



# Voies de recherche sur les troubles du rythme cardiaque et la mort subite



Flavien CHARPENTIER

Equipe II " Canaux ioniques et cardiopathies "

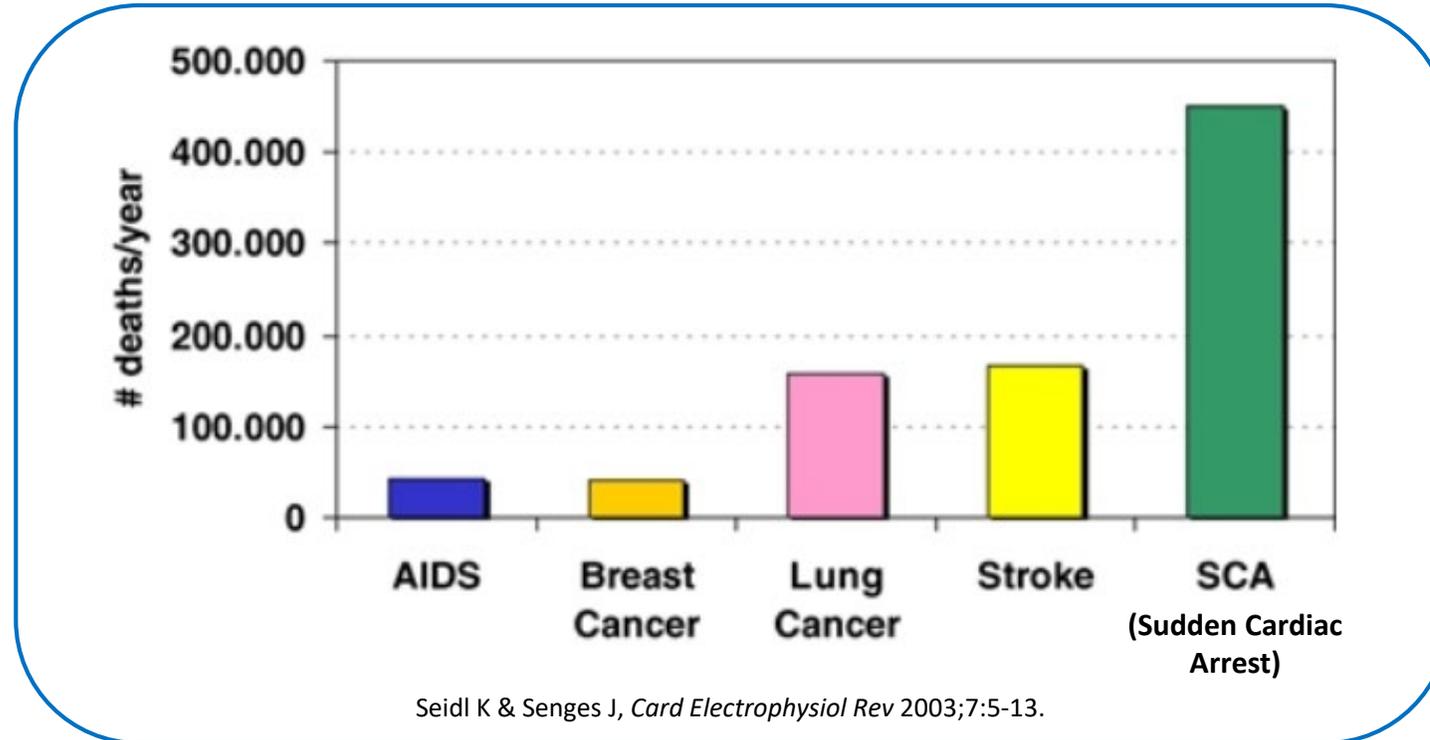
L'unité de recherche de l'institut du thorax

Inserm UMR 1087 / CNRS UMR 6291

Nantes, France

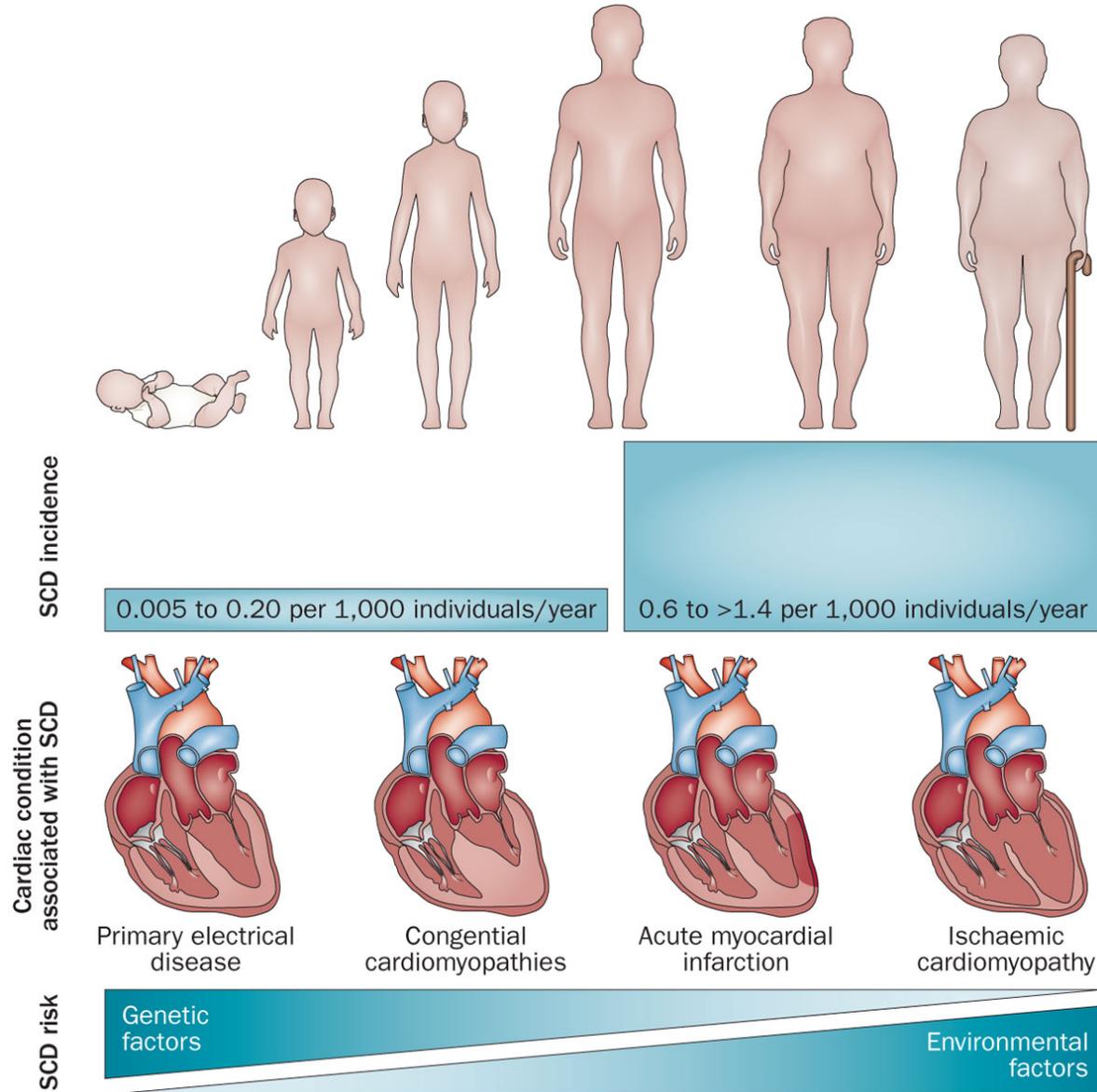
# Mort subite cardiaque

**Mort subite : décès inattendu survenant dans un délai inférieur à 1 h après le 1<sup>er</sup> symptôme**



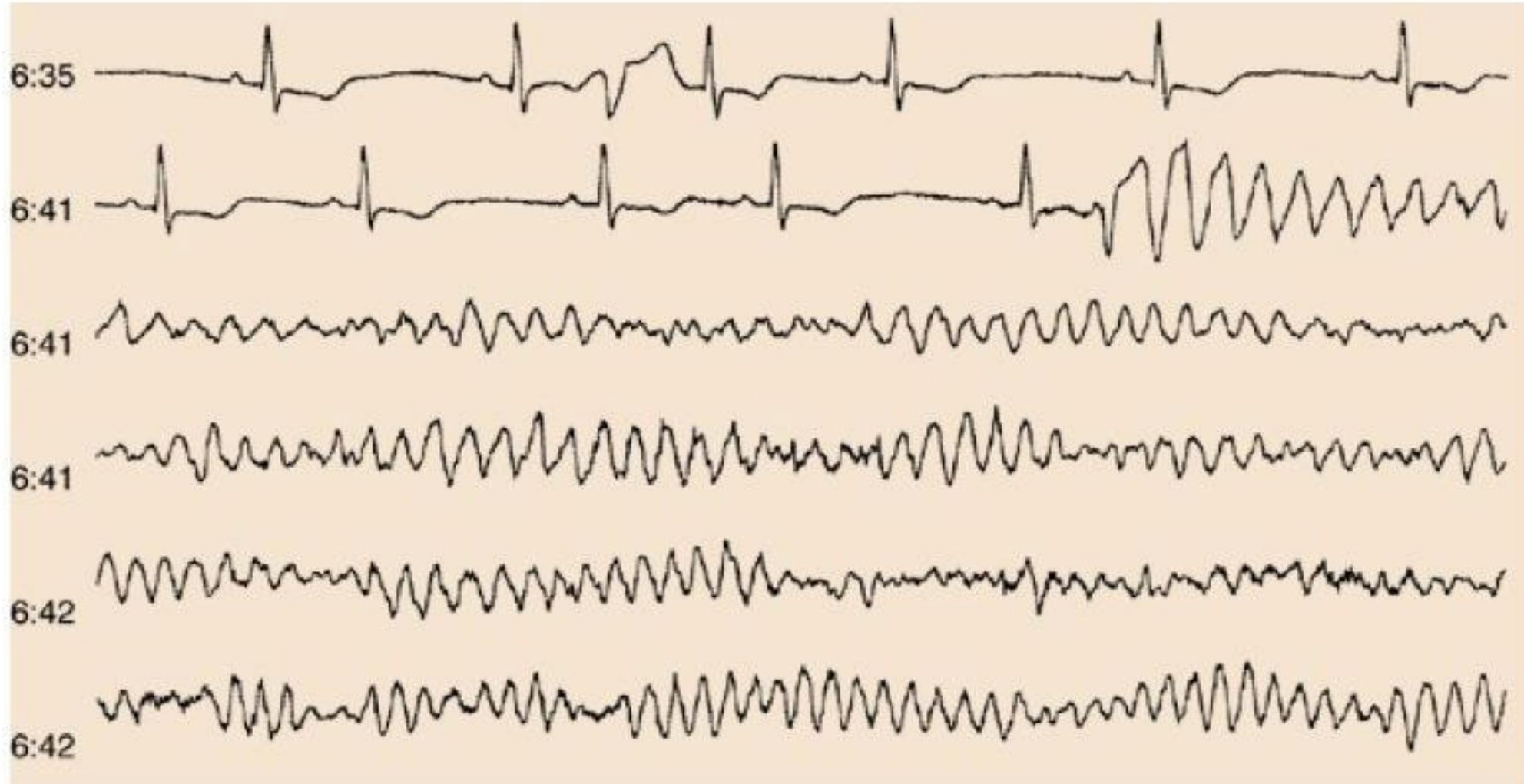
- **450 000 décès/an aux Etats-Unis et 400 000 en Europe de l'ouest**
- **environ 50 000 décès/an en France (135-140 victimes par jour)**
- **63% des décès de cause cardiaque**
- **15% de la mortalité totale (environ 70% entre 35 et 44 ans)**

# Mort subite cardiaque



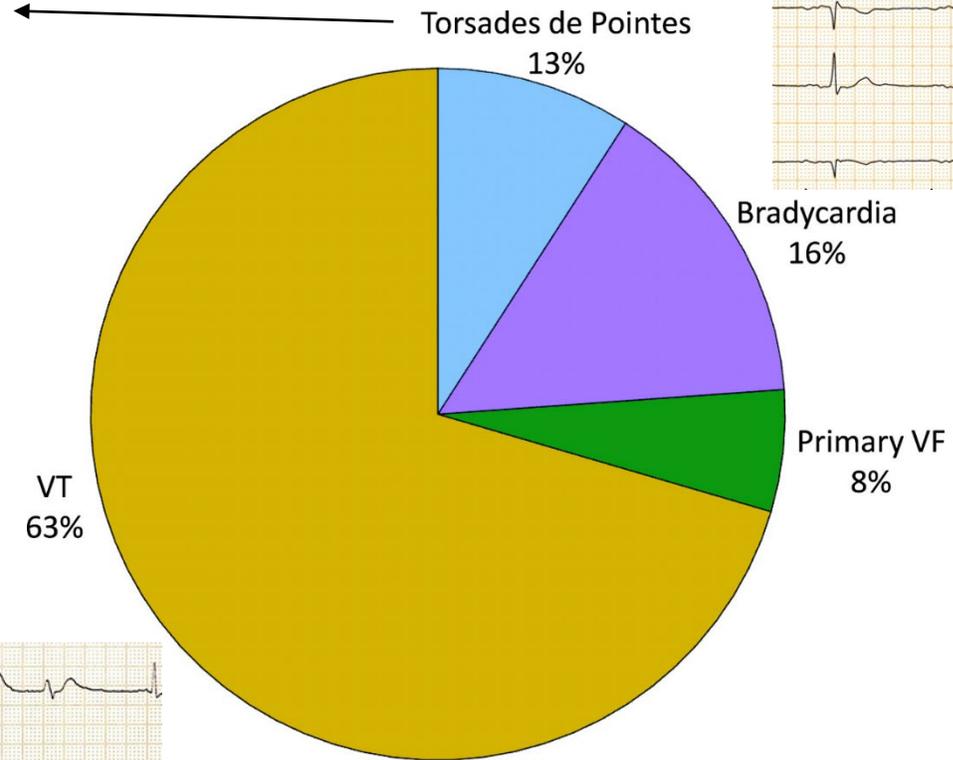
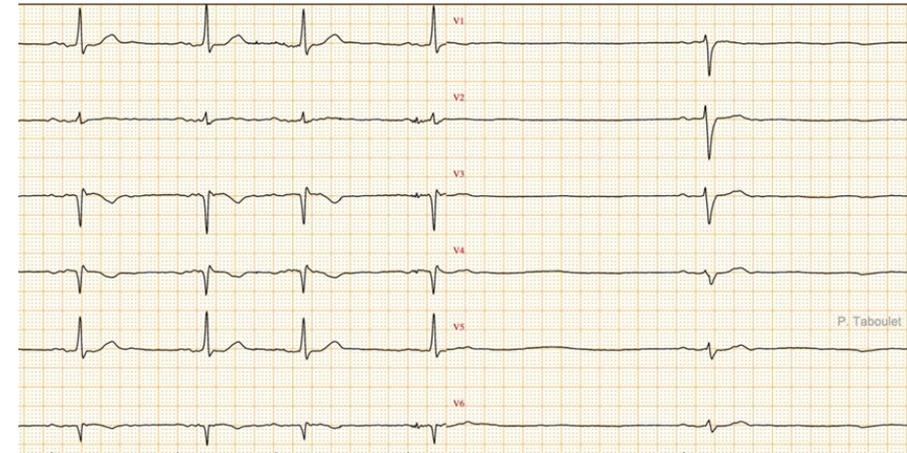
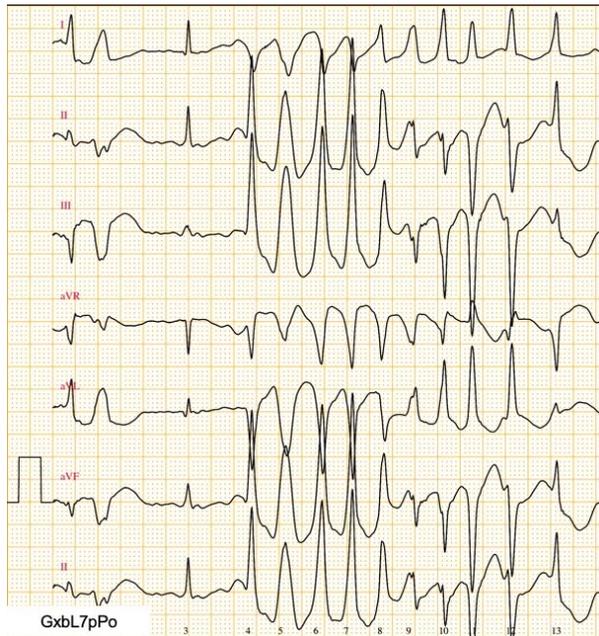
SCD: sudden cardiac death

# Causes arythmiques de la mort subite



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

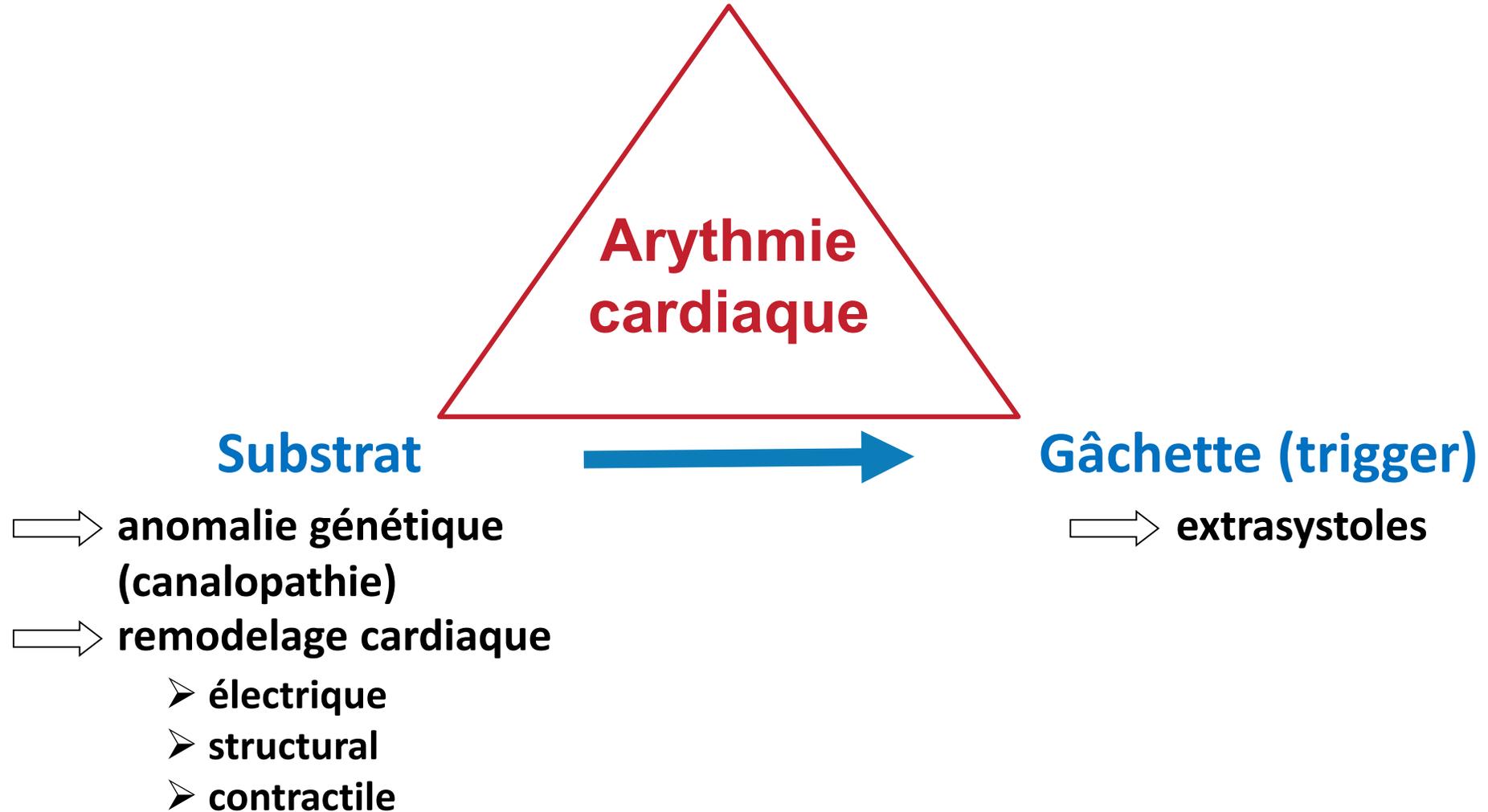
# Causes arythmiques de la mort subite



VF: ventricular fibrillation  
VT: ventricular tachycardia

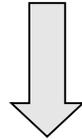
# Le triangle de Coumel

Systeme nerveux autonome



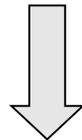
# Causes moléculaires des troubles du rythme

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

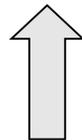


**Remodelage électrique** = altération de l'activité électrique des myocytes cardiaques

(+ remodelage structural & contractile)



