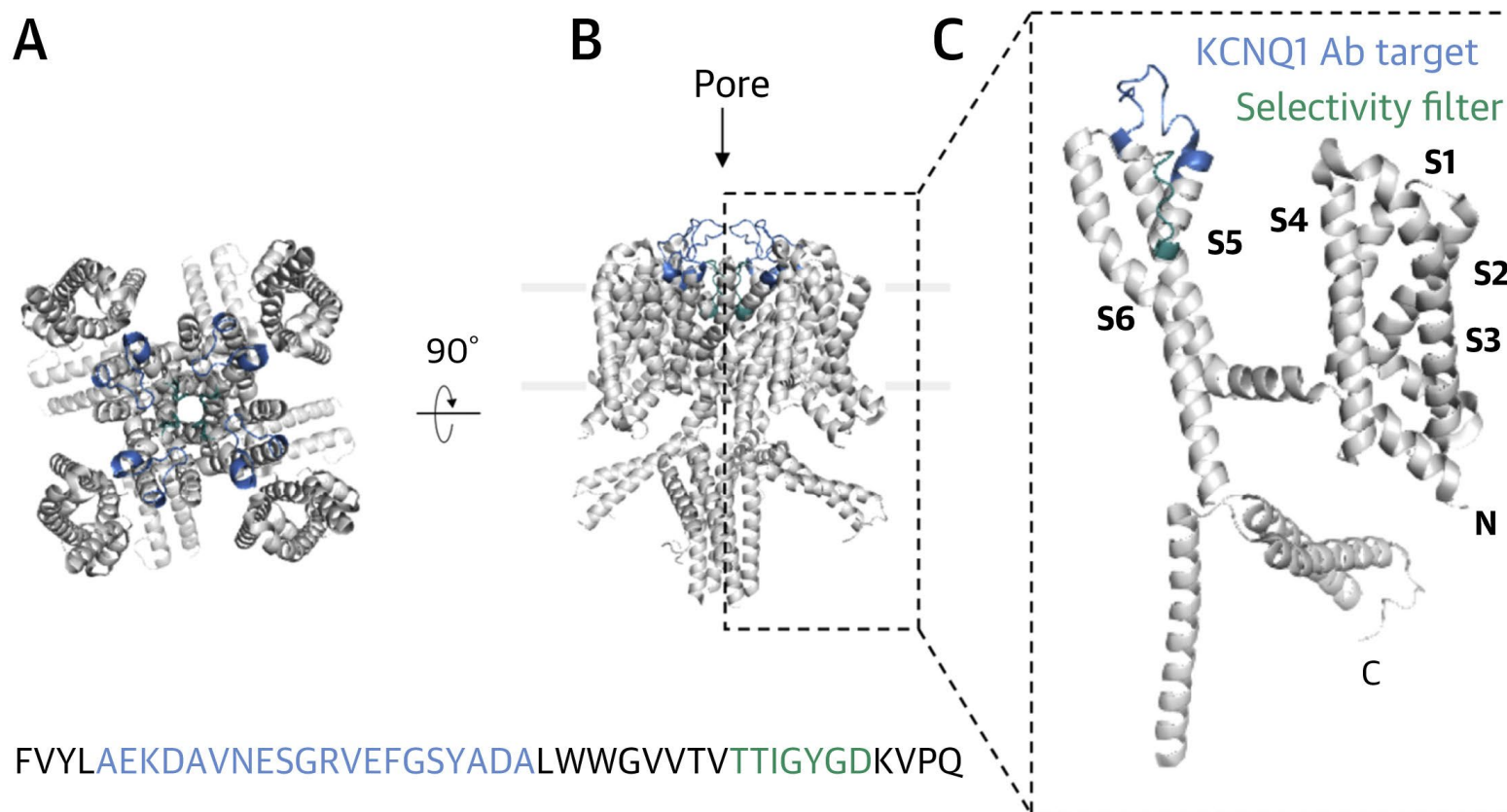
Modificateurs génétiques et non génétiques des canalopathies



Nouvelles voies thérapeutiques : immunothérapie ?