**Troubles du rythme cardiaque**



**Canalopathies** (anomalies du **génome**)

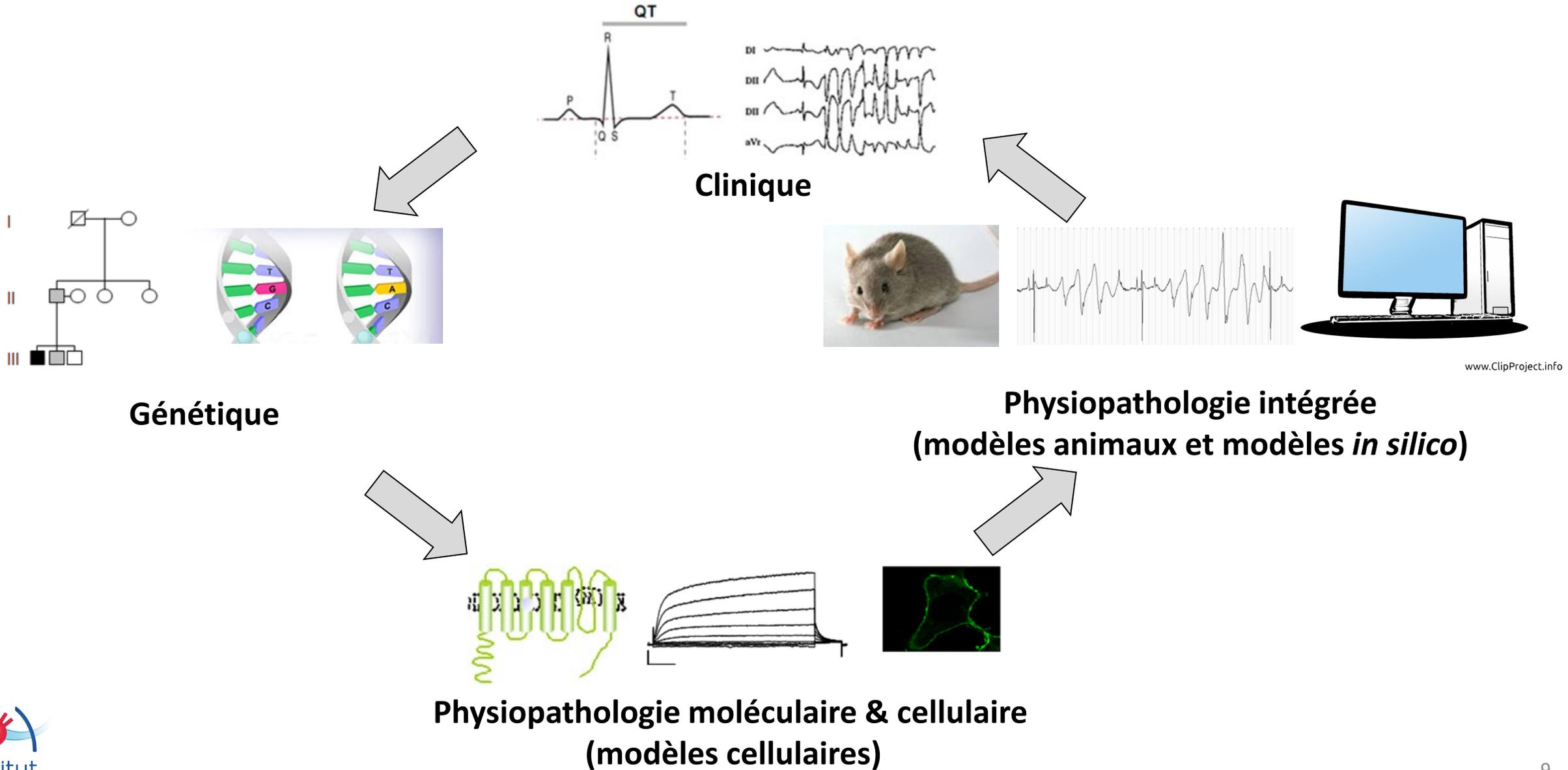
Pathologies cardiaques fréquentes

Arythmies héréditaires

# Canalopathies cardiaques

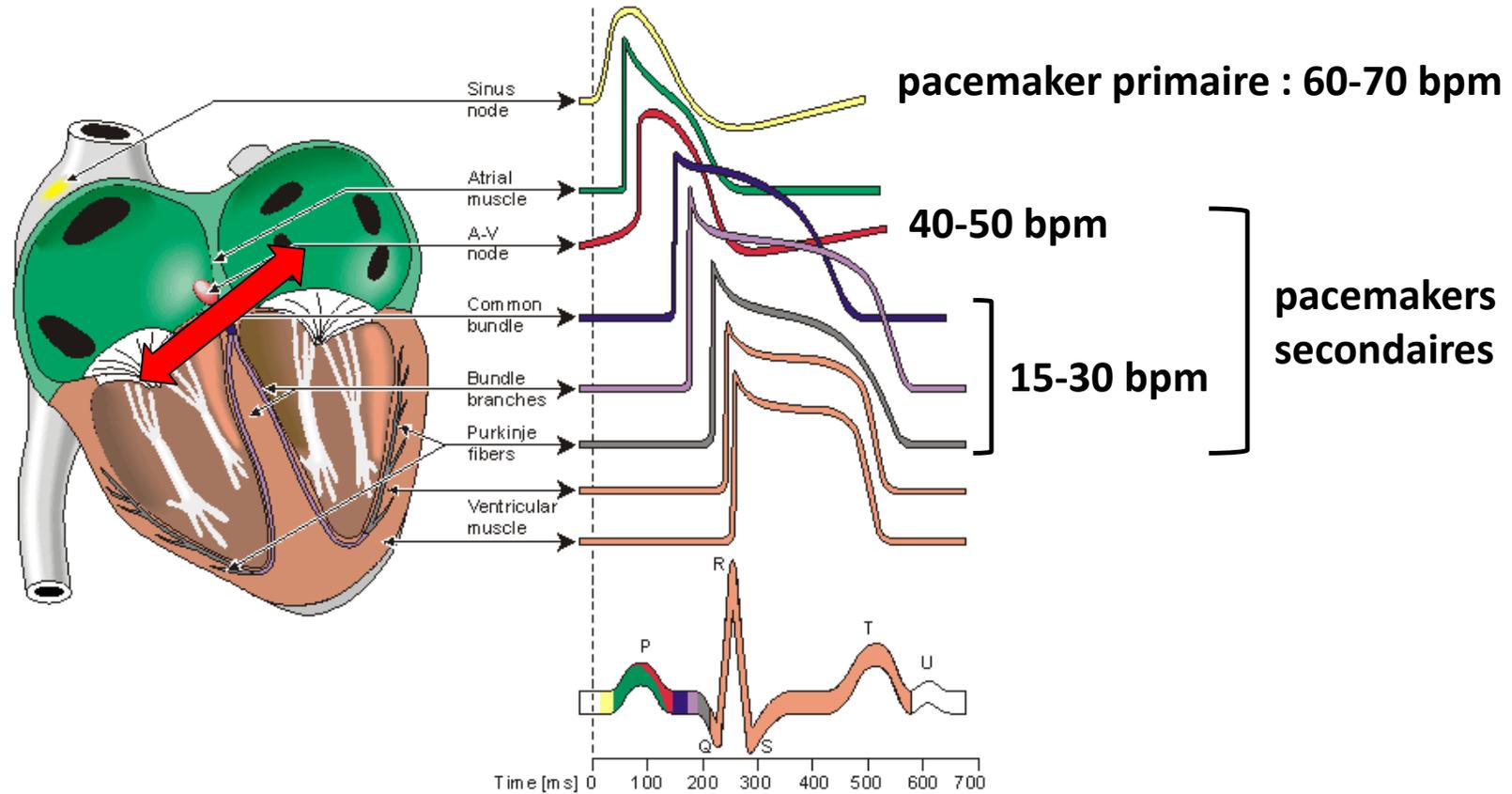
- long QT syndromes (Romano-Ward, Jervell & Lange-Nielsen, Andersen, Timothy)
- short QT syndrome
- **Brugada syndrome**
- **cardiac conduction diseases (congenital, progressive)**
- catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia
- early repolarization syndrome
- sick sinus syndrome
- atrial fibrillation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

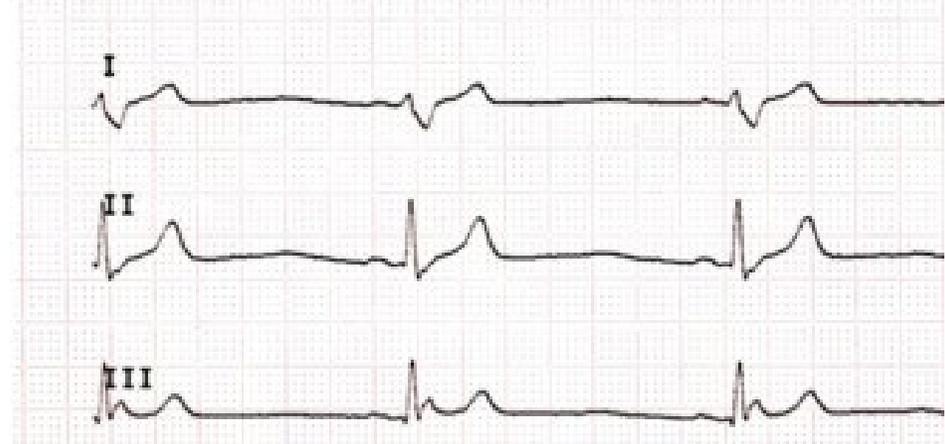
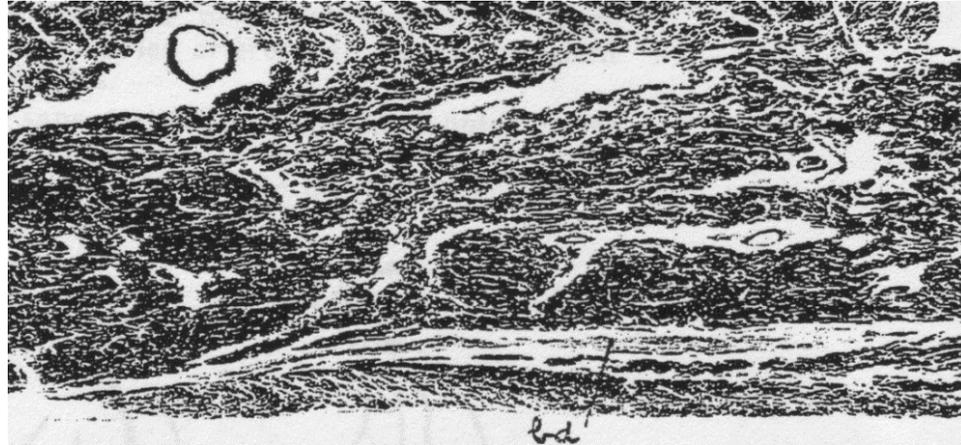
# Bloc auriculo-ventriculaire



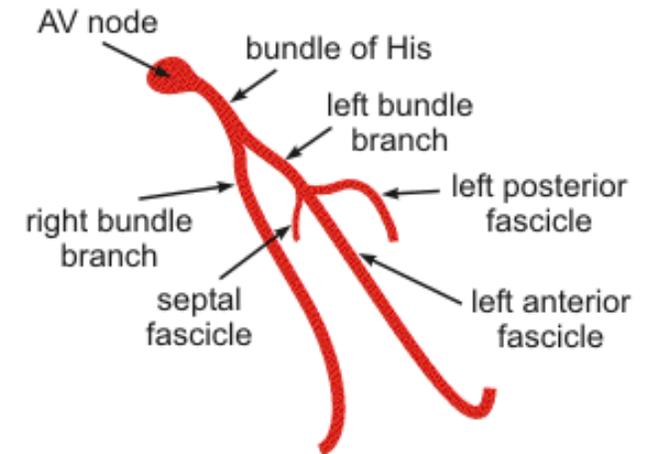
## bloc auriculo-ventriculaire



# Troubles progressifs de la conduction cardiaque

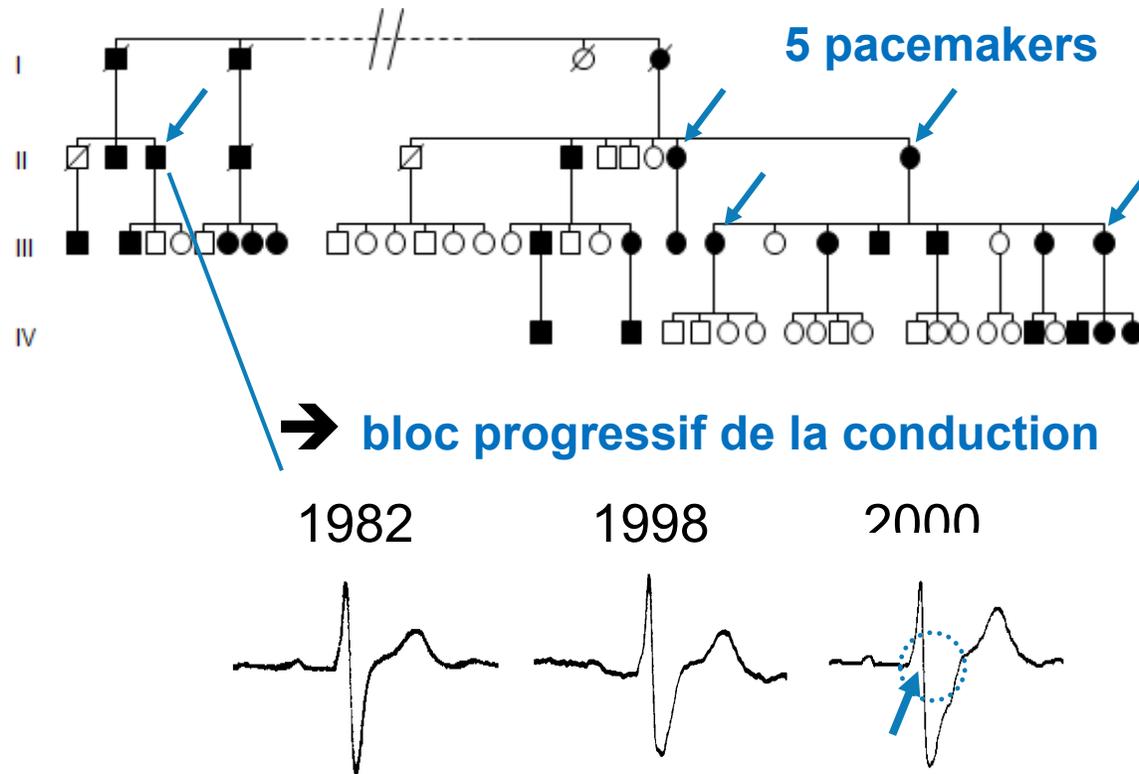


- une des principales causes d'implantation de pacemakers
- un processus lent se développant sur des décennies
- atteinte des faisceaux de His et de ses branches
- différents aspects à l'ECG: blocs de branche, BAV...
- fibrose *post-mortem*

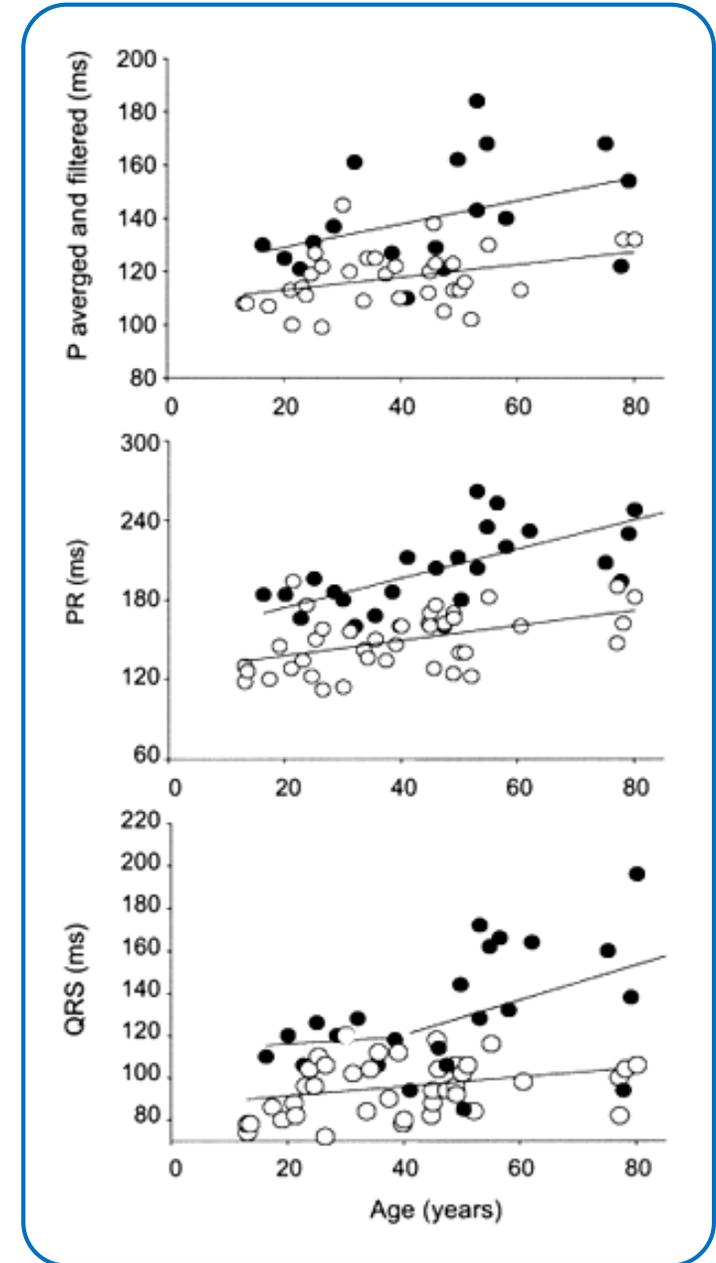


➔ **Hypothèse de Lenègre : maladie dégénérative due à l'apparition de fibrose avec l'âge**

# Troubles progressifs de la conduction cardiaque



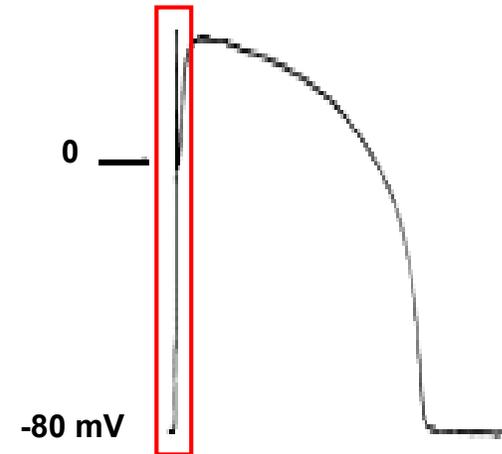
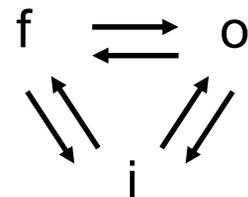
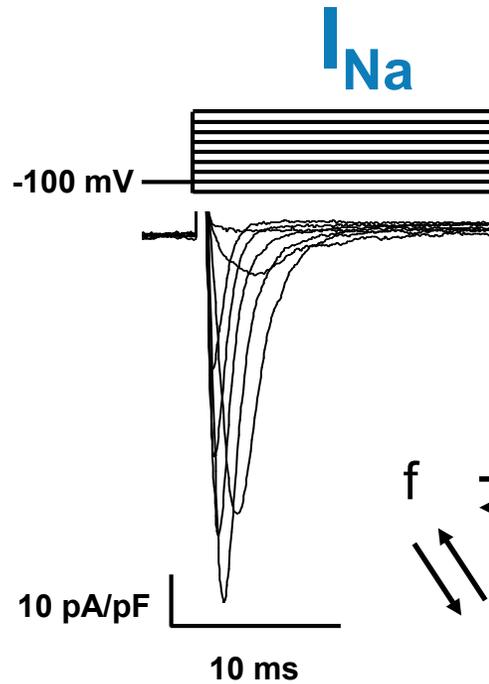
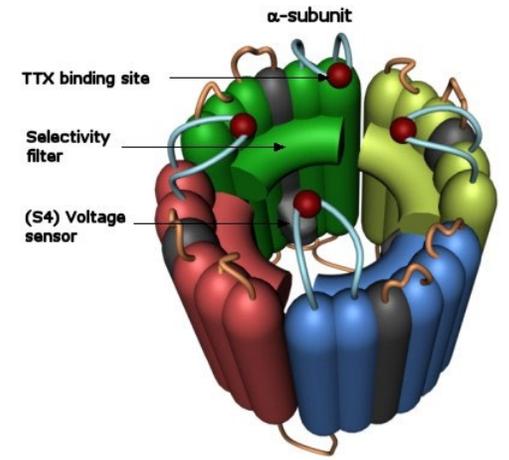
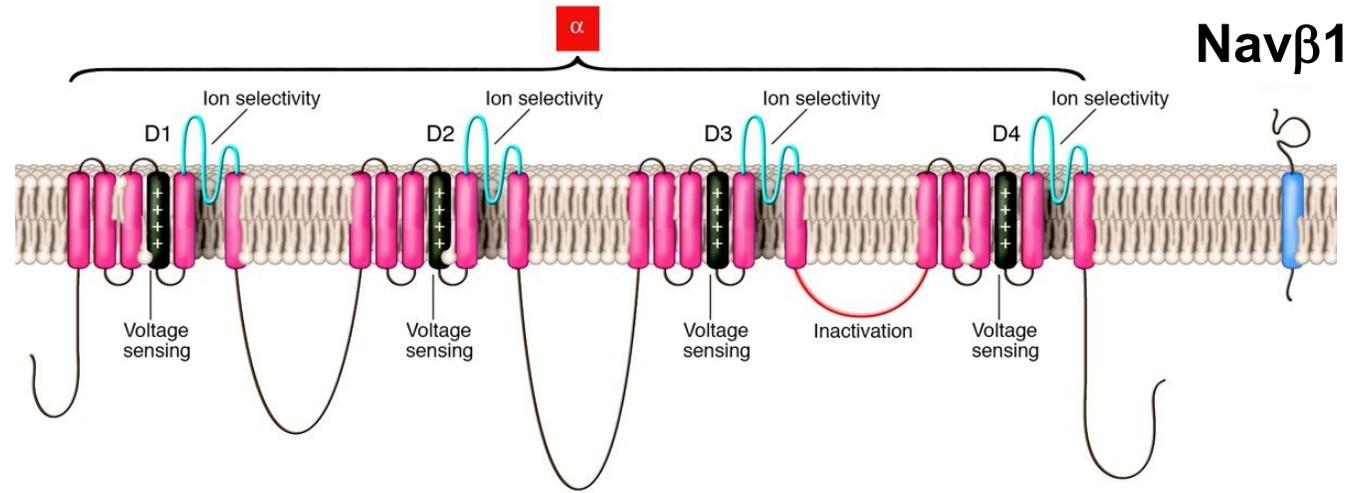
- **Augmentation progressive des troubles de la conduction**
- **Variabilité des défauts de conduction**



# Le gène impliqué : *SCN5A* (canal $Na_v1.5$ )



(3p21) *SCN5A*



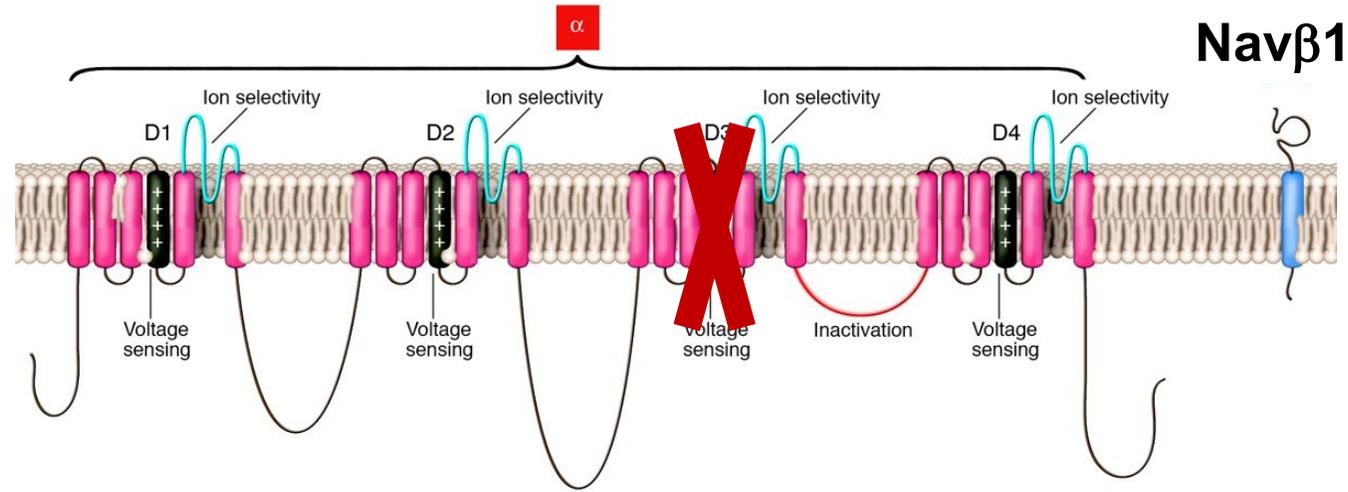
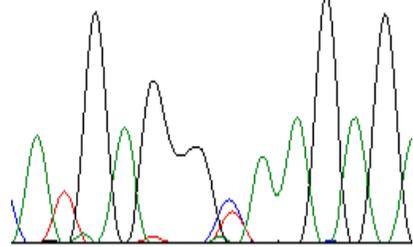
Conduction de l'influx électrique cardiaque

# Le gène impliqué : *SCN5A* (canal $Na_v1.5$ )

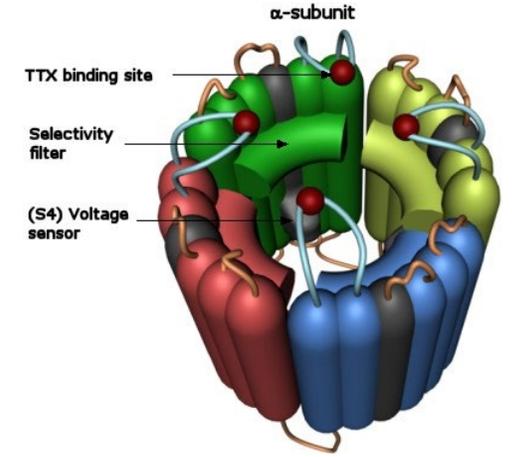


(3p21) *SCN5A*

IVS.22+2T→C

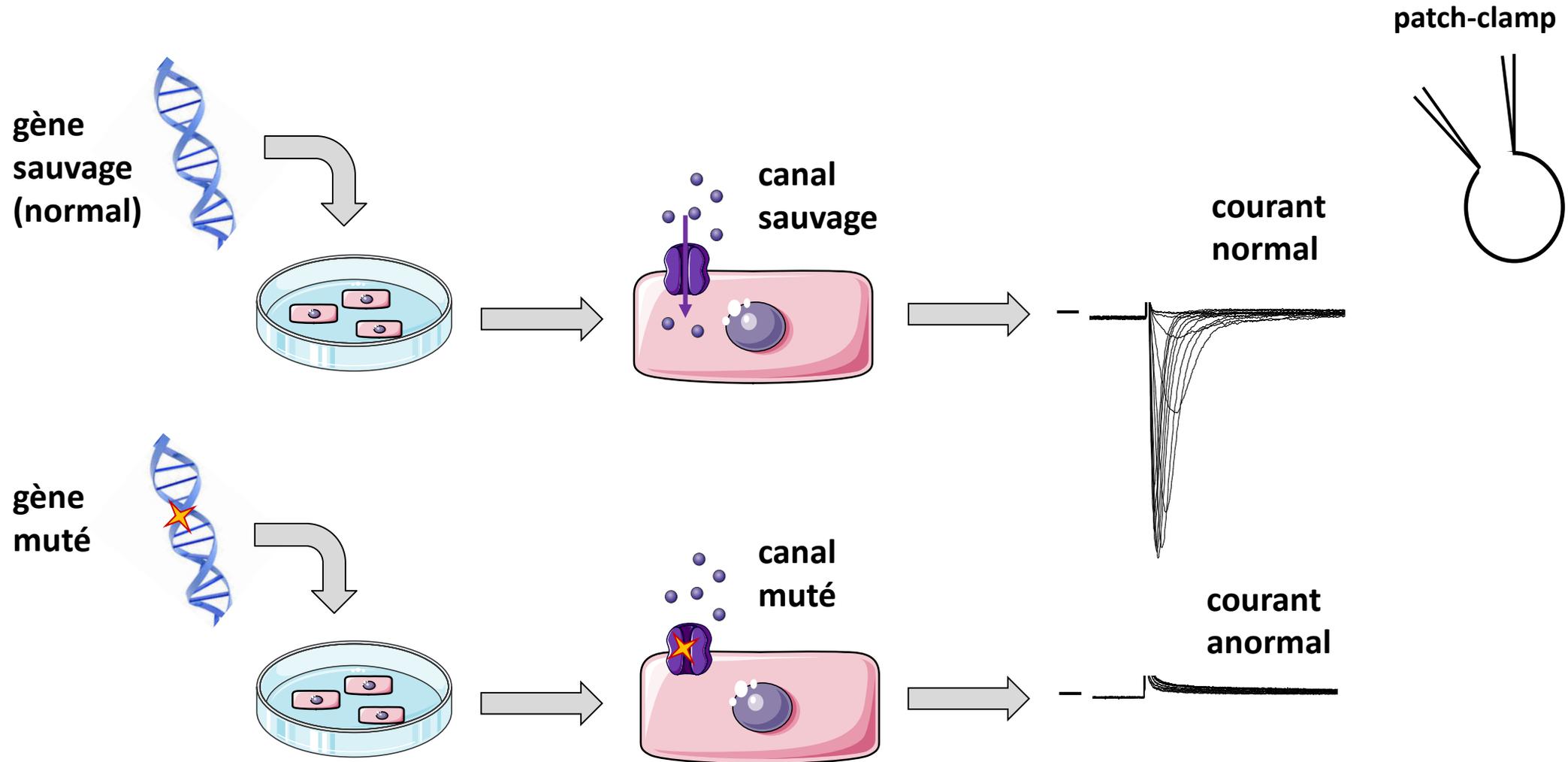


Délétion de l'exon22 → DIII-S4

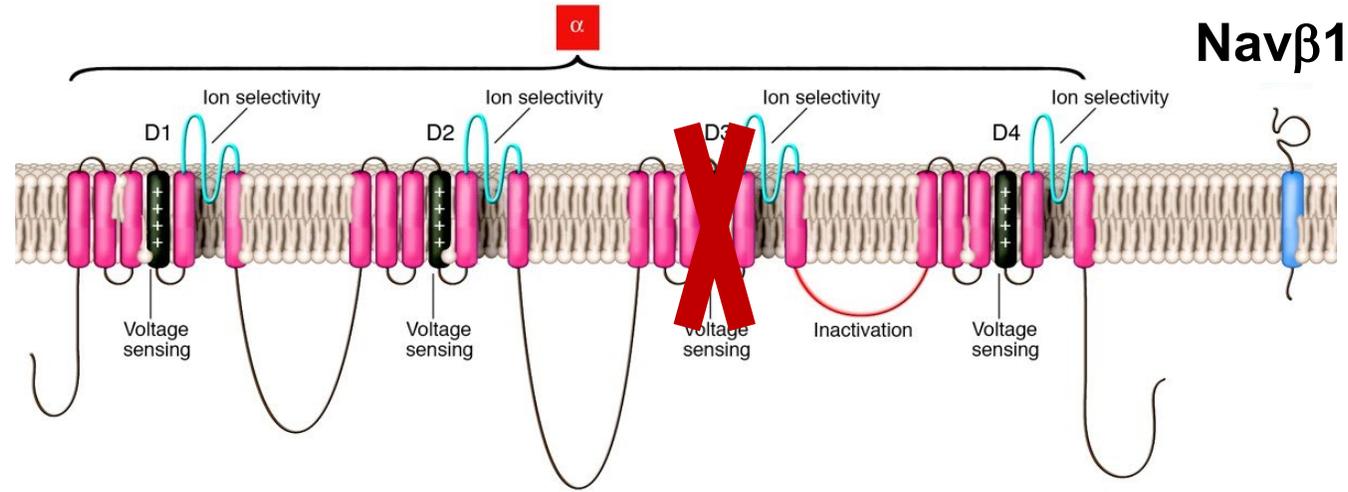
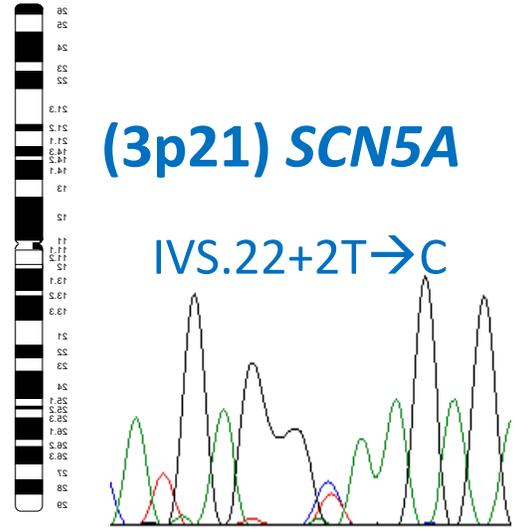


# Caractérisation des effets des mutations

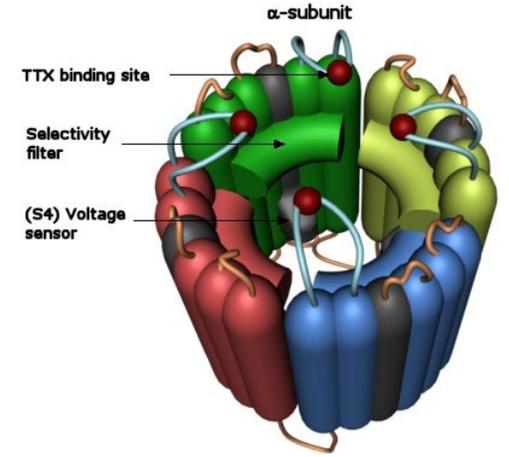
- nécessité de développer des modèles cellulaires alternatifs aux cardiomyocytes des patients
- cellules en culture ne possédant pas les canaux ioniques cardiaques



# Perte de fonction du canal $Na_v1.5$

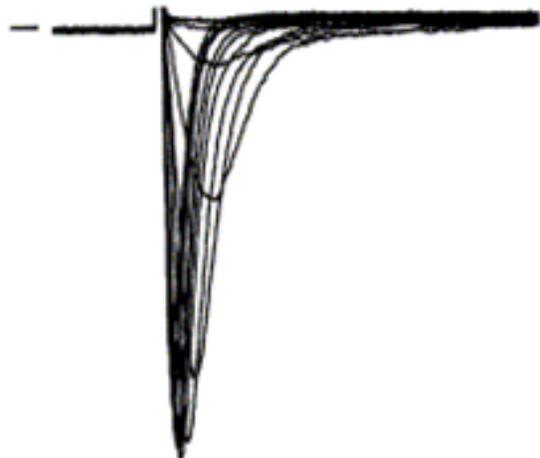


Délétion de l'exon22 → DIII-S4

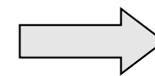


$Na_v1.5$  WT +  $Na_v\beta_1$

$Na_v1.5$   $\Delta$ ex.22 +  $Na_v\beta_1$

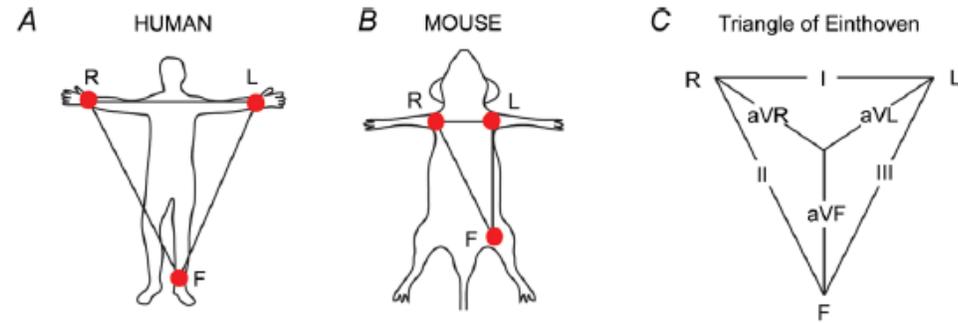


Haplo-insuffisance (50% de réduction d'I<sub>Na</sub>)

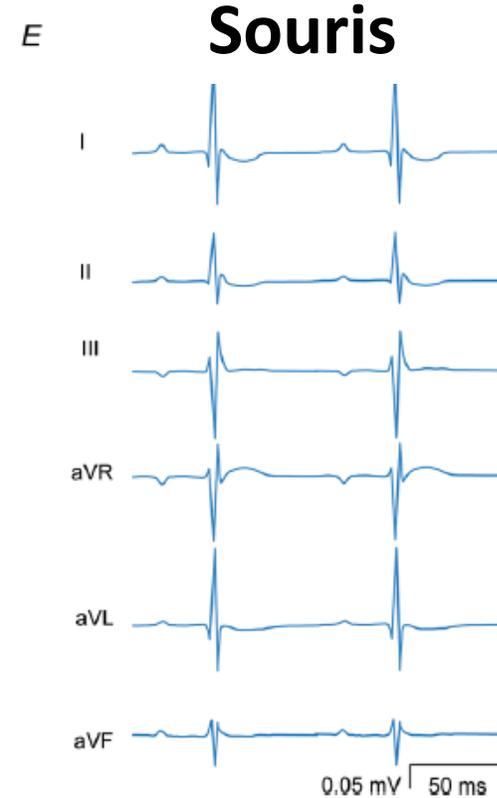
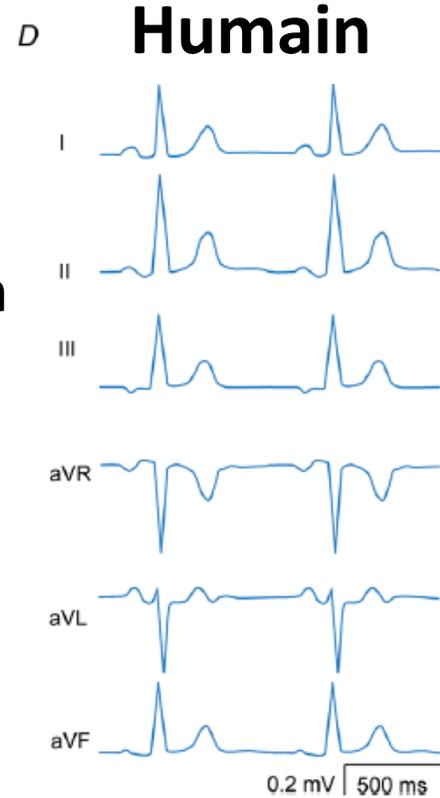


effets du vieillissement ?

# Limites du modèle murin

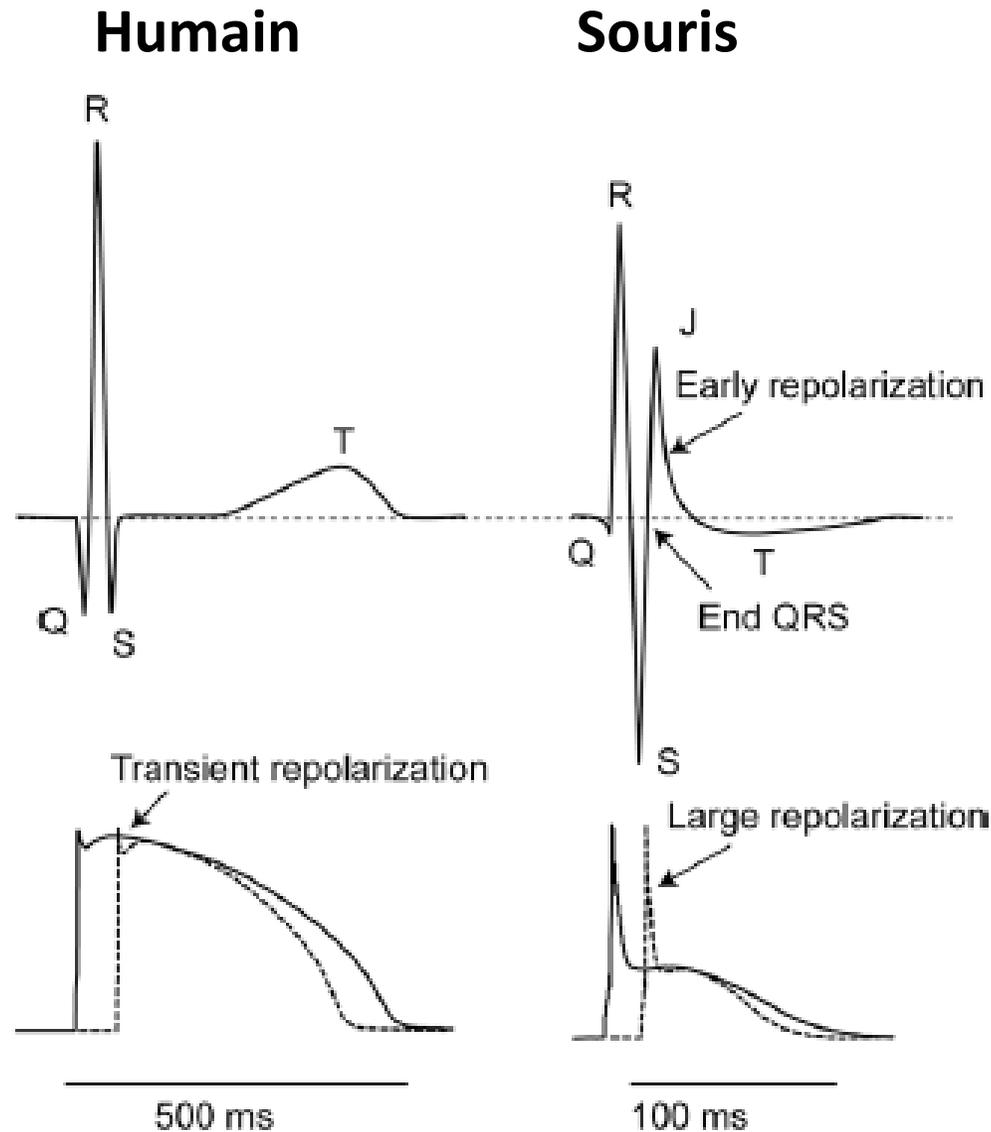


**60-70/min**



**600/min**

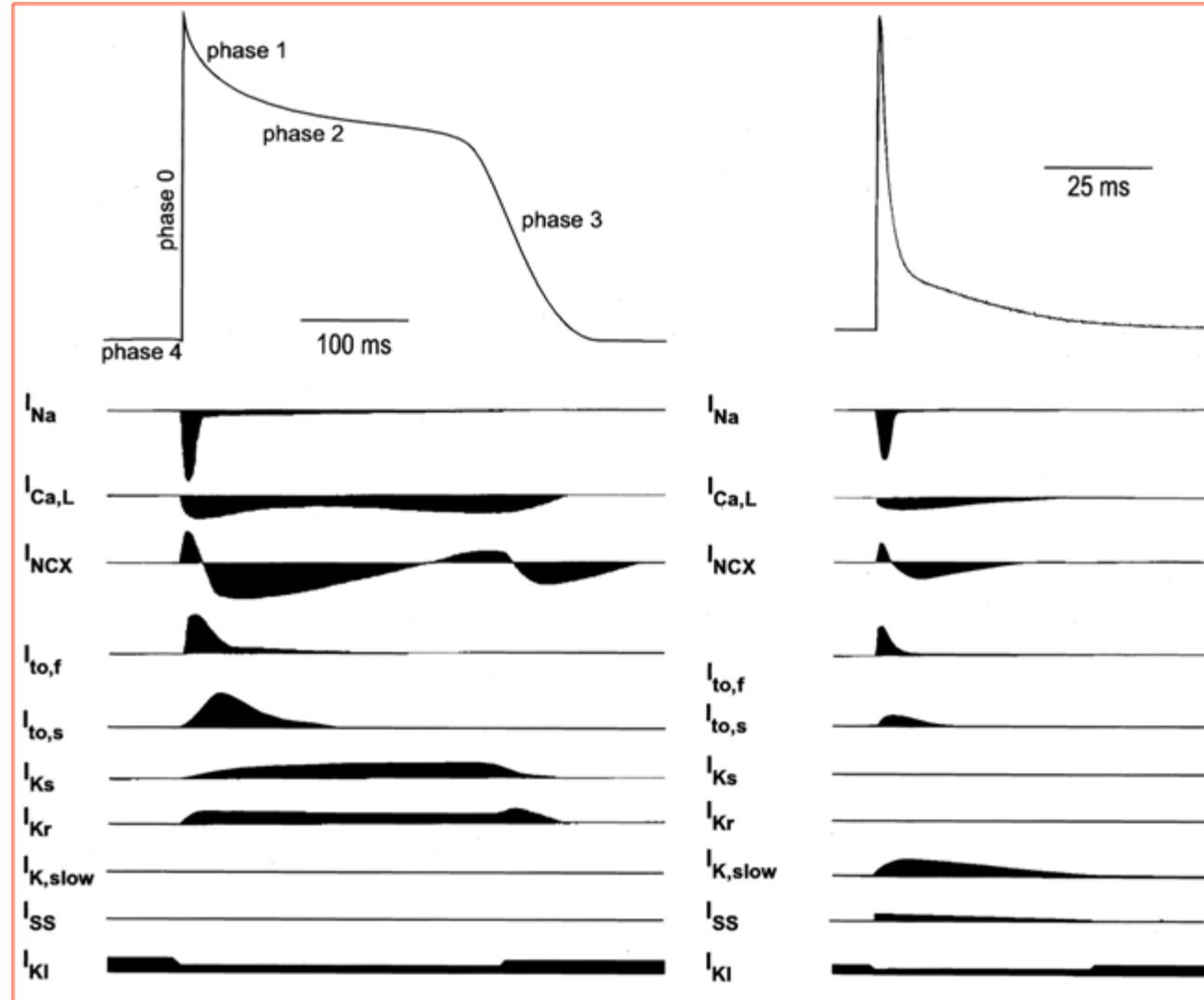
# Limites du modèle murin : la repolarisation



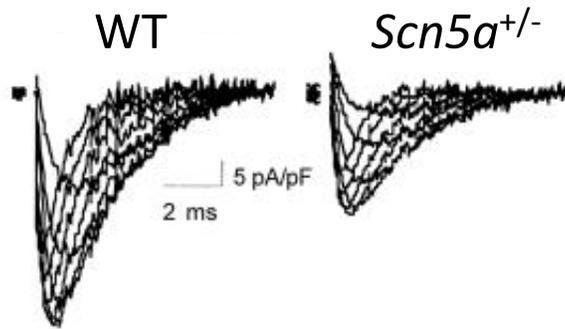
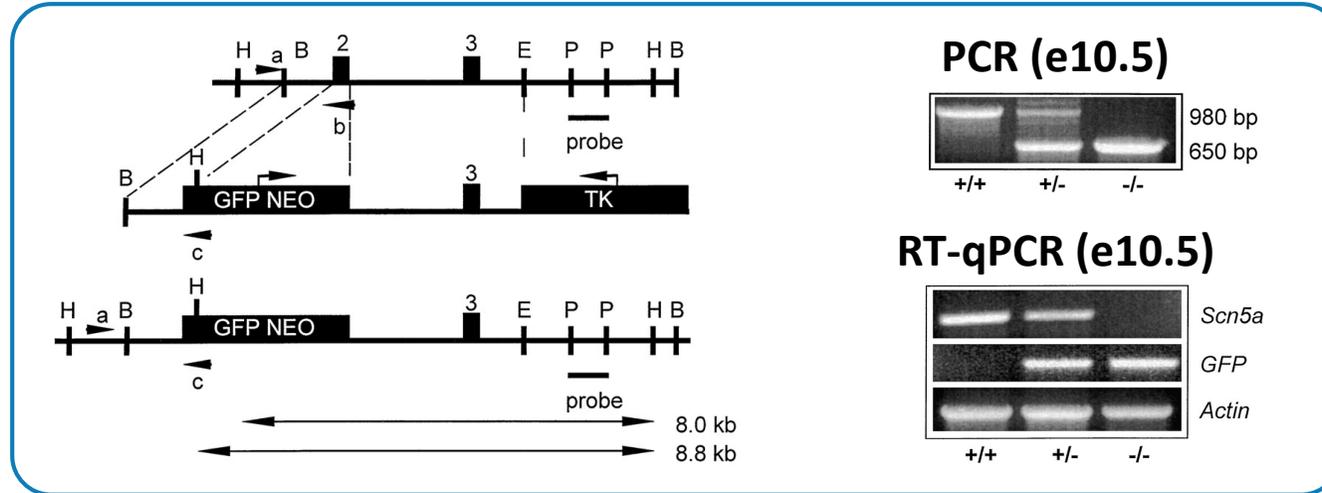
# Limites du modèle murin : la repolarisation

## Homme

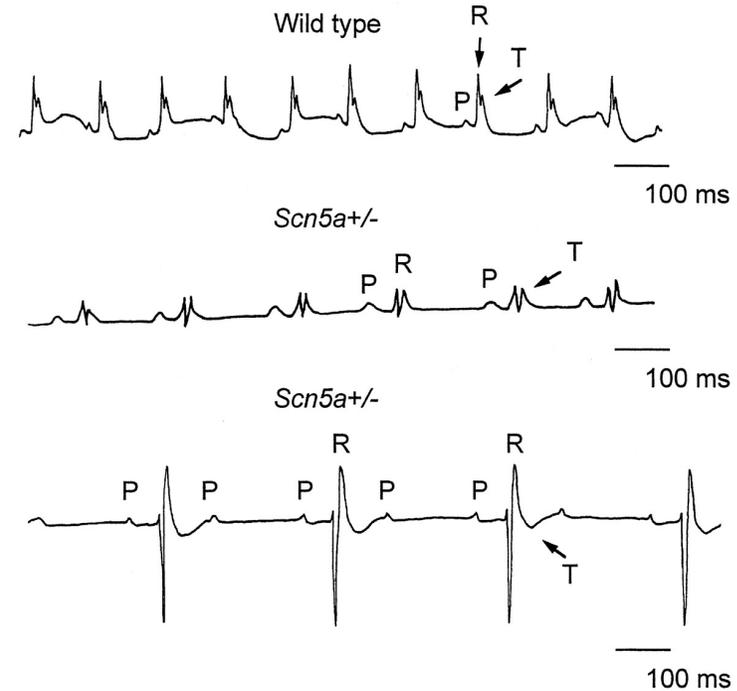
## Souris



# La souris *Scn5a*<sup>+/-</sup>



≈ 50% diminution d' $I_{Na}$



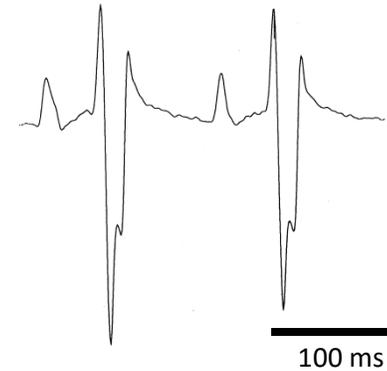
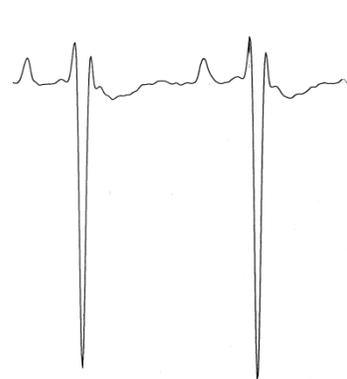
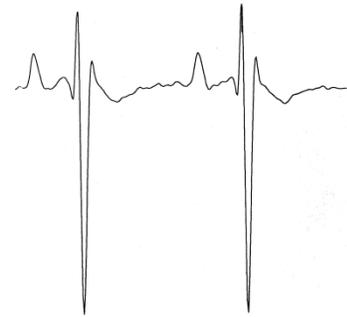
# Les souris *Scn5a*<sup>+/-</sup> présentent un phénotype hétérogène