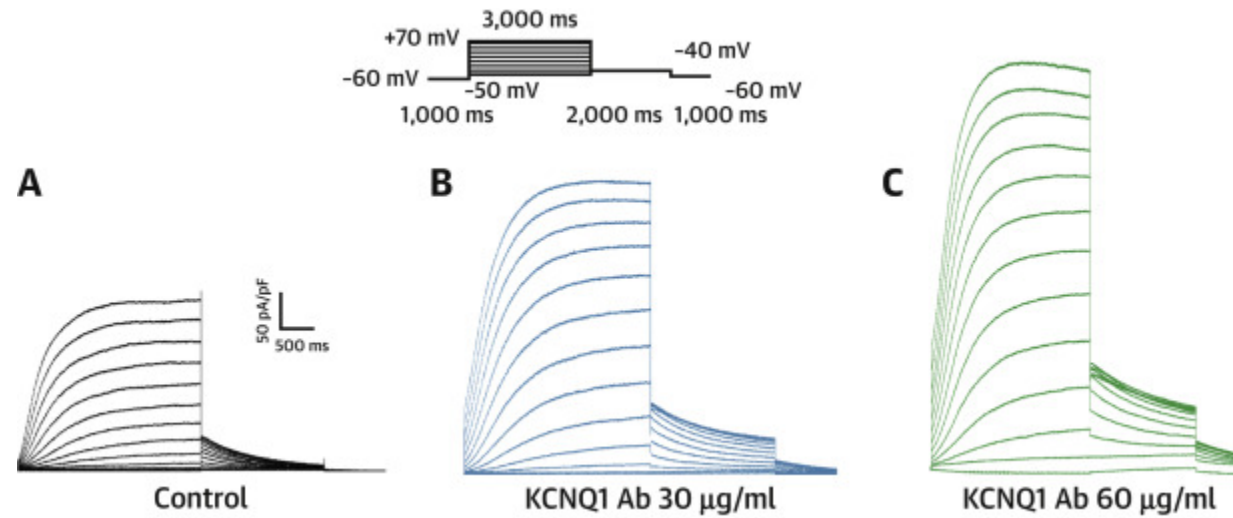
Anticorps ciblant le domaine extracellulaire du pore du canal Kv7.1 (*KCNQ1*) identifié dans un groupe de patients avec une cardiomyopathie dilatée et présentant un intervalle QT plus court que la moyenne