10 weeks old

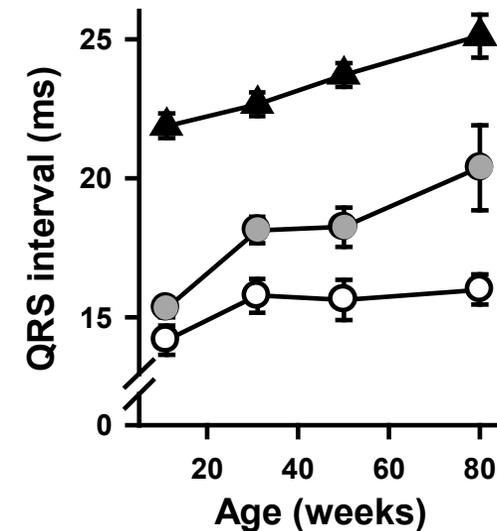
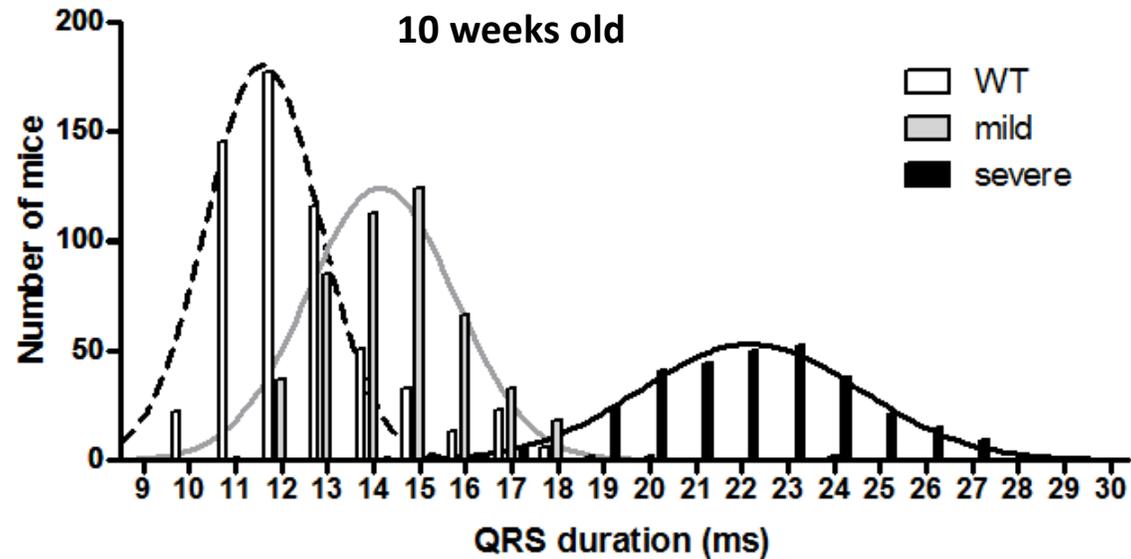
□ WT

■ mild *Scn5a*<sup>+/-</sup>

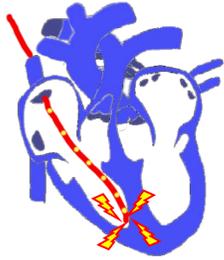
■ severe *Scn5a*<sup>+/-</sup>



WT = wild type (contrôle)

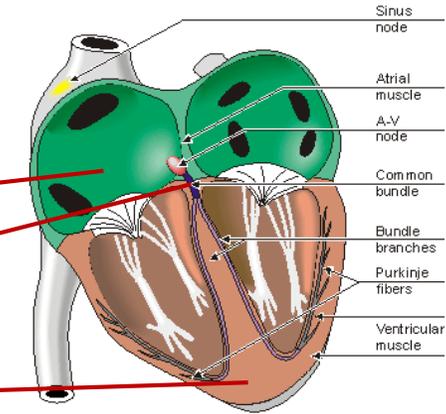
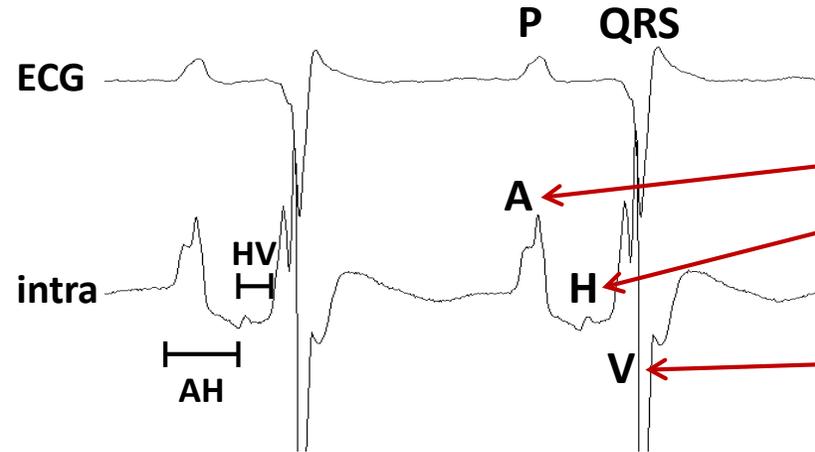


# Altération de la conduction dans le réseau His-Purkinje



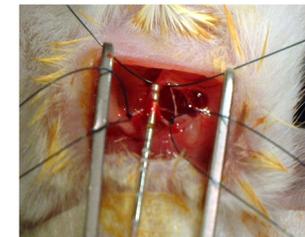
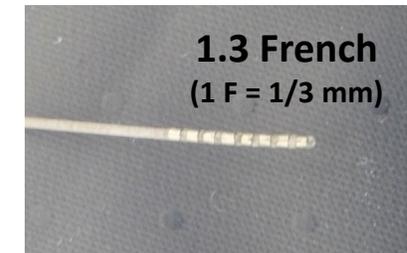
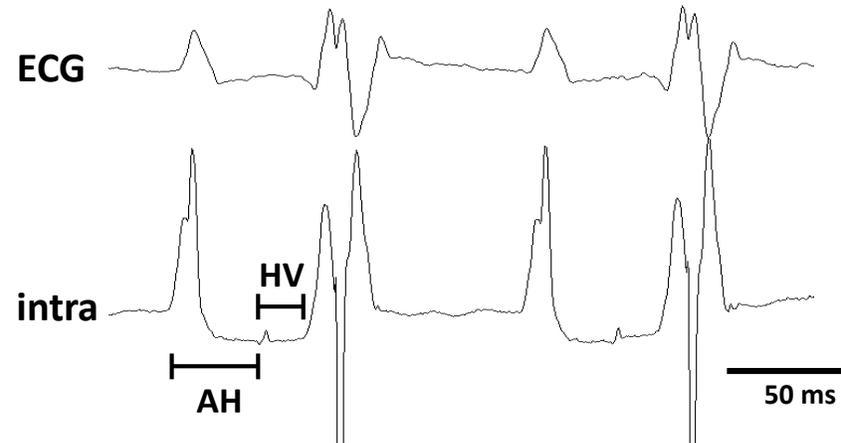
**Wild-type**  
(n=10; 19 ± 1 weeks old)

AH: 33.1 ± 2.5 ms  
HV: 12.6 ± 1.1 ms



**Scn5a<sup>+/-</sup>**  
(n=15; 21 ± 1 weeks old)

AH: 35.6 ± 1.8 ms  
HV: 18.7 ± 1.7 ms \*\*



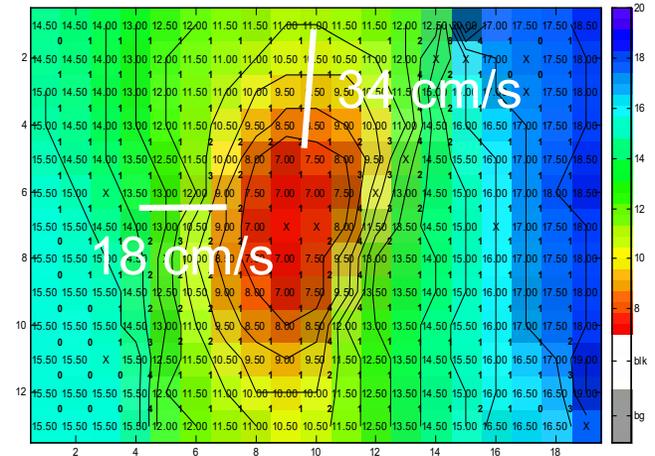
# Altération de la conduction ventriculaire

technique de Langendorff

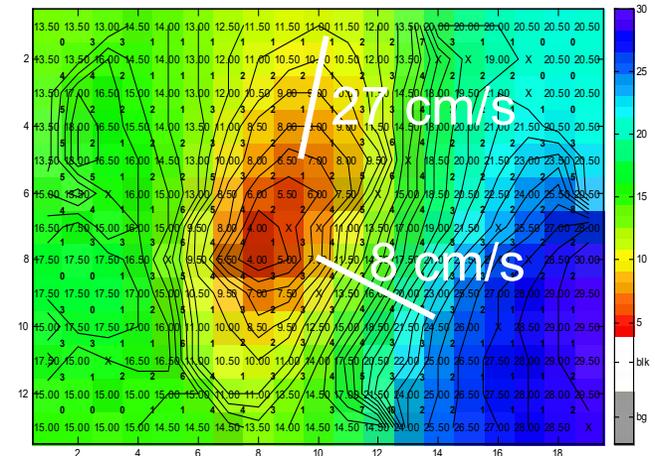


réseau d'électrodes

WT



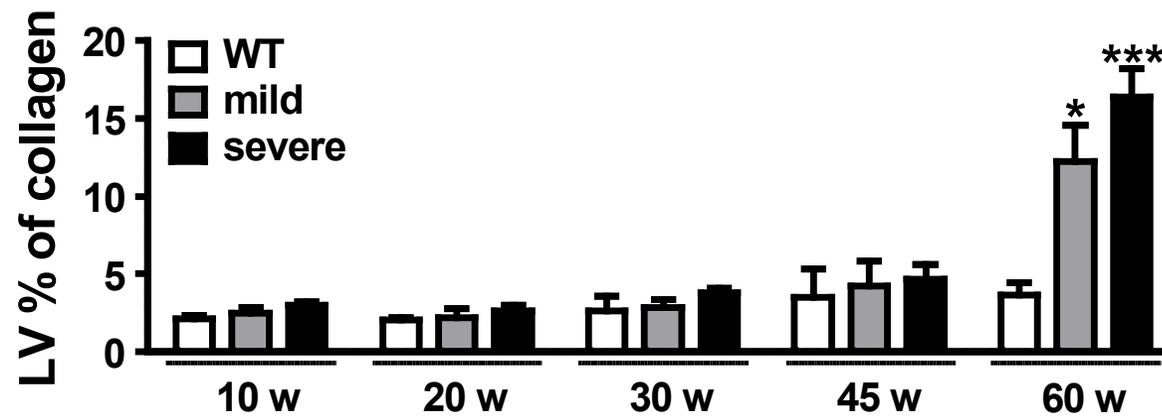
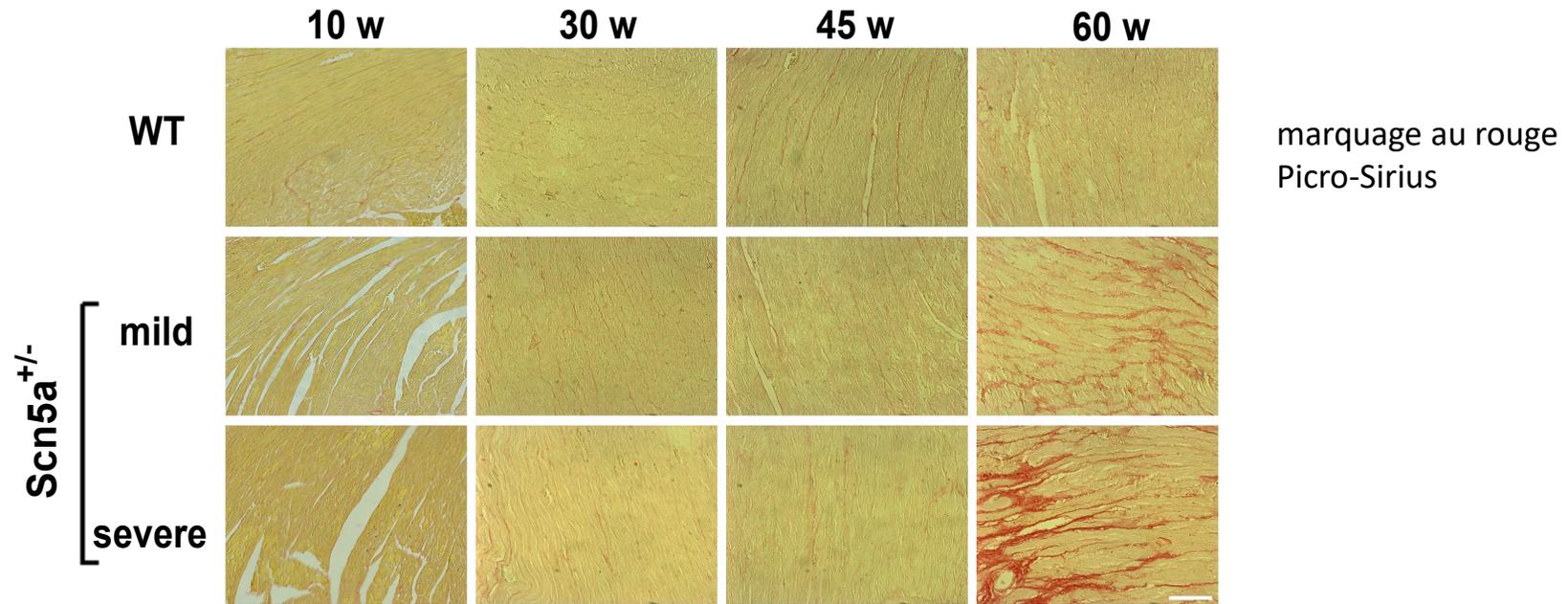
*Scn5a*<sup>+/-</sup>



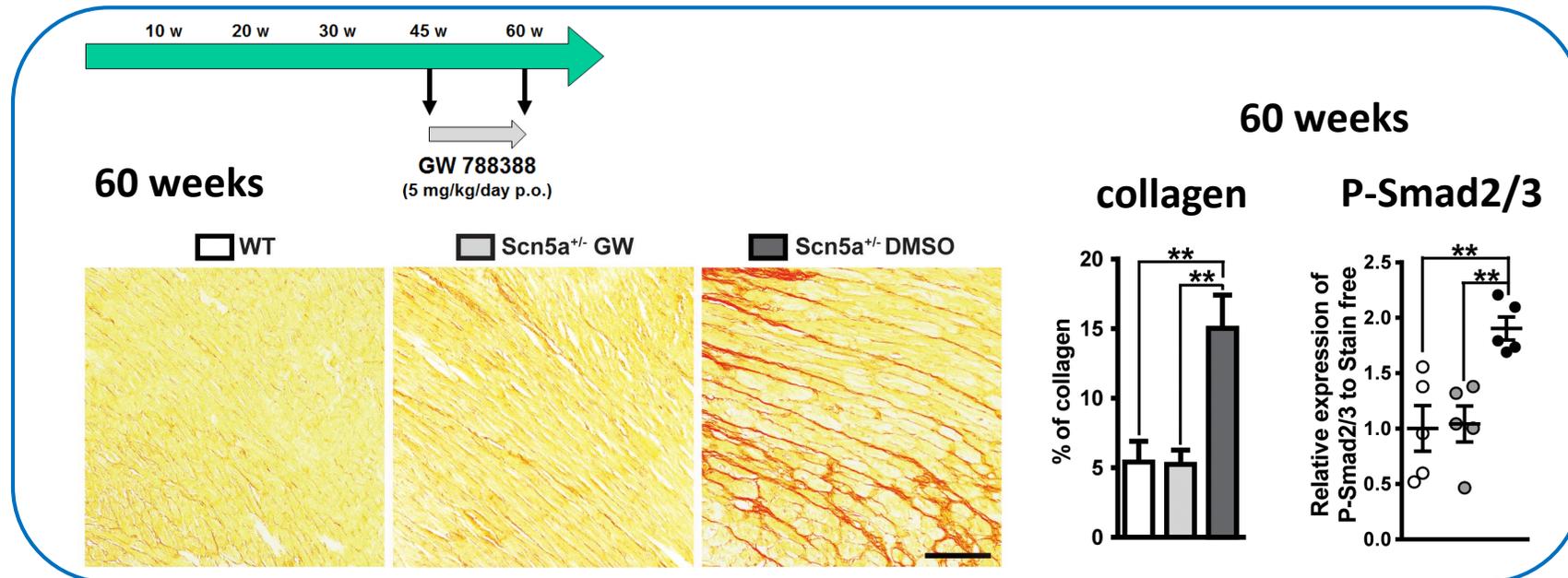
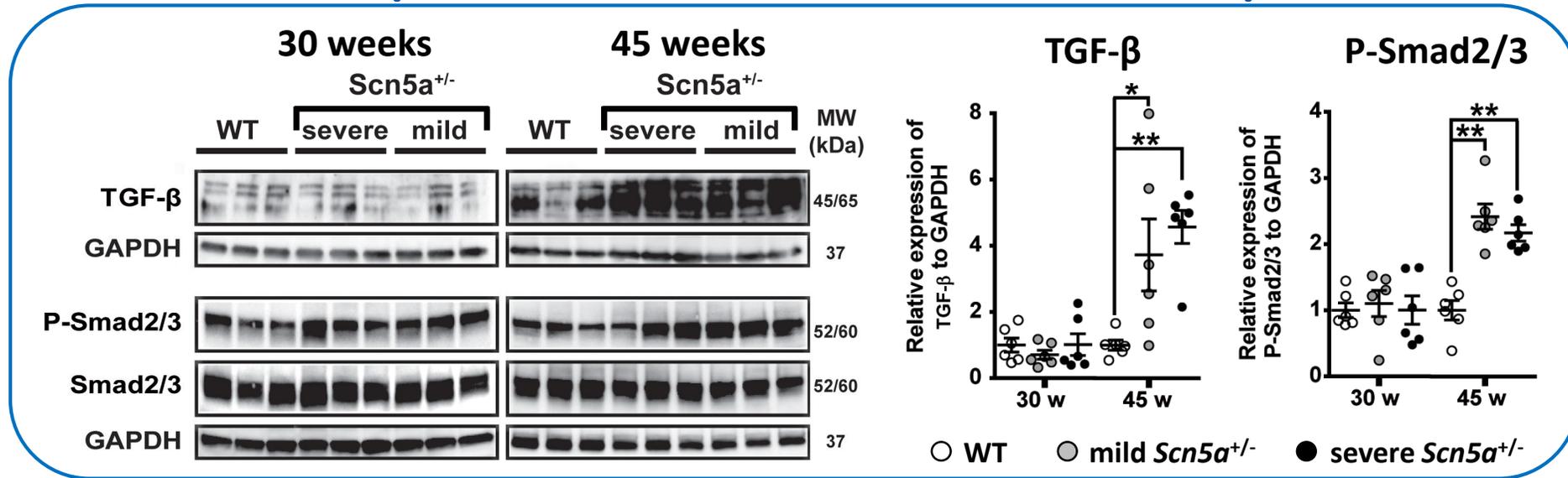
Cartographie électrique :

- 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- $\beta$



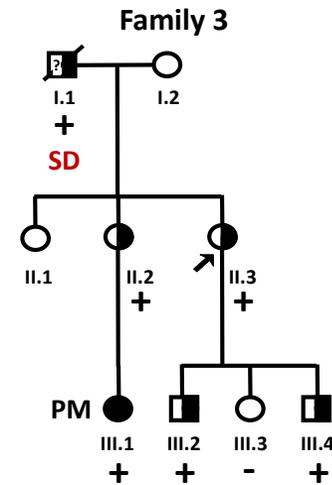
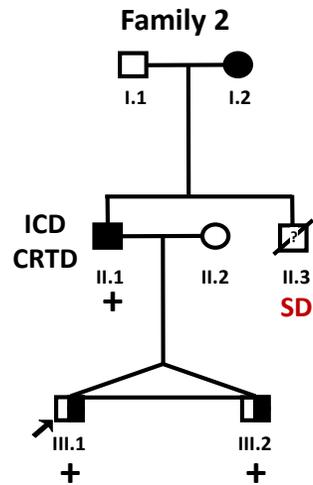
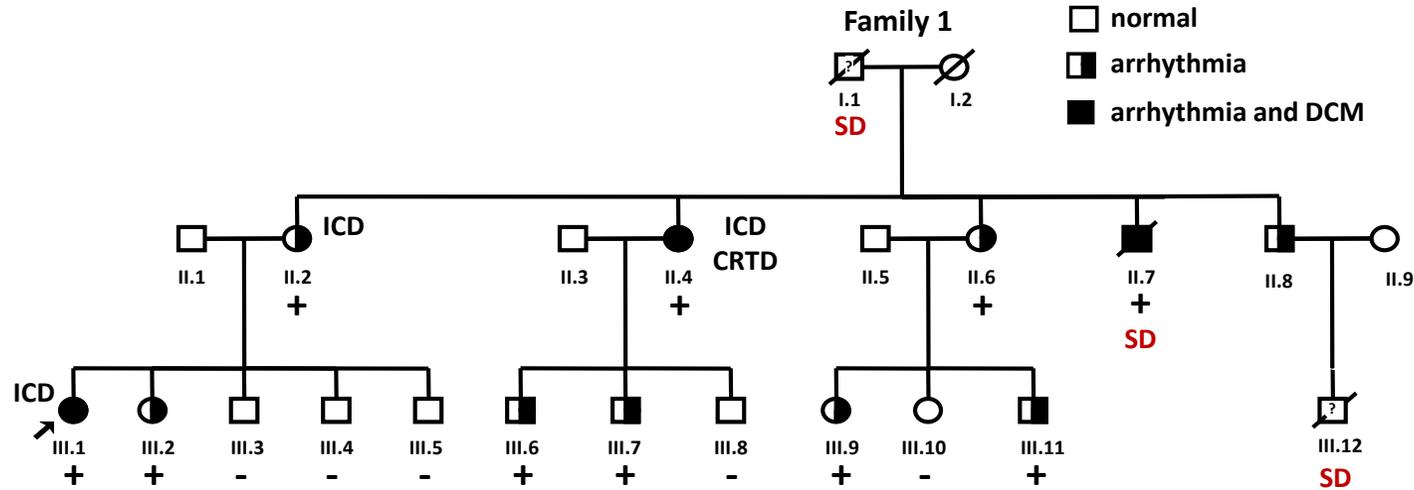
# Conclusion

Les souris *Scn5a*<sup>+/-</sup> représentent un bon modèle des troubles progressifs 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- $\beta$  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.

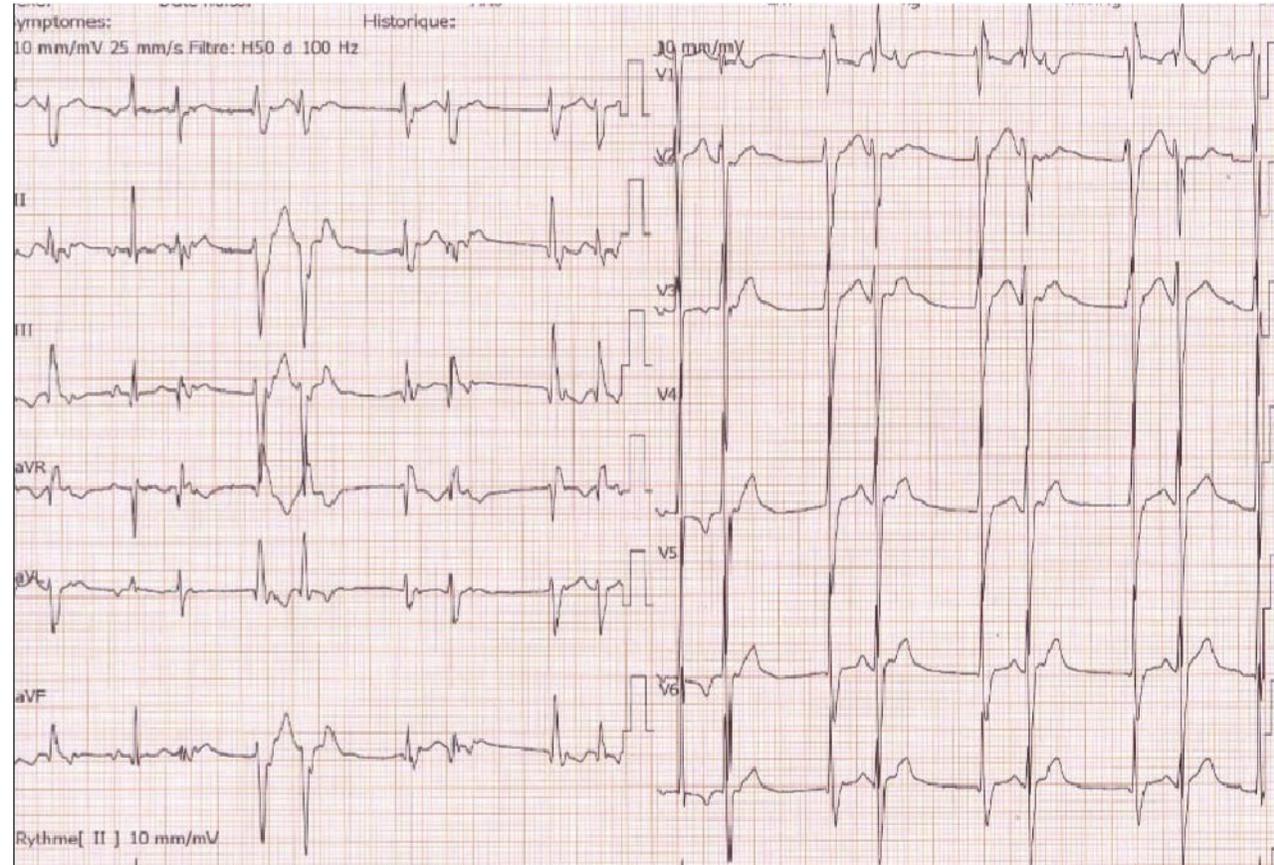
# Multiple Ectopic Purkinje-related Premature Contractions (Tachycardie Ventriculaire Multifocale)



DCM : dilated cardiomyopathy  
 SD : sudden death

# Phénotype du propositus

## Patient III.1 (10 ans)



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

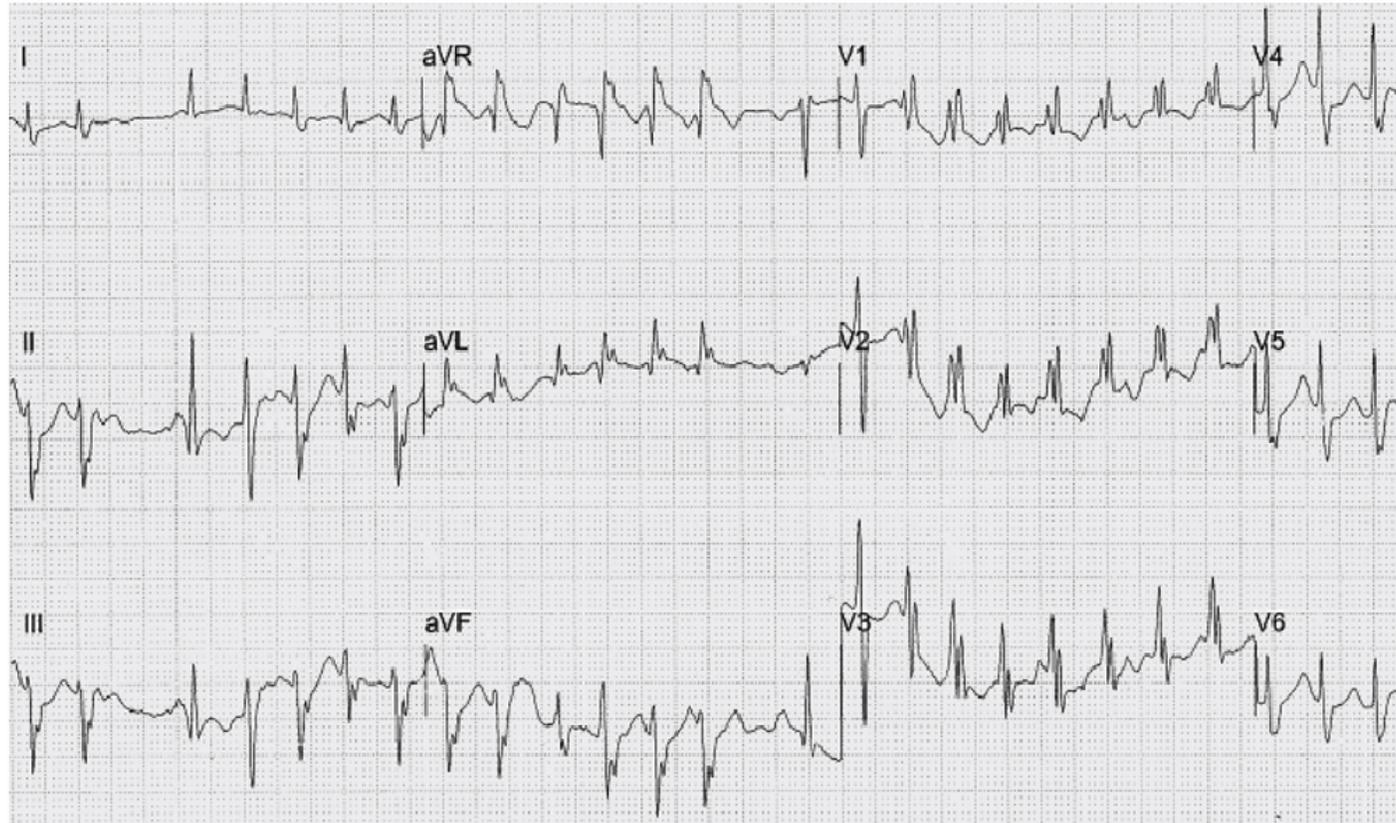
**Enregistrement Holter : >50 000 extrasystoles ventriculaires (ESV) / 24h**

**Exercice sur tapis roulant → disparition des ESV**

**Echocardiographie : dilatation mineure (DDVG = 54 mm, >97<sup>ème</sup> centile) ; FEVG = 62%**

# Phénotype du propositus

**Patient III.1 (13 ans)**

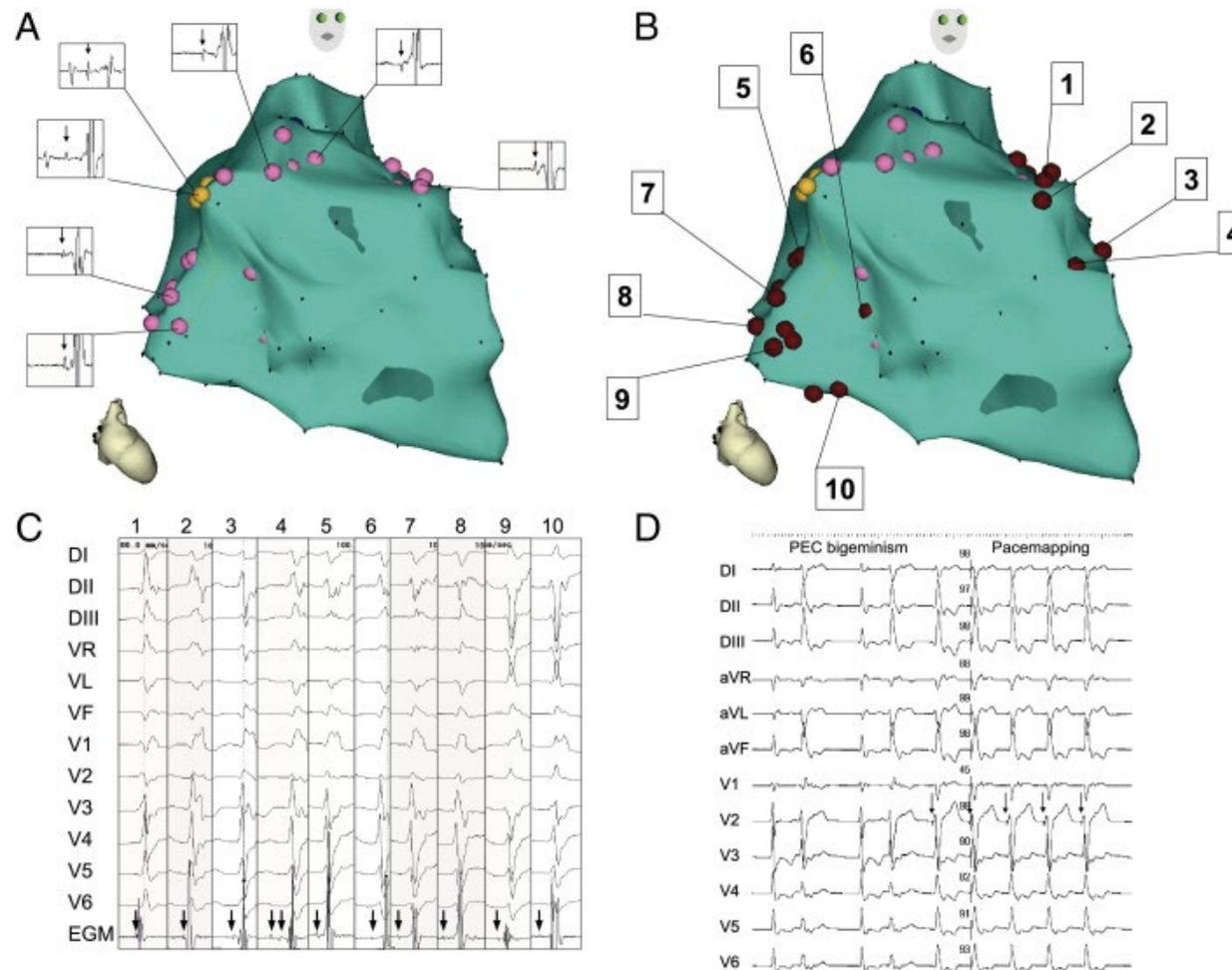


**Pertes de conscience répétitives au repos (concomitantes avec tachycardie ventriculaire non soutenue)**

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

# Phénotype des patients

## Patient II.4

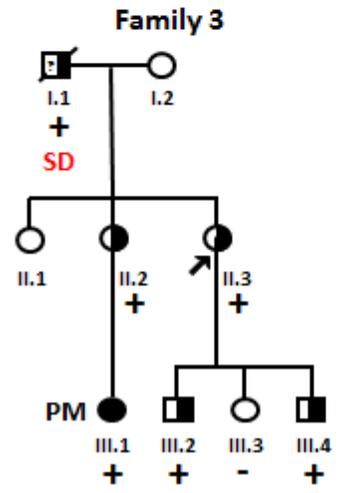
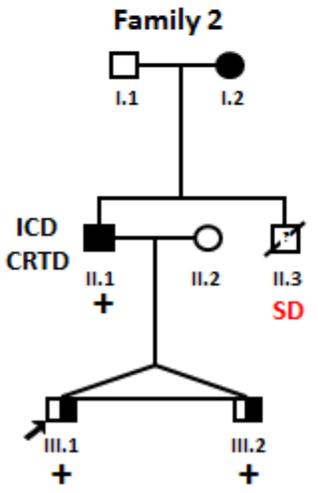
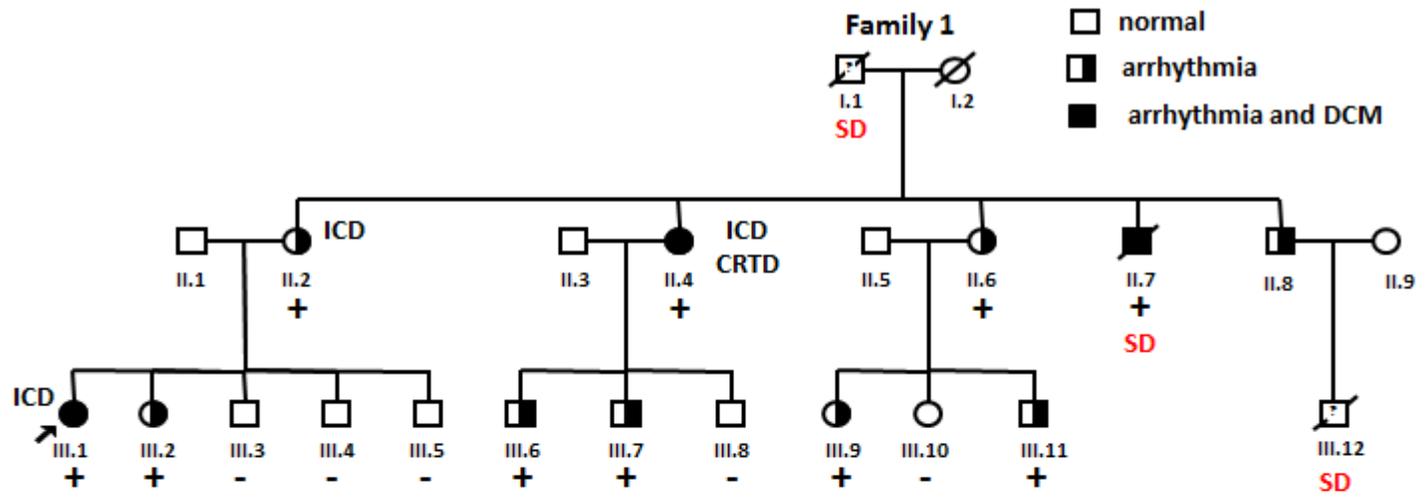


ESV = extrasystole ventriculaire

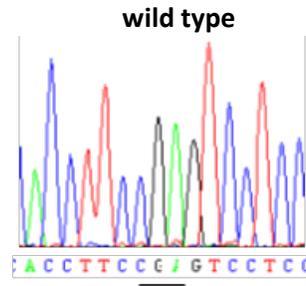
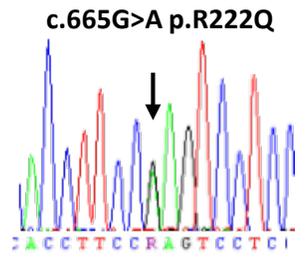
## Patient III.1

- 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

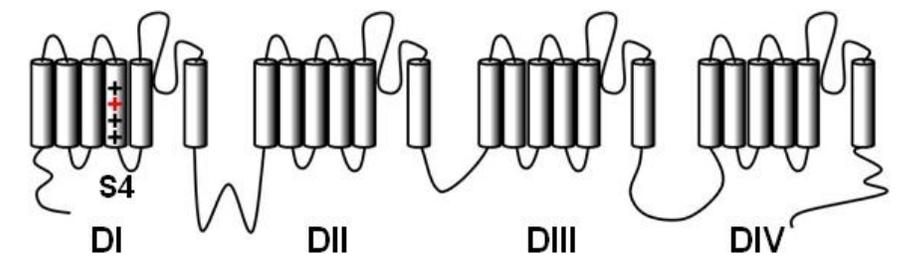
# Identification d'une mutation sur *SCN5A*



+ : R222Q Nav1.5 mutation carriers

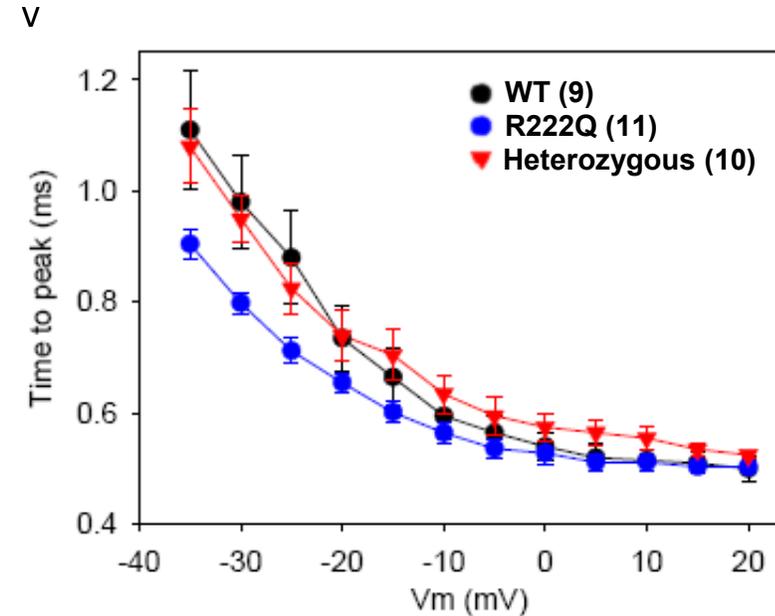
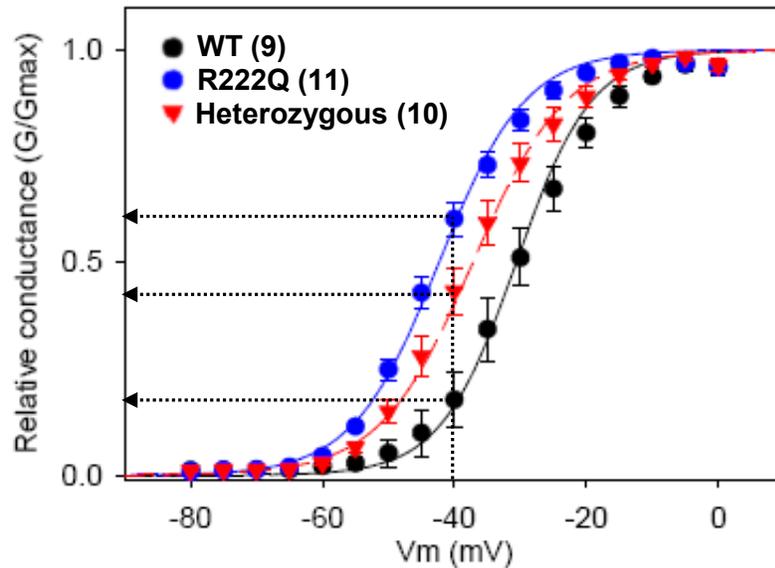
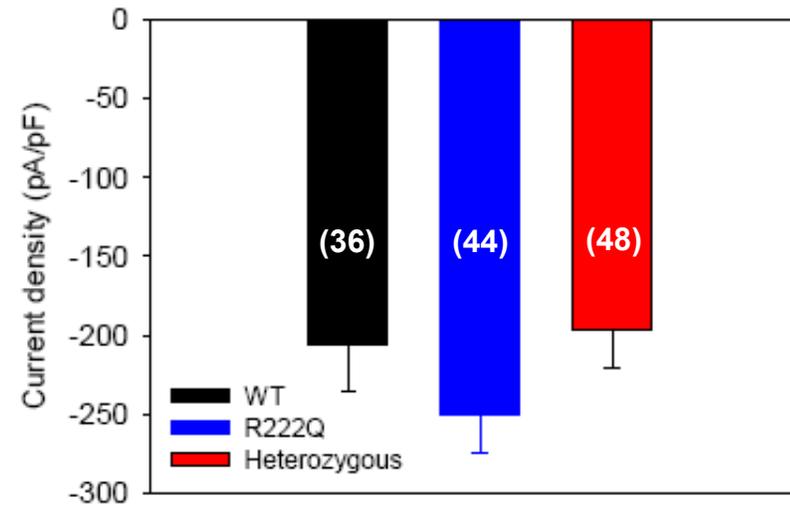
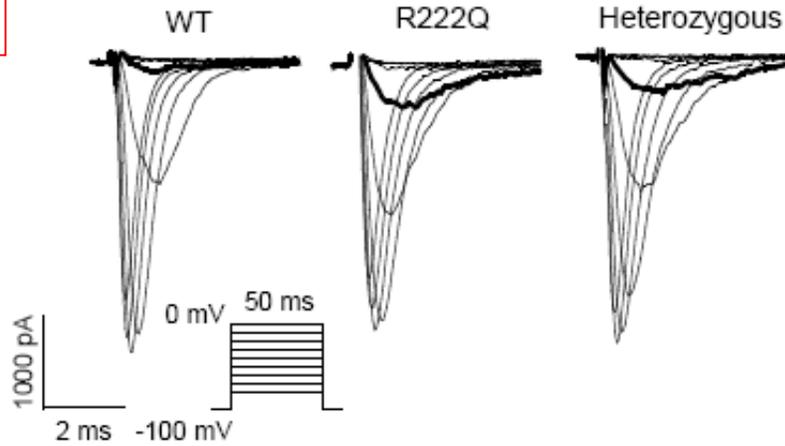
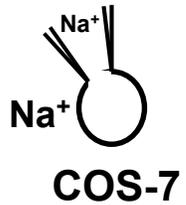


	222
Human	AYTTEFVDLGNVSALR <b>TFR</b> VLRLAKTISVISG
Rat	AYVSENI KLGNLSALR <b>TFR</b> VLRLAKTISVIPG
Mouse	AYVSENI KLGNLSALR <b>TFR</b> VLRLAKTISVIPG
Dog	AYTTEFVDLGNVSALR <b>TFR</b> VLRLAKTISVISG
Zebrafish	AYVTEFVDLGNVSALR <b>TFR</b> VLRLAKTISVIPG

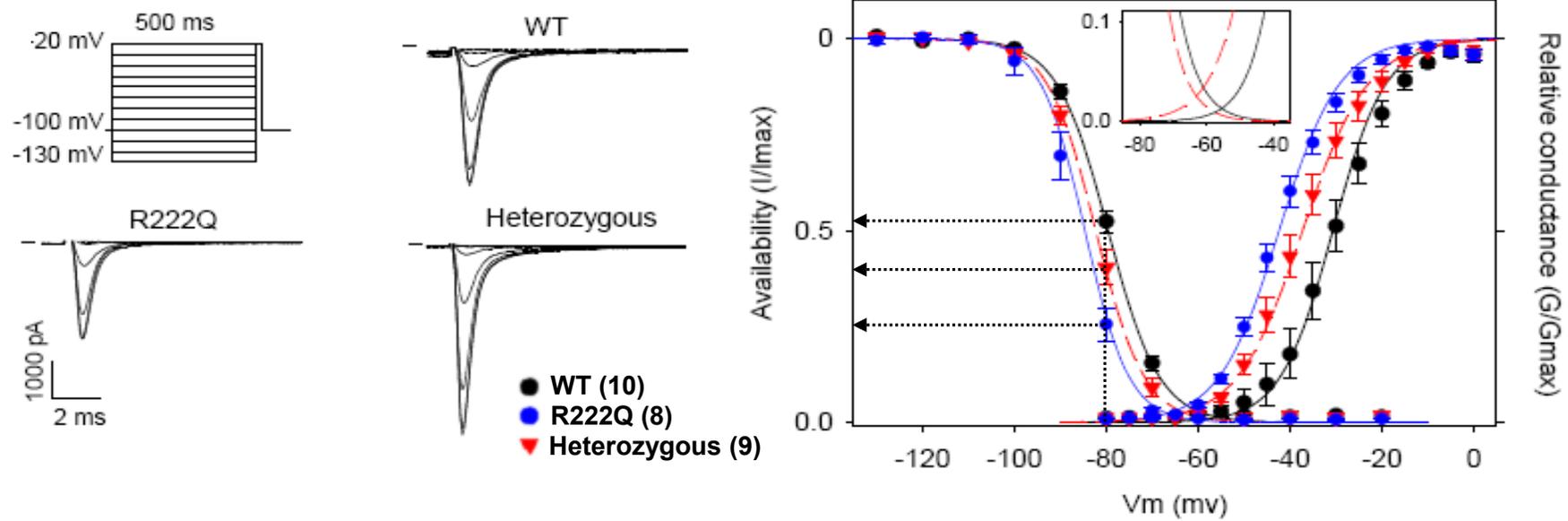


# Conséquences biophysiques de la mutation

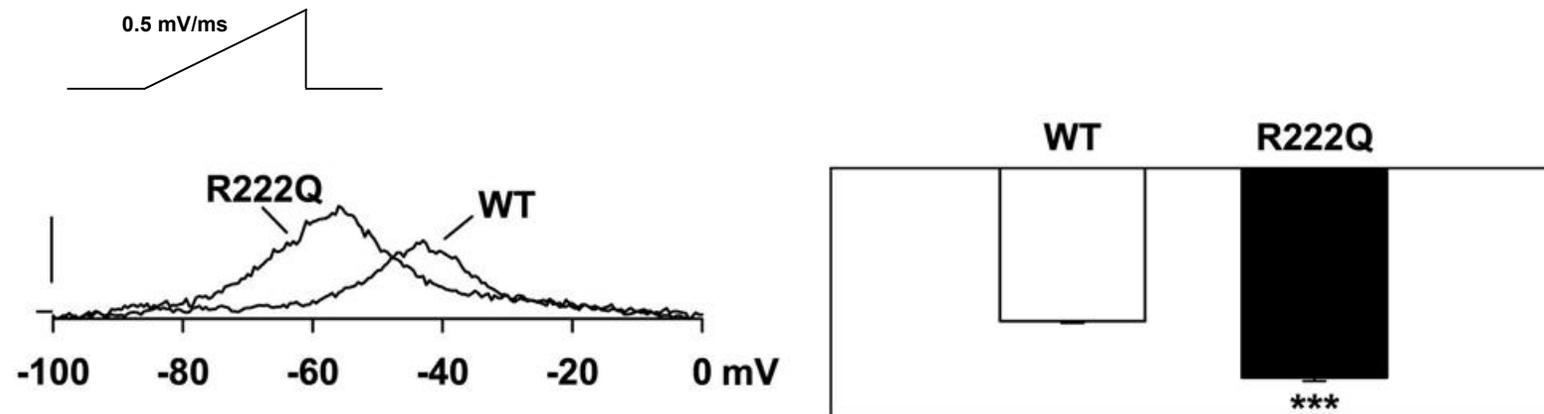
**Na<sub>v</sub>1.5 + Na<sub>v</sub>β1**