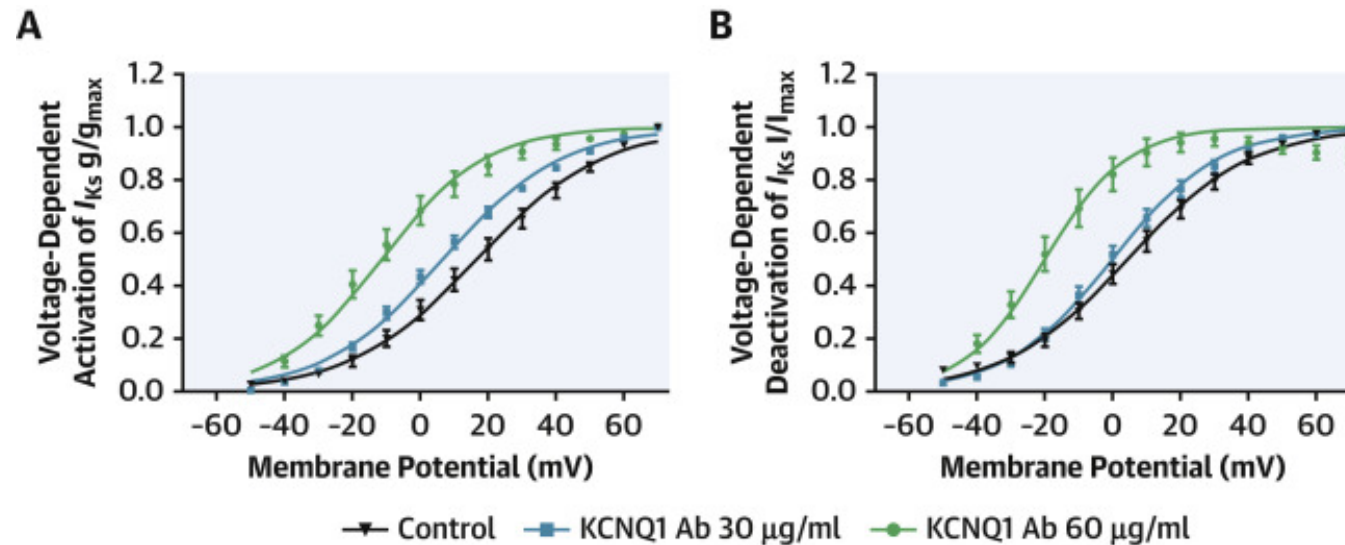
Mécanisme d'action de l'anticorps

- Cellules CHO exprimant Kv7.1 (KCNQ1) et sa protéine régulatrice KCNE1
- Patch-clamp en configuration 'cellule attachée'

Augmentation de l'amplitude d' I_{Ks}



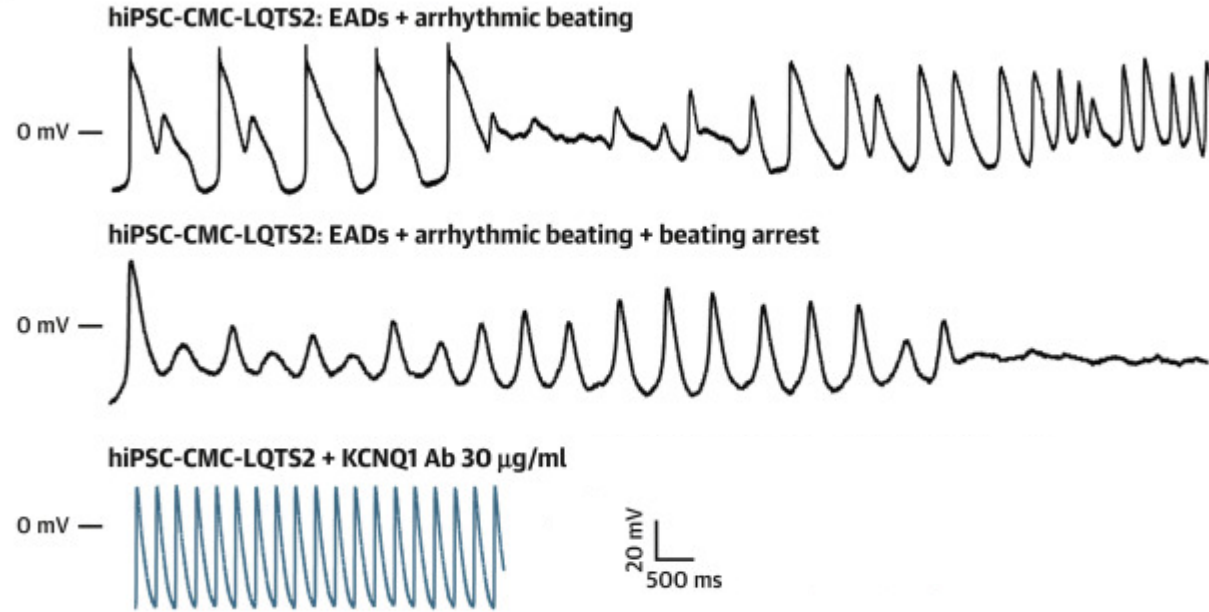
Activation plus précoce (potentiels plus négatifs)