# Conséquences biophysiques de la mutation



## Courant de fenêtre $Na^+$ 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
- Déplacement (plus faible) vers des potentiels plus négatifs de la courbe d'inactivation → moins de courant
- Augmentation du courant de fenêtré  $\text{Na}^+$ , déplacé vers des potentiels plus négatifs → courant persistant  
→ effets sur la repolarisation ?
- Accélération des cinétiques d'inactivation → moins de courant

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

# Modélisation mathématique

## IKs current

$$I_{K_S} = G_{K_S} \cdot x_f \cdot x_s \cdot (V - E_K)$$

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

$$G_{K_S} = 0.0281$$

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

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

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

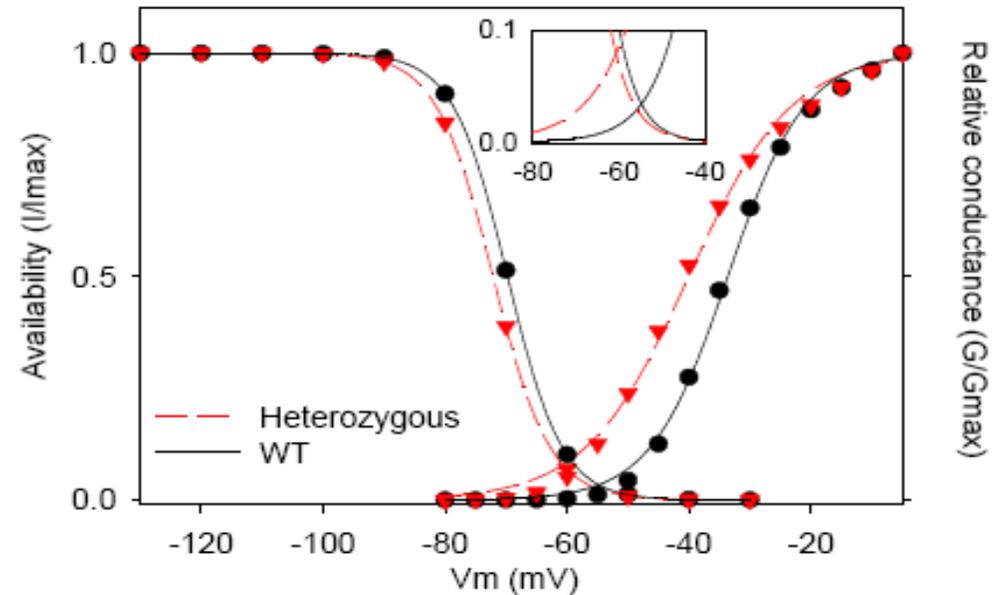
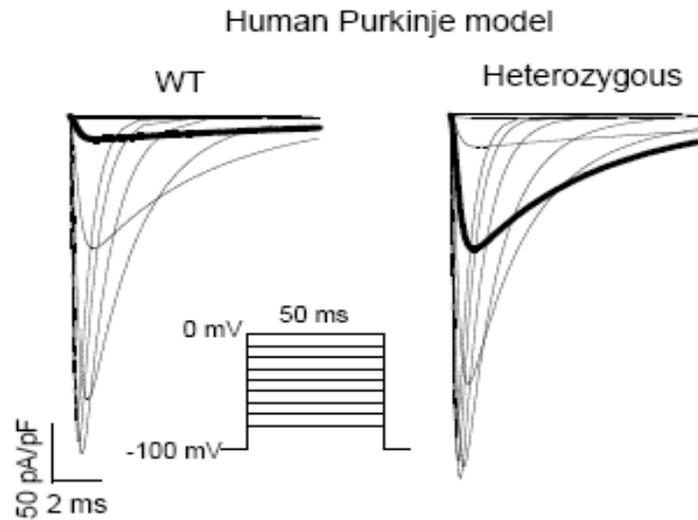
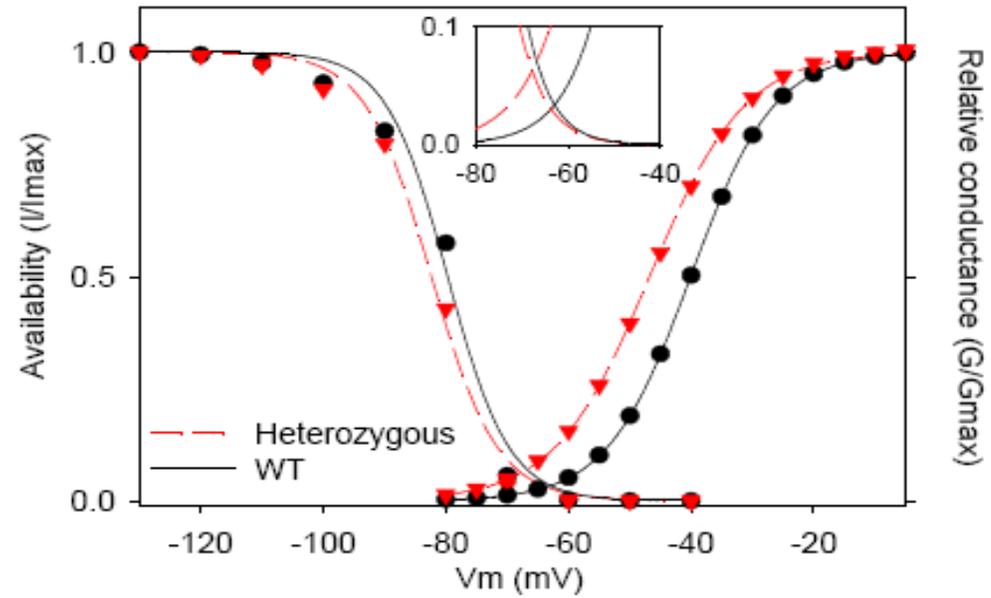
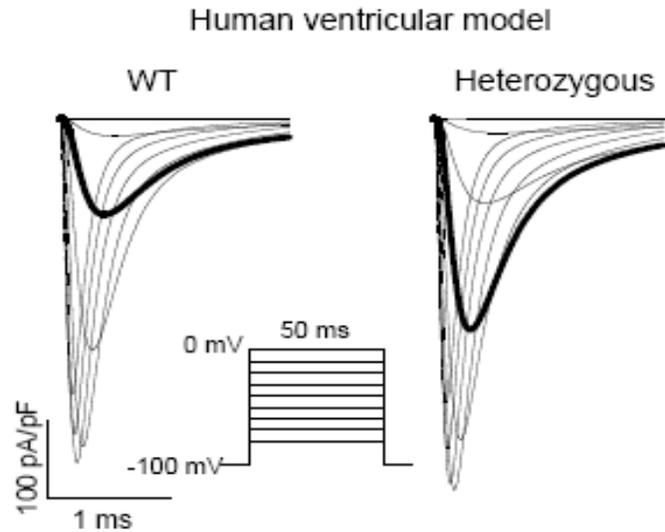
$$\beta_f = k_{\beta_f} \cdot \exp(\lambda_{\beta_f} \cdot V)$$

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

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

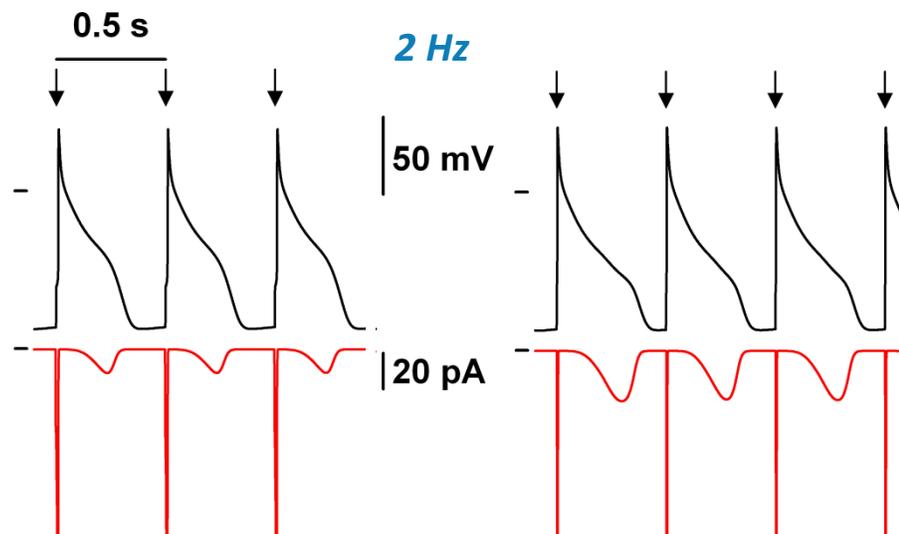
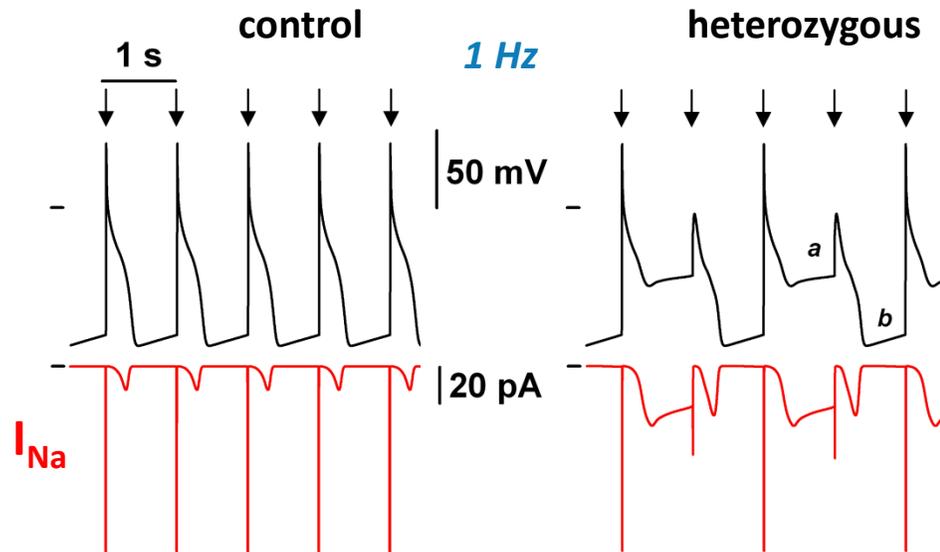
Rate constant	Value
$k_{\alpha_s}$	0.033 msec <sup>-1</sup>
$k_{\beta_s}$	0.0001 msec <sup>-1</sup>
$\lambda_{\alpha_s}$	0.130 mV <sup>-1</sup>
$\lambda_{\beta_s}$	-0.015 mV <sup>-1</sup>
$V_{is}$	-11 mV
$k_{\alpha_f}$	0.146 msec <sup>-1</sup>
$k_{\beta_f}$	0.00091 msec <sup>-1</sup>
$\lambda_{\alpha_f}$	0.078 mV <sup>-1</sup>
$\lambda_{\beta_f}$	-0.028 mV <sup>-1</sup>

# Modélisation mathématique

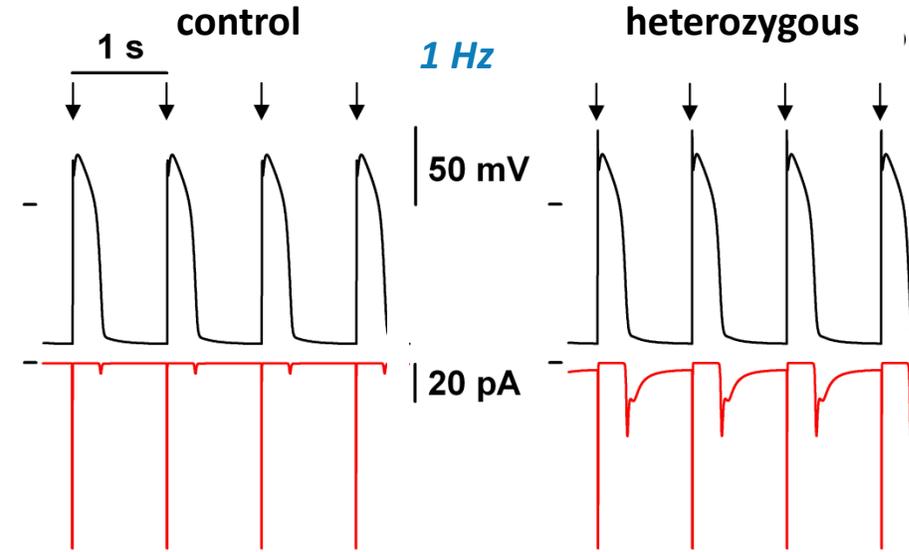


# Potentiels d'action des modèles unicellulaires

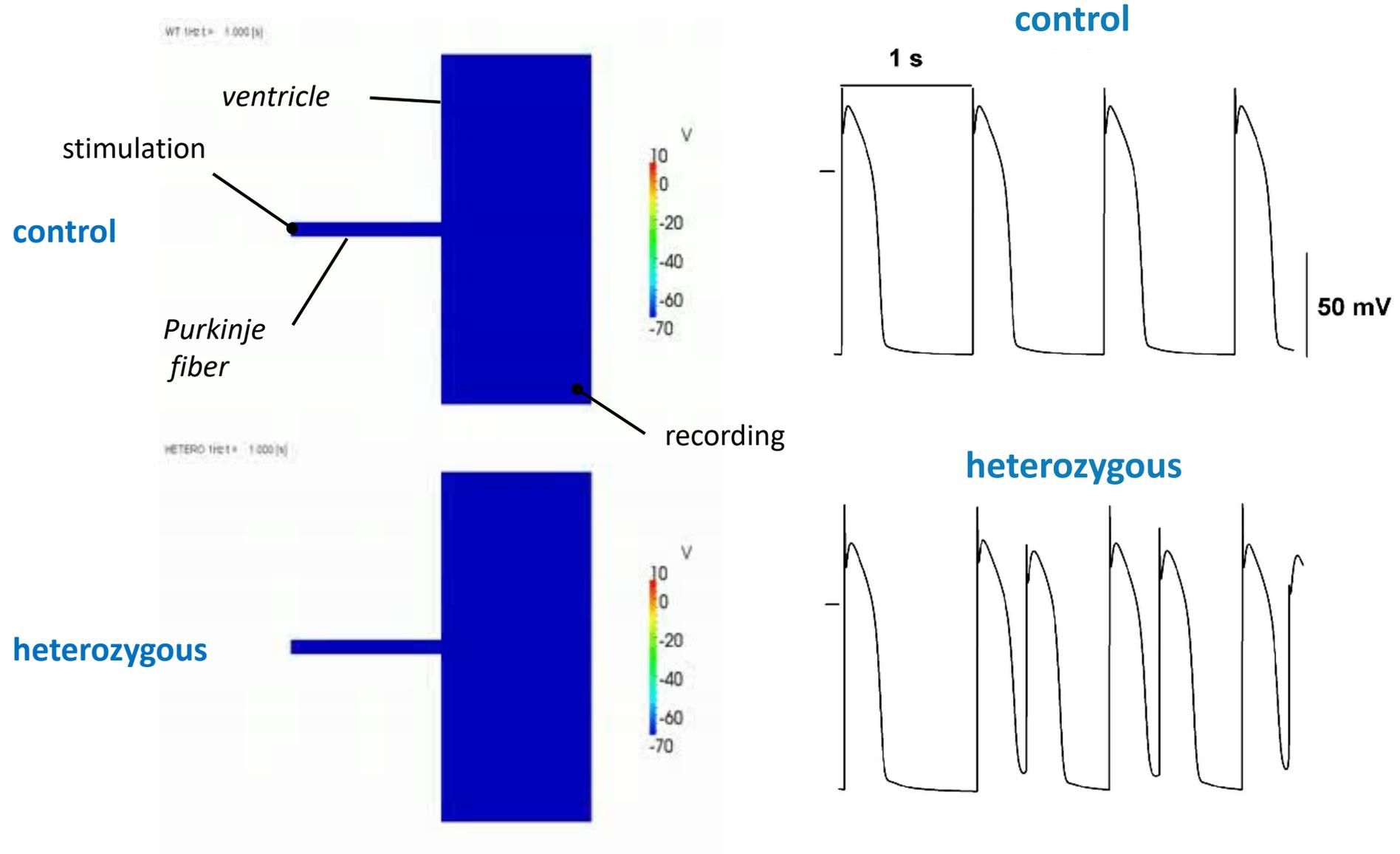
## Purkinje cell



## Left ventricular cell



# Modèle multicellulaire



# Conclusion

**La mutation p.R222Q de *SCN5A* induit :**

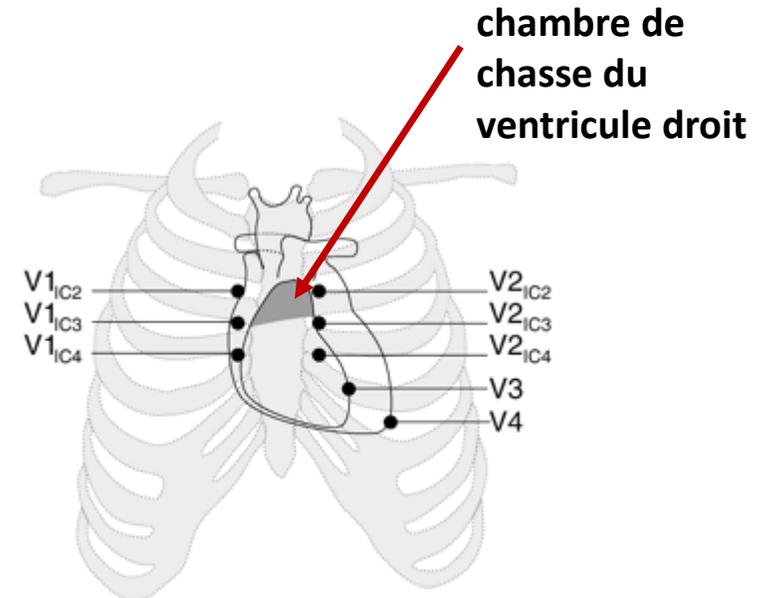
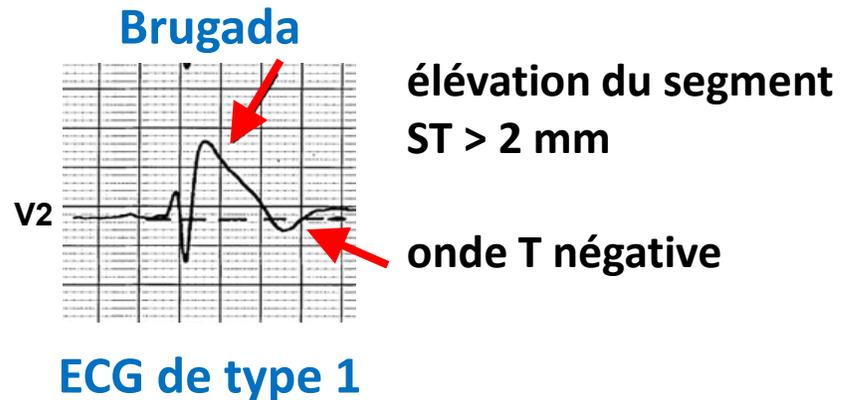
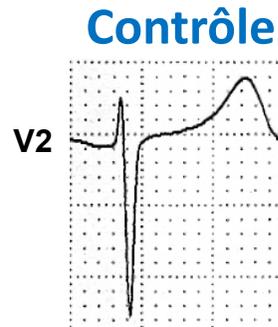
- **une accélération des cinétiques d'activation et d'inactivation de  $I_{Na}$**
- **une augmentation et un déplacement vers des potentiels plus négatifs du courant de fenêtre sodique**

**Relations genotype-phénotype :**

- **la mutation p.R222Q-*SCN5A* affecte peu l'activité électrique du myocarde ventriculaire**
- **la mutation p.R222Q-*SCN5A* 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**

# 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 dérives 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
- phénotopies fréquentes

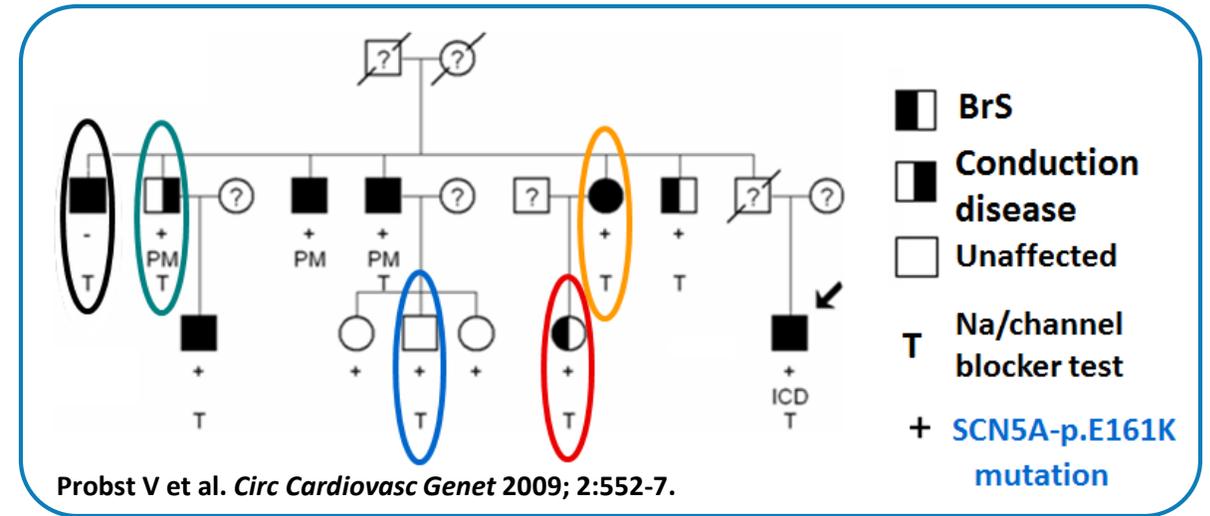


Table 1 Burden tests results for 45 genes linked to cardiac arrhythmias

Gene	BrS cases (n = 167)	Internal controls (n = 167)	P-value 1	UK10K controls (n = 881)	P-value 2
<b>BrS-susceptibility genes</b>					
SCN5A	20.4% (34)	2.4% (4)	$1.4 \times 10^{-7a}$	2.4% (21)	$1.7 \times 10^{-15a}$
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)			

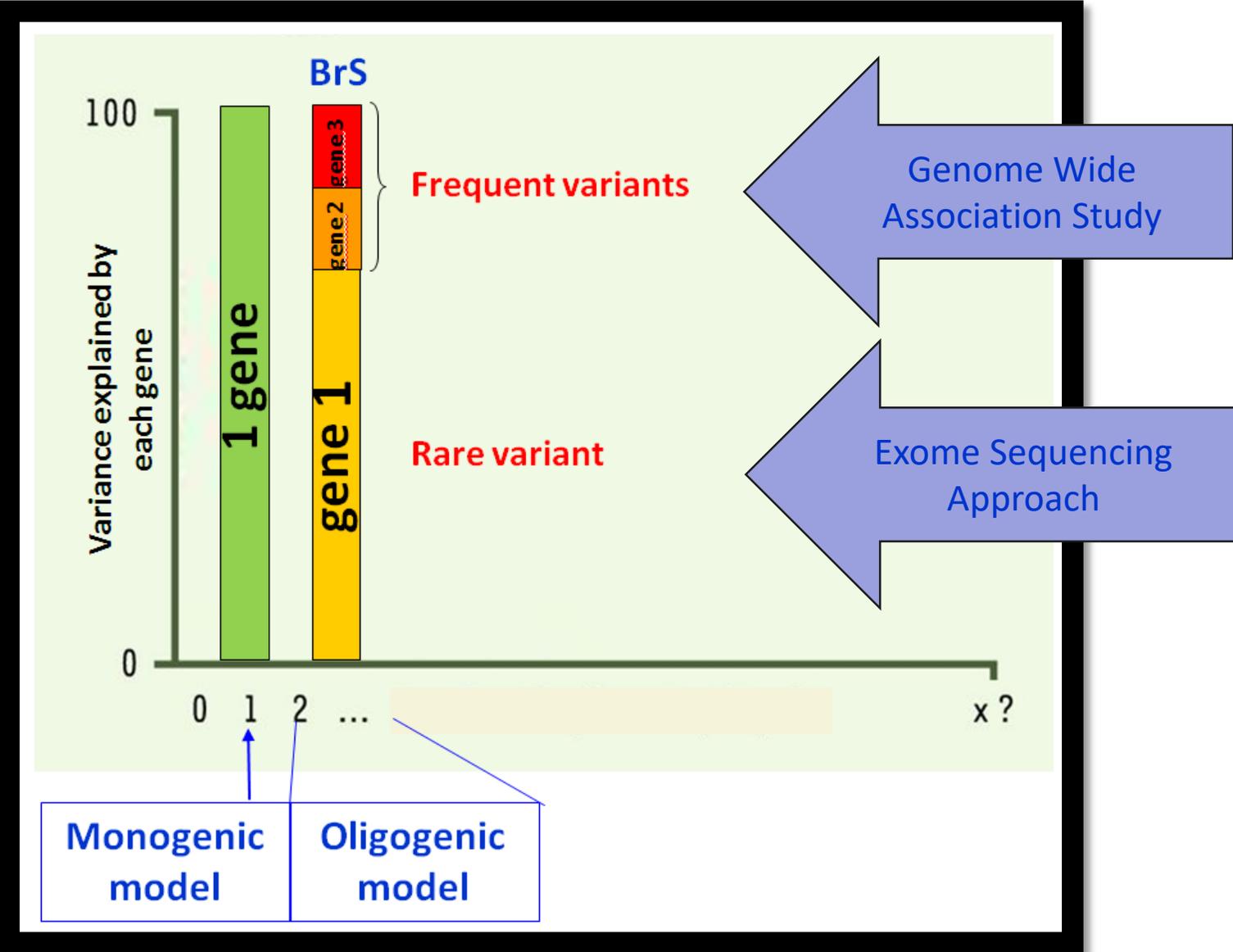
**A** Nav<sub>v</sub>1.5 (*SCN5A*)

**Cases** (red arrows): R179Ter, V240M, E312K, G335S, H369K, R376H, H397Y, H445D, R475K, G615E, M704T, M734V, A735V, G752R, L839P, F853LfsTer16, R893H, D1041N, R1232W, c.3963+2T>C (c2), E1360C, F1382I, V1405M (x2), G1408R, A1418E, R1512W, V1525M, R1589C, R1632C, I1660S, G1661R, D1690del, N1722D, L1722WfsTer15, E1780G.