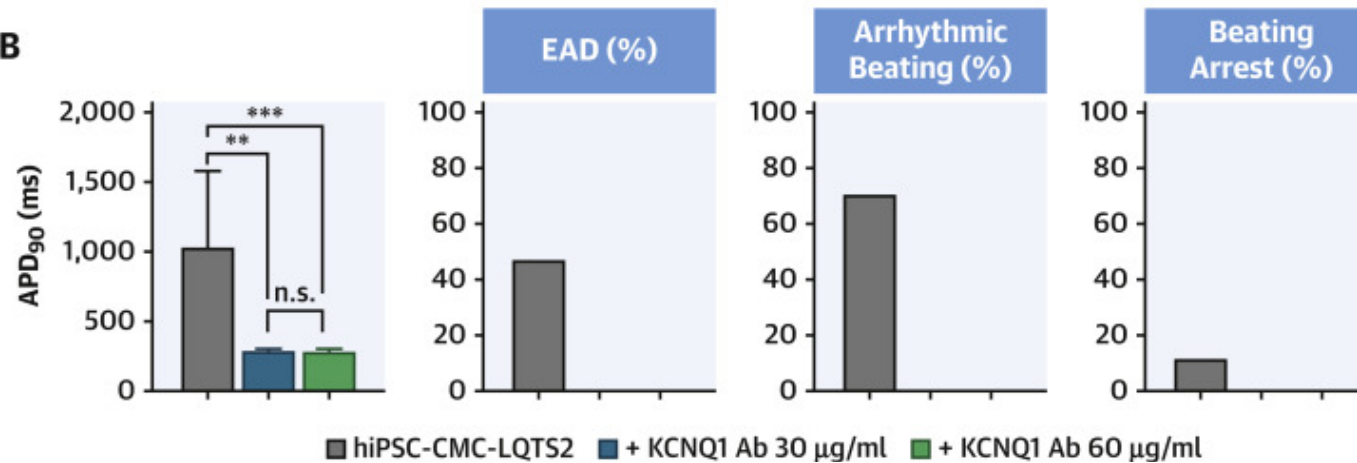
Effets de l'anticorps sur des cardiomyocytes de patients LQTS2

- Cardiomyocytes dérivés de cellules iPS humaines
- Patch-clamp en configuration 'cellule entière'

A



B



Raccourcissement du PA et suppression des arythmies

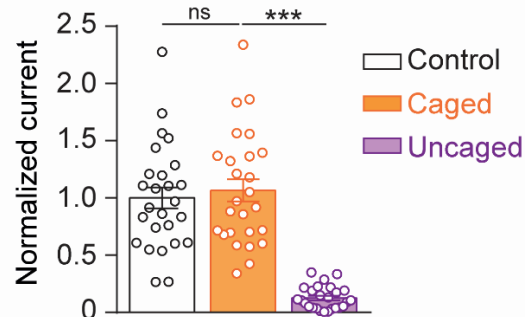
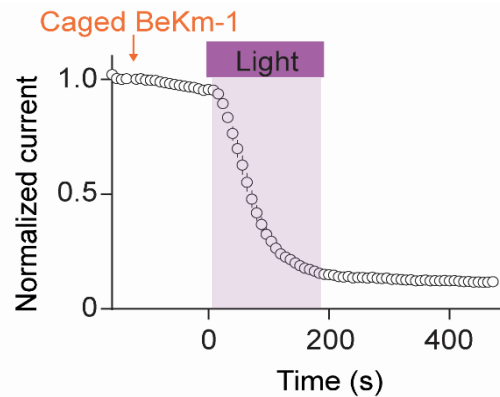
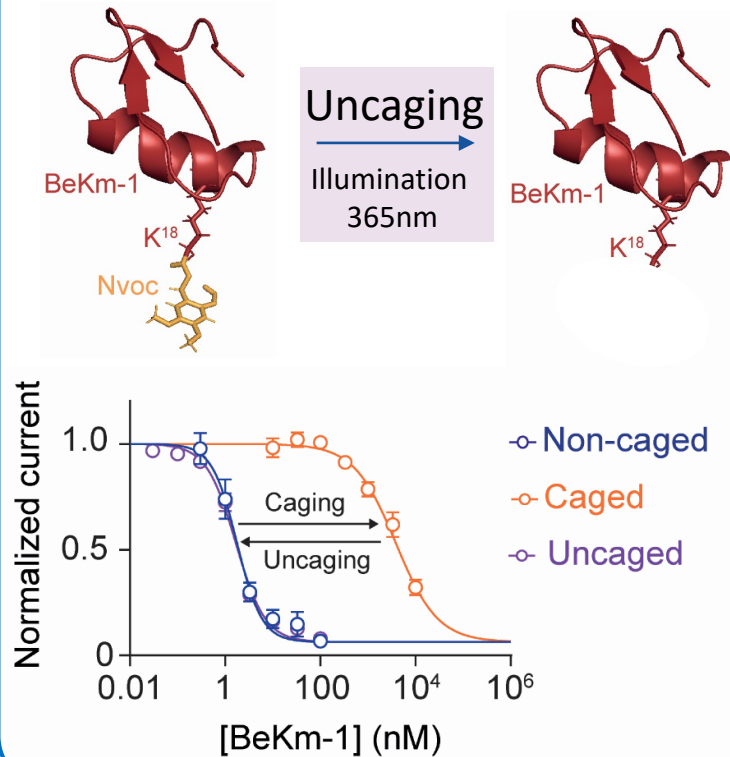
Nouvelles voies thérapeutiques : photopharmacologie ?