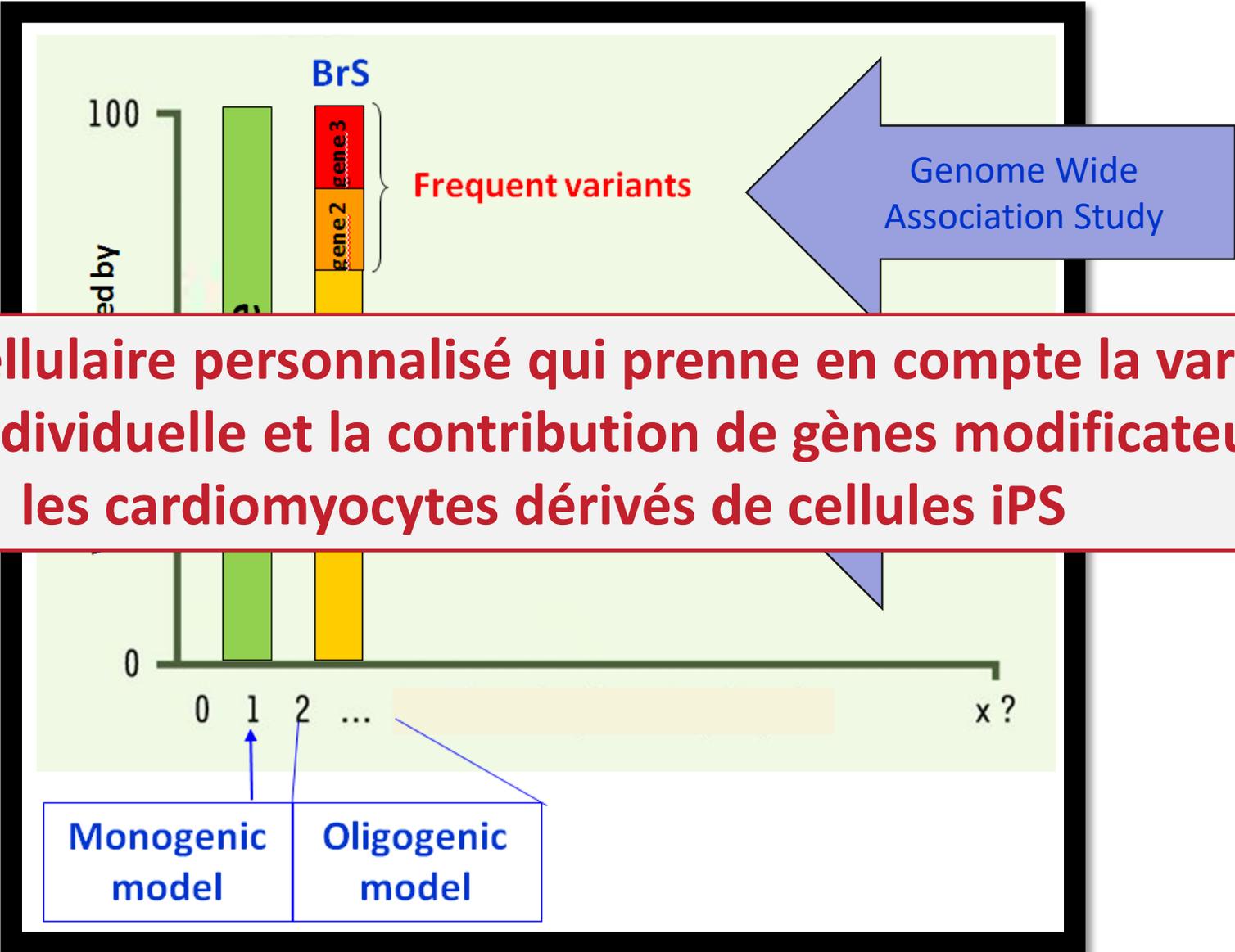
**Controls** (blue arrows): E25K, G527R, C597Y, V177M.

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

# Le syndrome de Brugada : une maladie oligogénique



# Le syndrome de Brugada : une maladie oligogénique



# Cellules souches pluripotentes induites (cellules iPS)

2007



## Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors

Kazutoshi Takahashi,<sup>1</sup> Koji Tanabe,<sup>1</sup> Mari Ohnuki,<sup>1</sup> Megumi Narita,<sup>1,2</sup> Tomoko Ichisaka,<sup>1,2</sup> Kiichiro Tomoda,<sup>3</sup> and Shinya Yamanaka<sup>1,2,3,4,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Stem Cell Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

<sup>2</sup>CREST, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi 332-0012, Japan

<sup>3</sup>Gladstone Institute of Cardiovascular Disease, San Francisco, CA 94158, USA

<sup>4</sup>Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

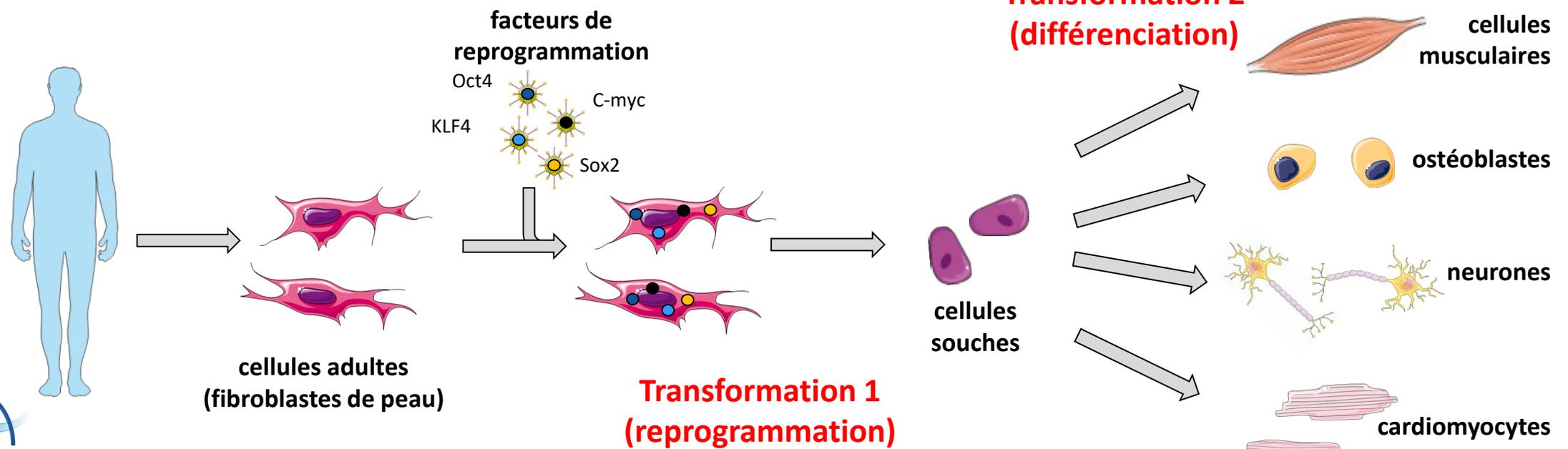
\*Correspondence: yamanaka@frontier.kyoto-u.ac.jp

DOI 10.1016/j.cell.2007.11.019



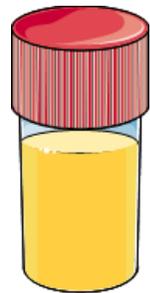
Shinya Yamanaka

Prix Nobel de médecine 2012



# Cardiomyocytes dérivés de cellules iPS humaines

Sang

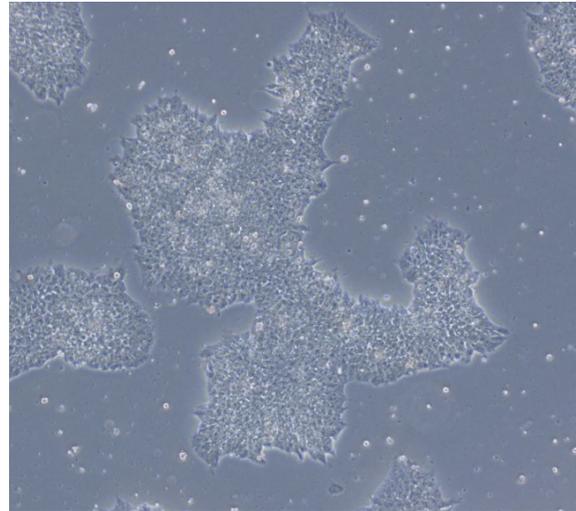


Urine

reprogrammation



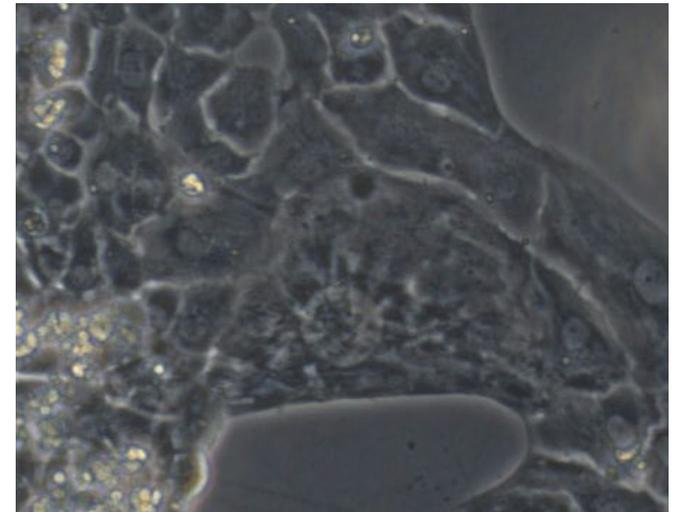
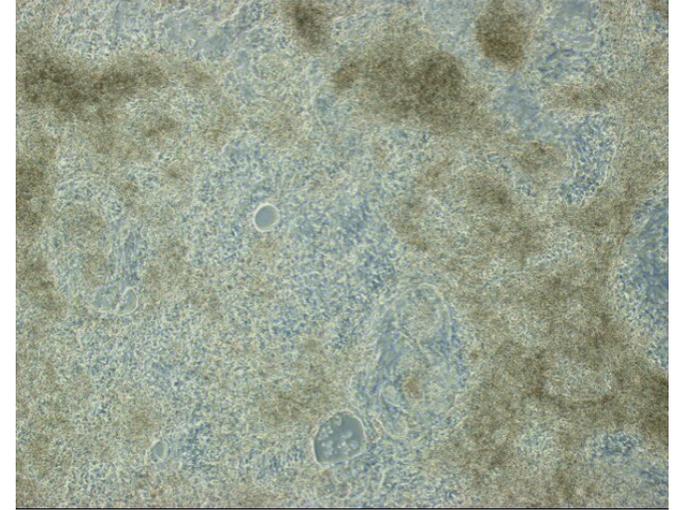
Cellules iPS humaines



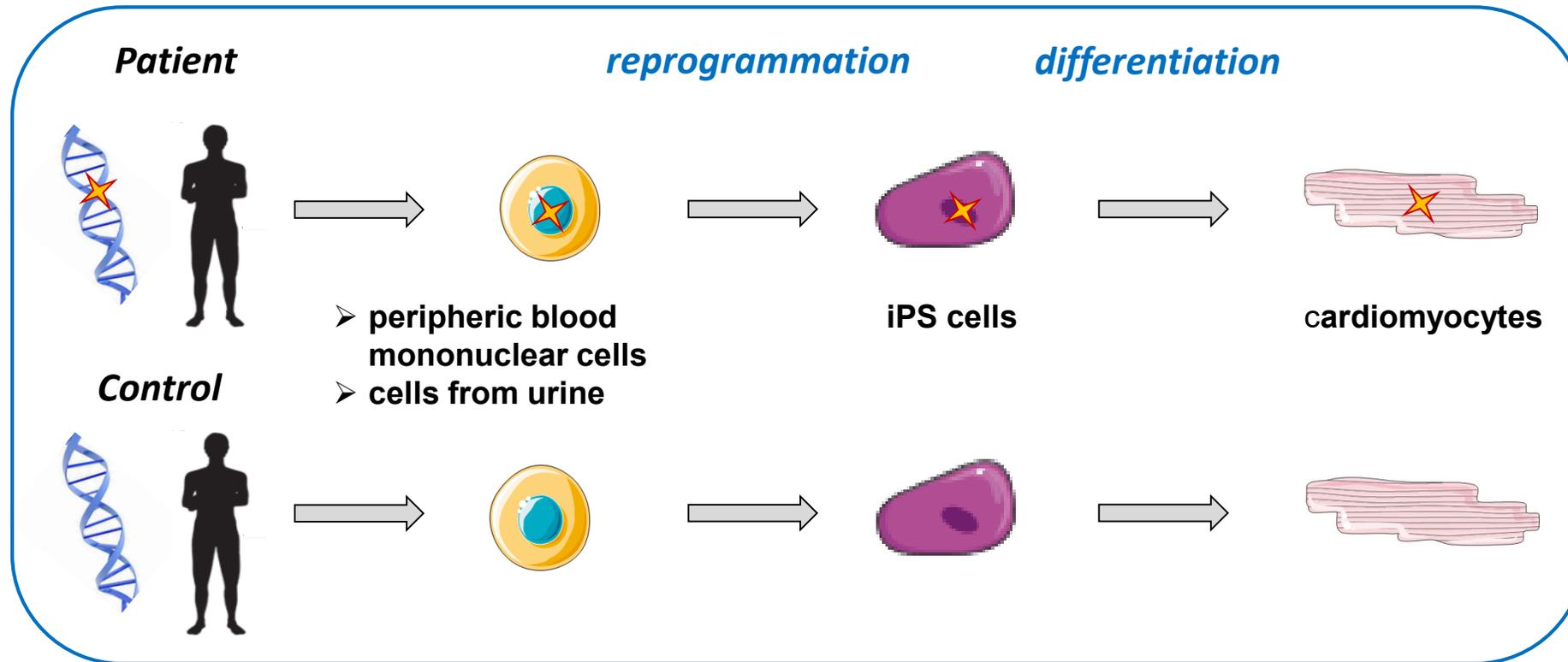
différenciation



Cardiomyocytes dérivés d'iPS

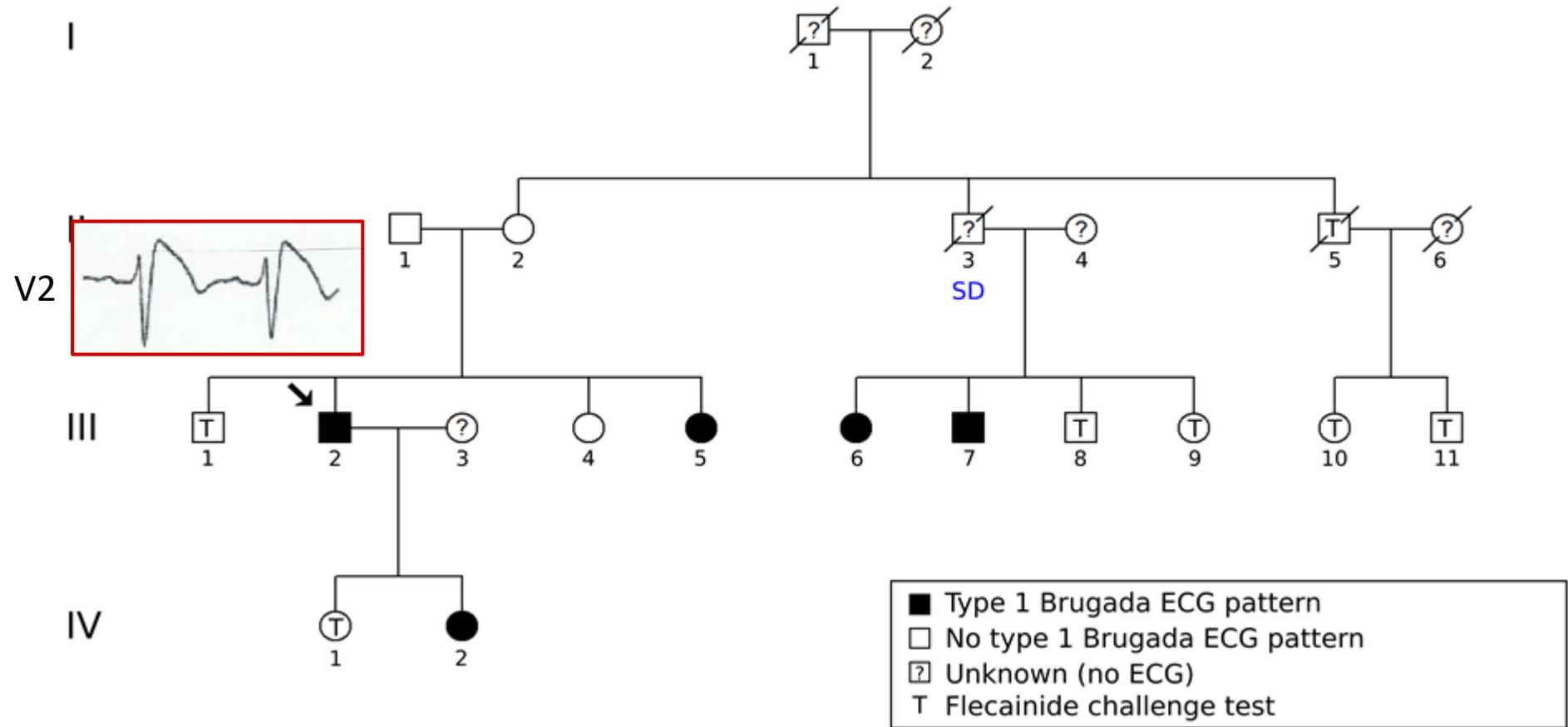


# Les cellules iPS : des modèles personnalisés de canalopathies



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

# Une forme familiale du syndrome de Brugada

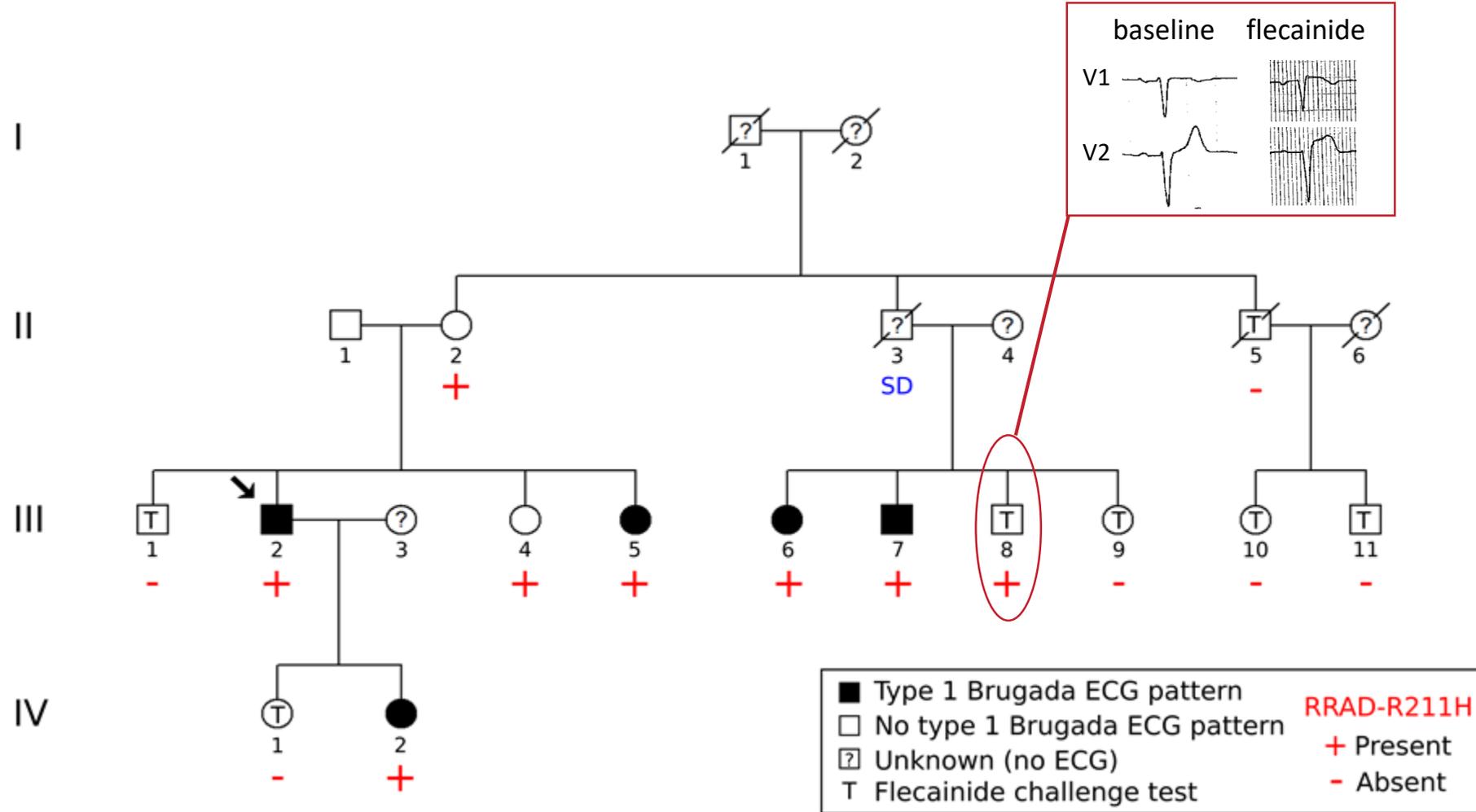


# Un nouveau gène impliqué dans le syndrome de Brugada : *RRAD*



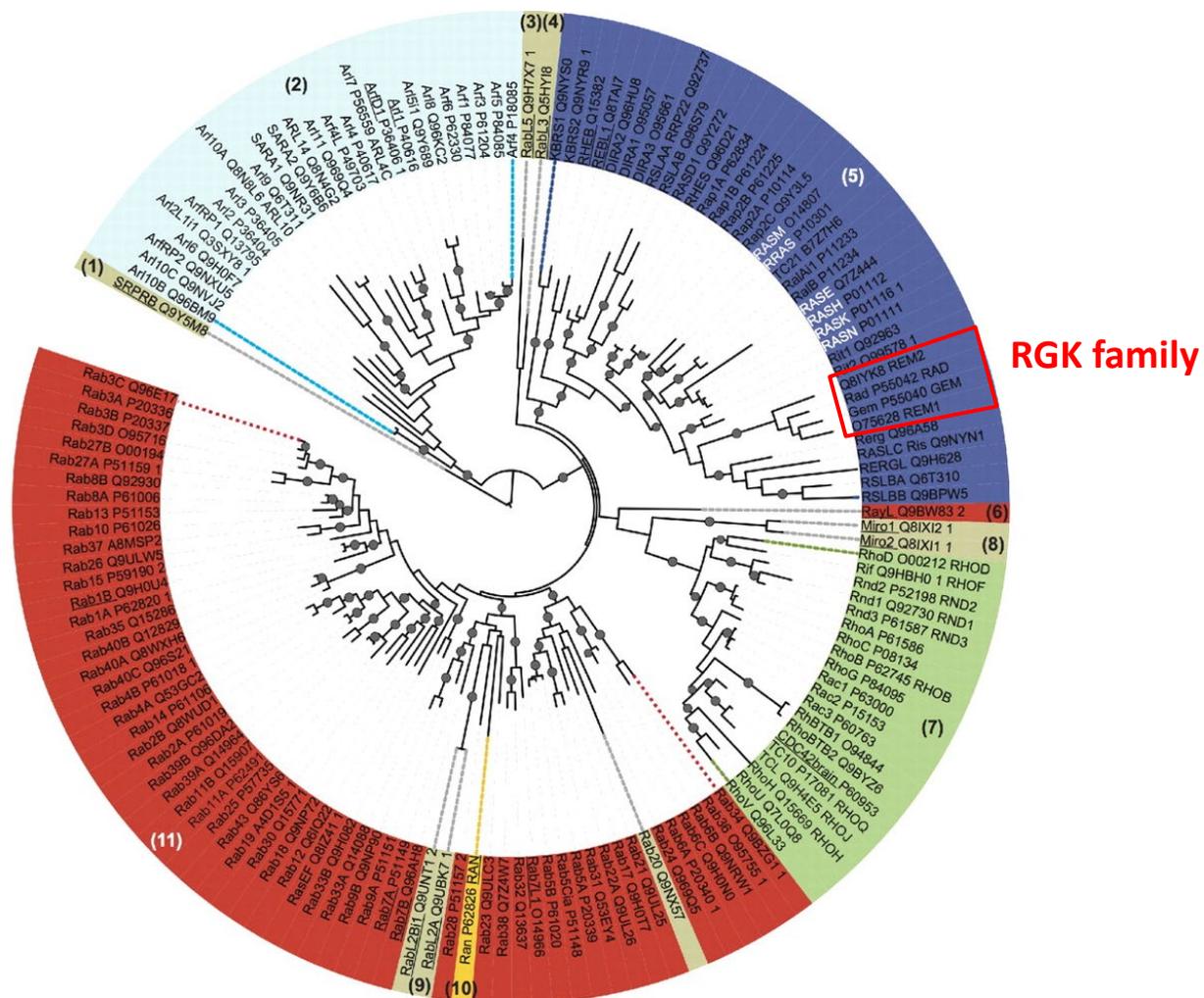
	Exome sequencing (patient III:2)
<b>Coding +/- 8 bp*</b>	22,562
<b>Functional**</b>	10,412
<b>Rare in ExAC***</b>	217
<b>In shared genomic regions</b>	9
<b>Validated and shared by the 5 BrS patients</b>	6 missense variants ( <i>RRAD</i> , <i>FHOD1</i> , <i>H6PD</i> , <i>SNAP23</i> , two in <i>SPTBN5</i> )
<b>Predicted deleterious (SIFT and PolyPhen)</b>	<b><i>RRAD</i> (R211H)</b>