Contrôle optique de l'activité cardiaque par le BeKm-1 (peptide inhibiteur de Kv11.1) cagé

Cellules HEK

Caged BeKm-1

BeKm-1

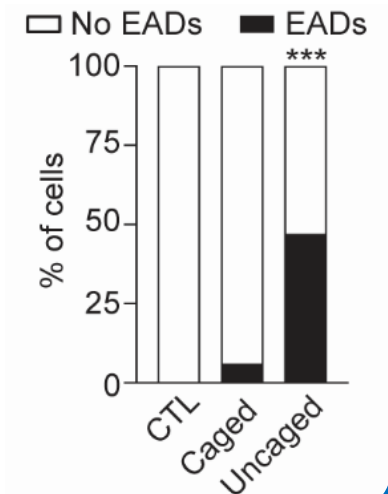
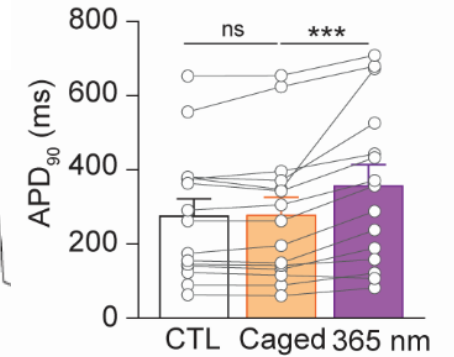


Cardiomyocytes dérivés de cellules iPS

Control

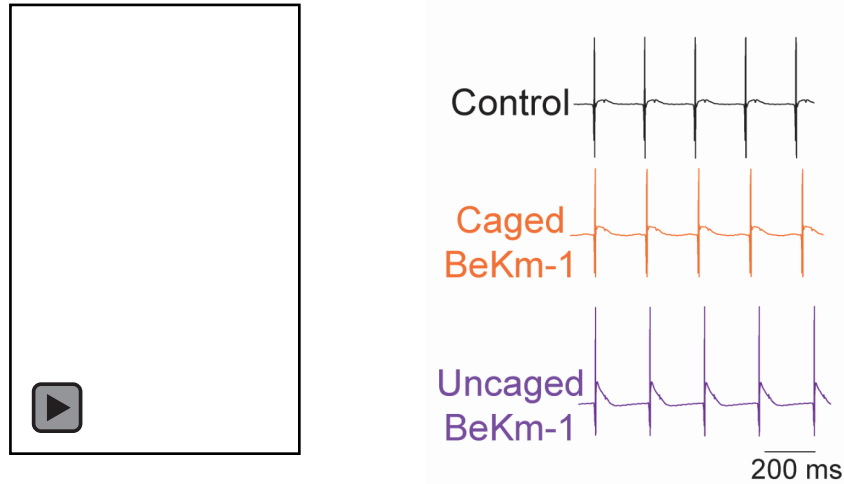
Caged

Uncaged

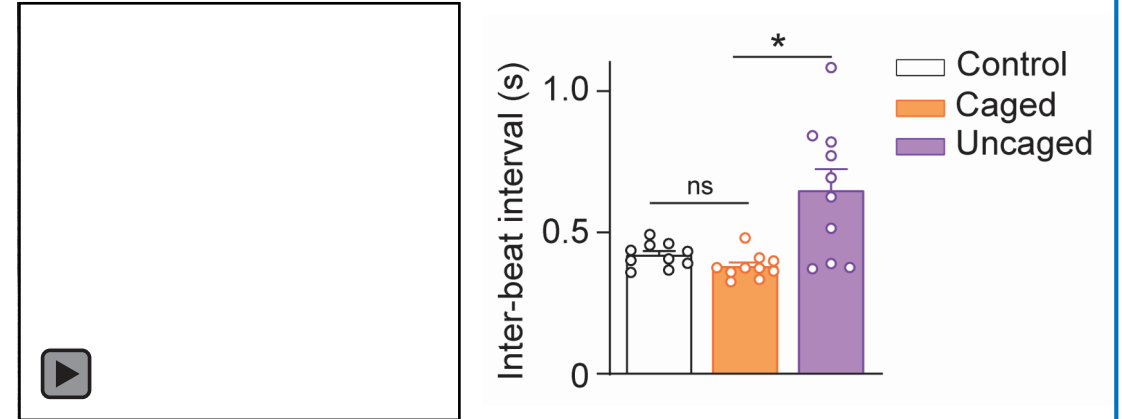


Nouvelles voies thérapeutiques : photopharmacologie ?

Ex vivo (cœur de rat perfusé)

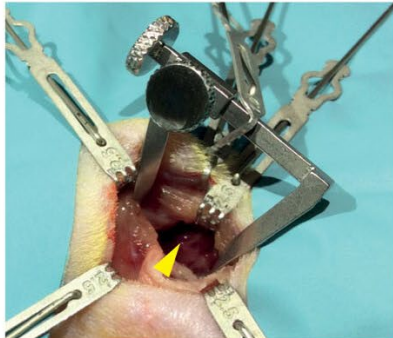


In vivo (larve de poisson-zèbre)

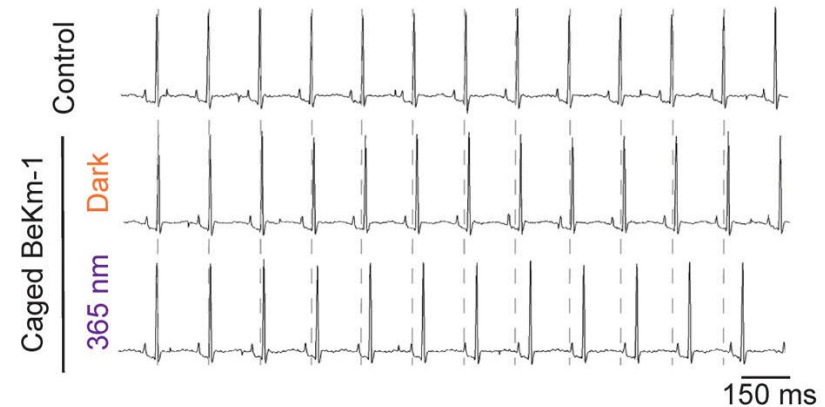
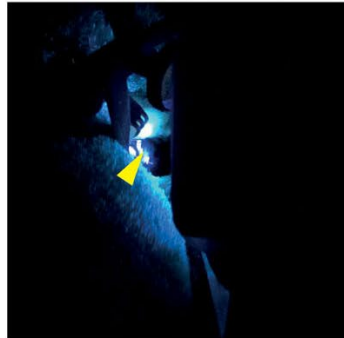


In vivo (rat anesthésié)

Mini-thoracotomy



365 nm illumination



Nouvelles voies thérapeutiques : photopharmacologie ?