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



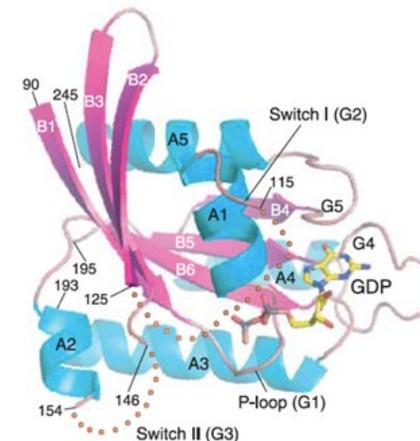
+ 3 mutations non-sens additionnelles chez 3/186 patients avec syndrome de Brugada non liés à la famille

# La GTPase Rad (Ras Associated with Diabetes)

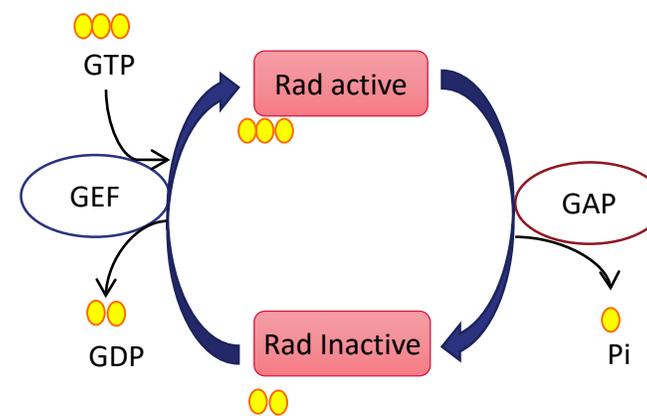


## Famille RGK Rad

- Gem
- Rem
- Rem2

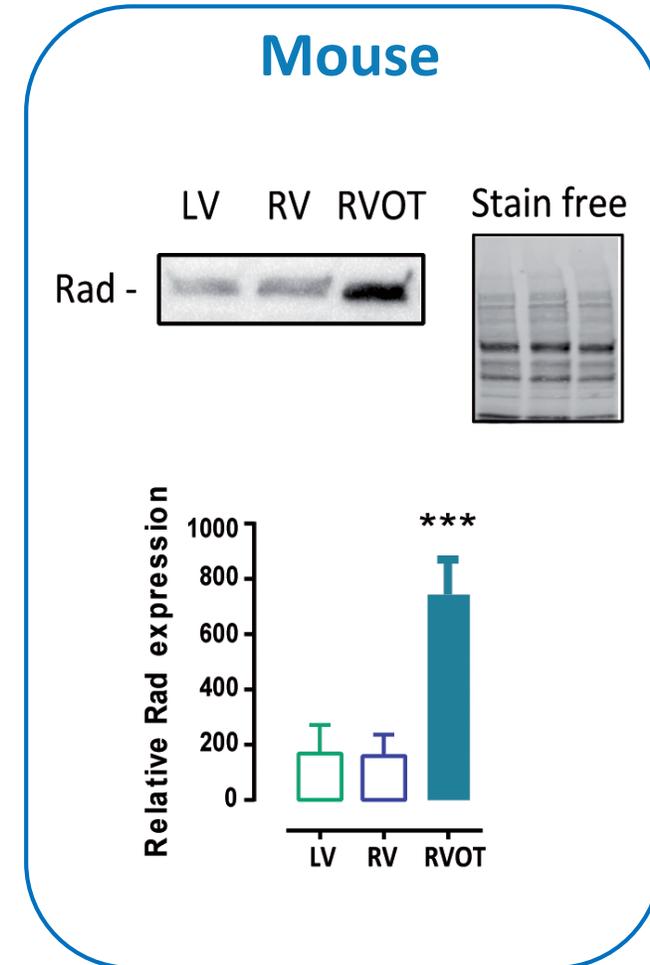
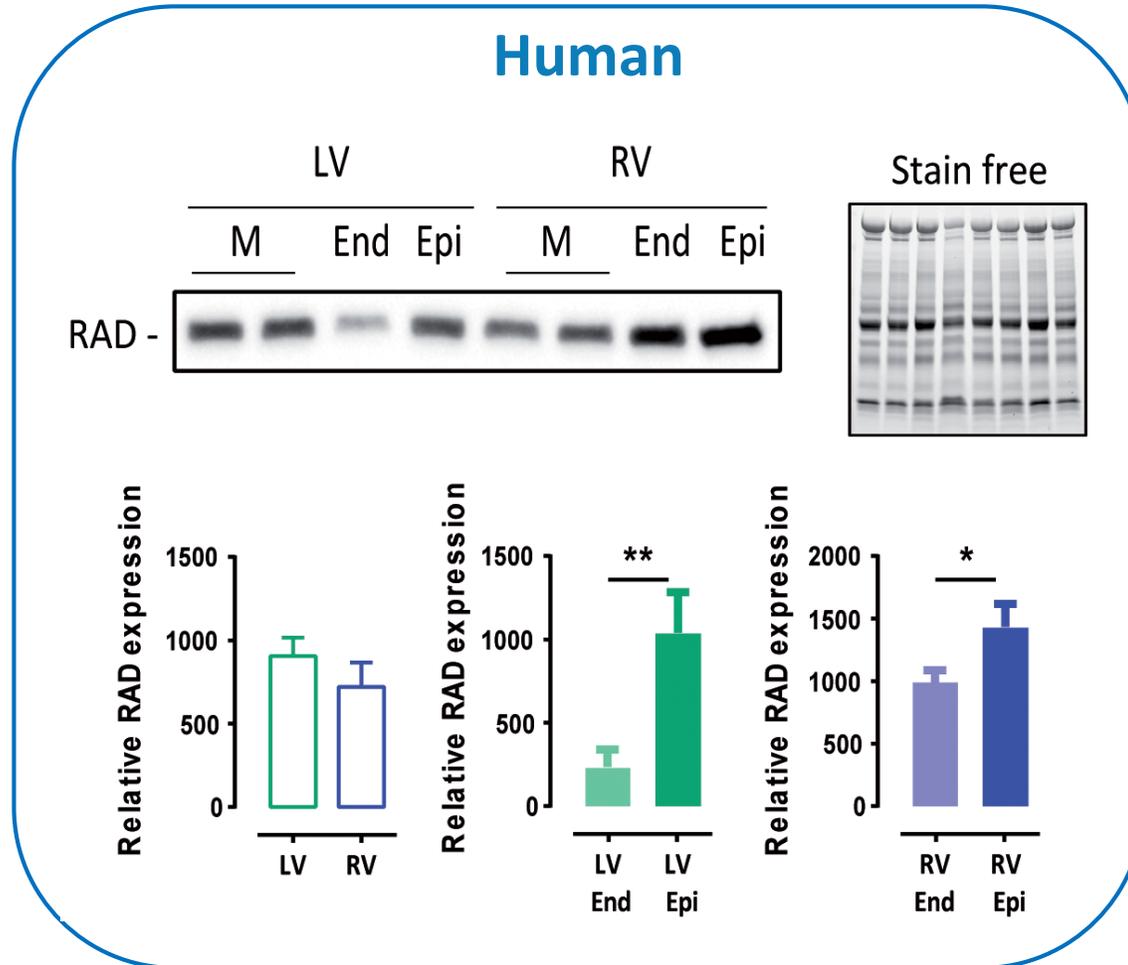


## Activité GTPasique de Rad





# Expression cardiaque de la GTPase Rad

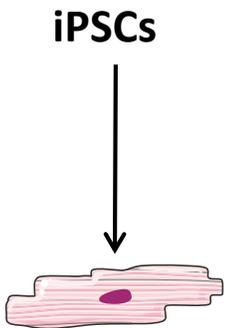
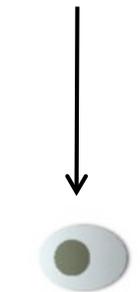
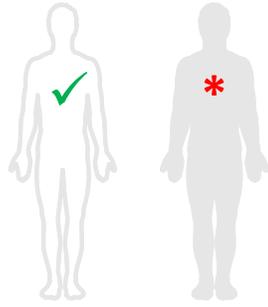


LV: left ventricle; RV: right ventricle  
 End: subendomyocardium; Epi: subepicardium;  
 M: midmyocardium

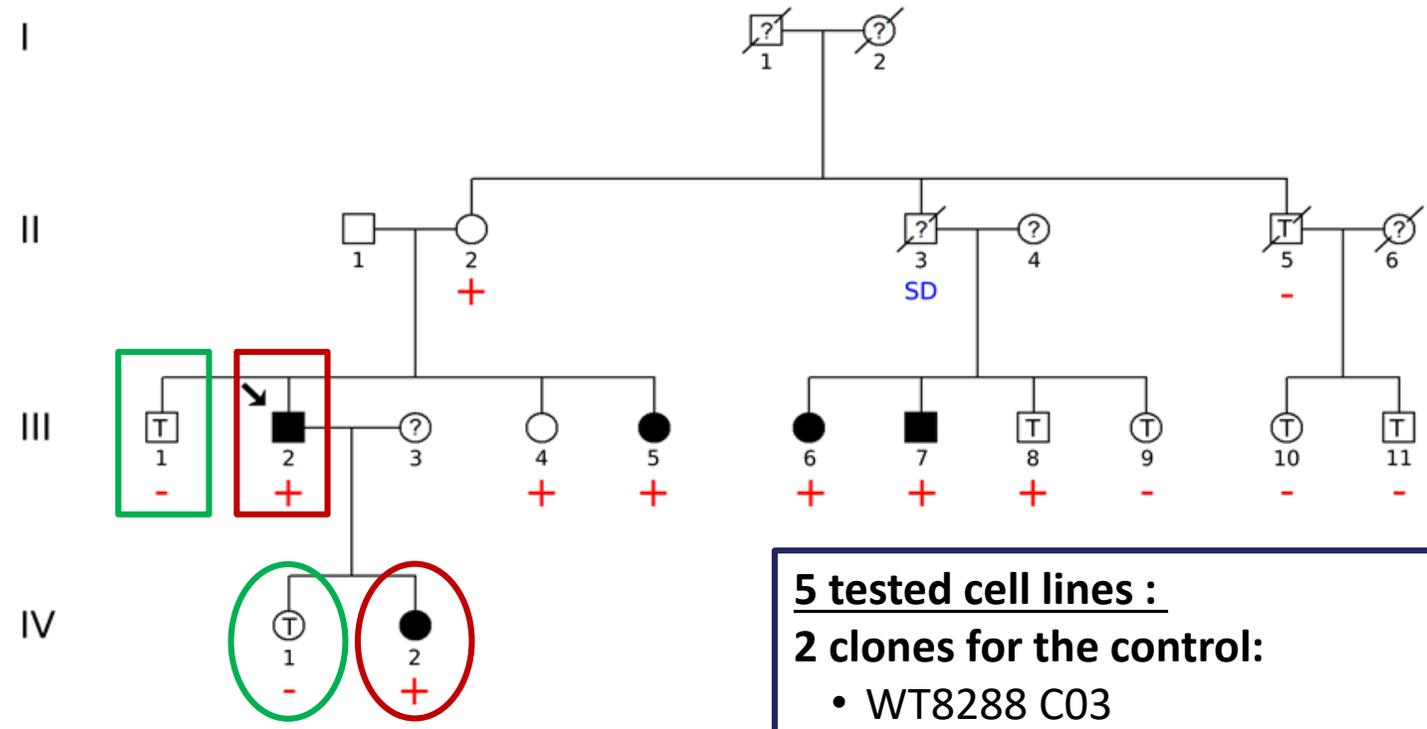
RVOT: right ventricular outflow tract

# Sélection des individus pour la différenciation des cellules iPS

Ctl1 BrS1



Cardiomyocytes (iPSC-CM)



**5 tested cell lines :**  
**2 clones for the control:**

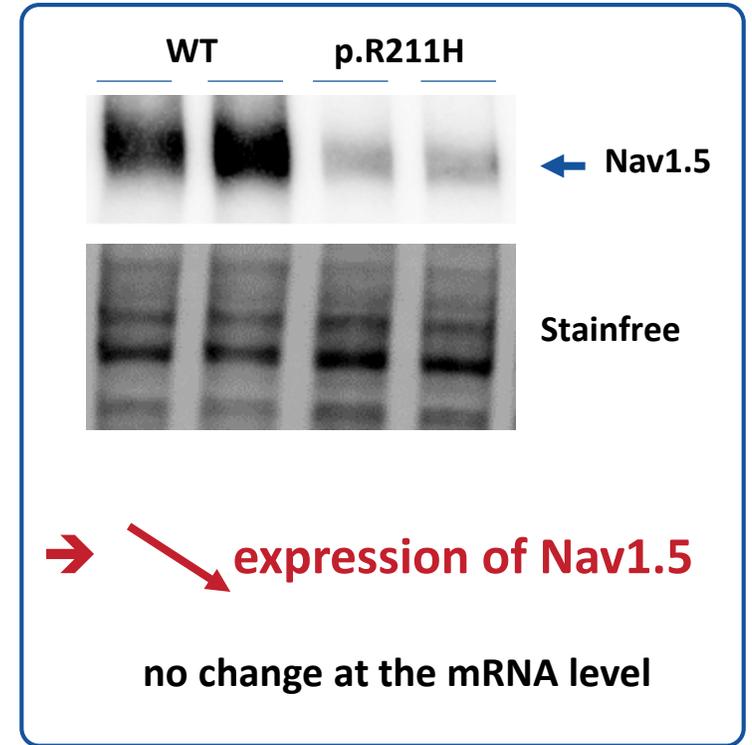
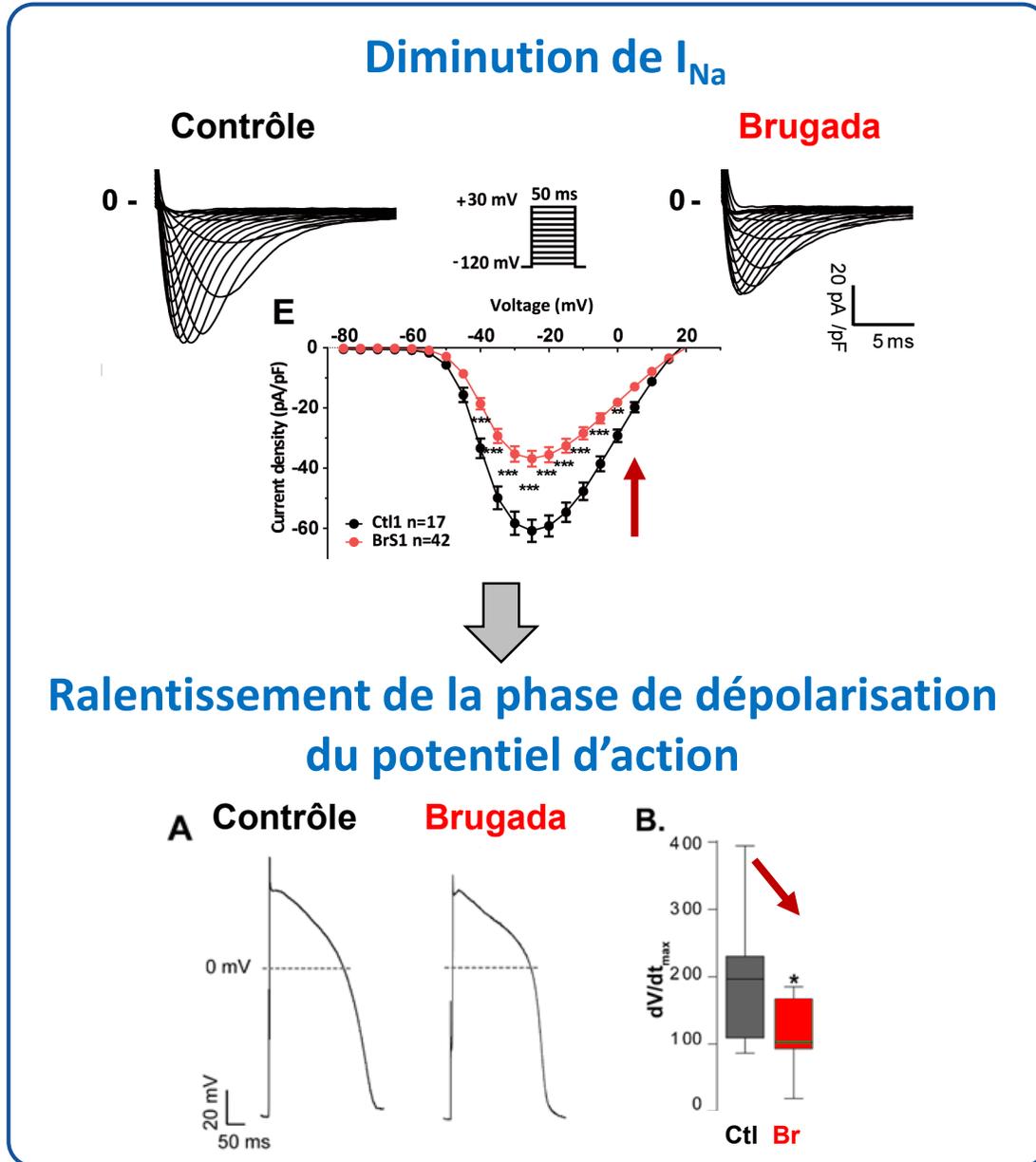
- WT8288 C03
- WT8288 C04

**3 clones for the Brs patient:**

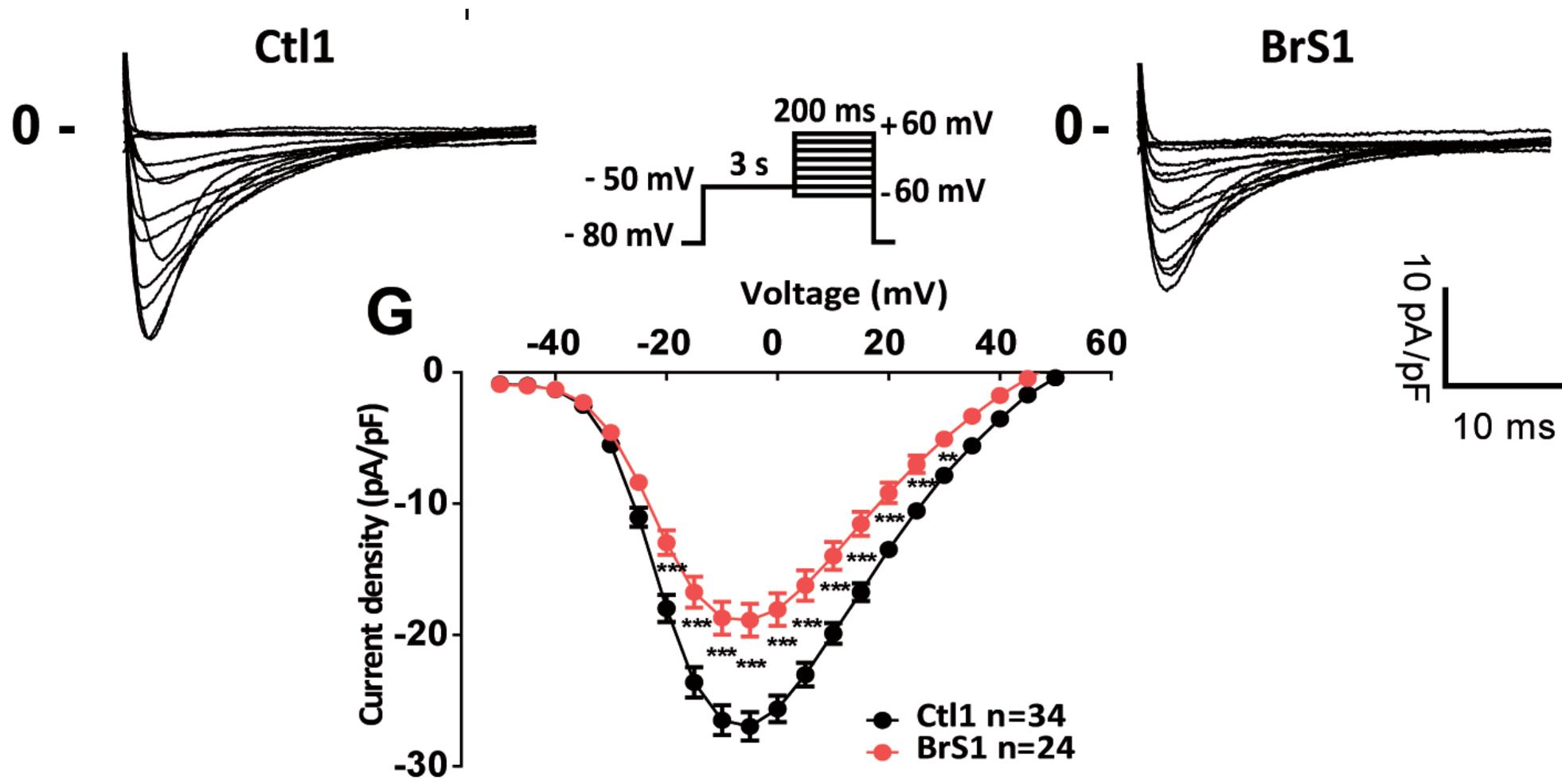
- BR334 C01
- BR334 C02
- BR334 C03

**~ 3 differentiations/clone/exp<sup>t</sup>**

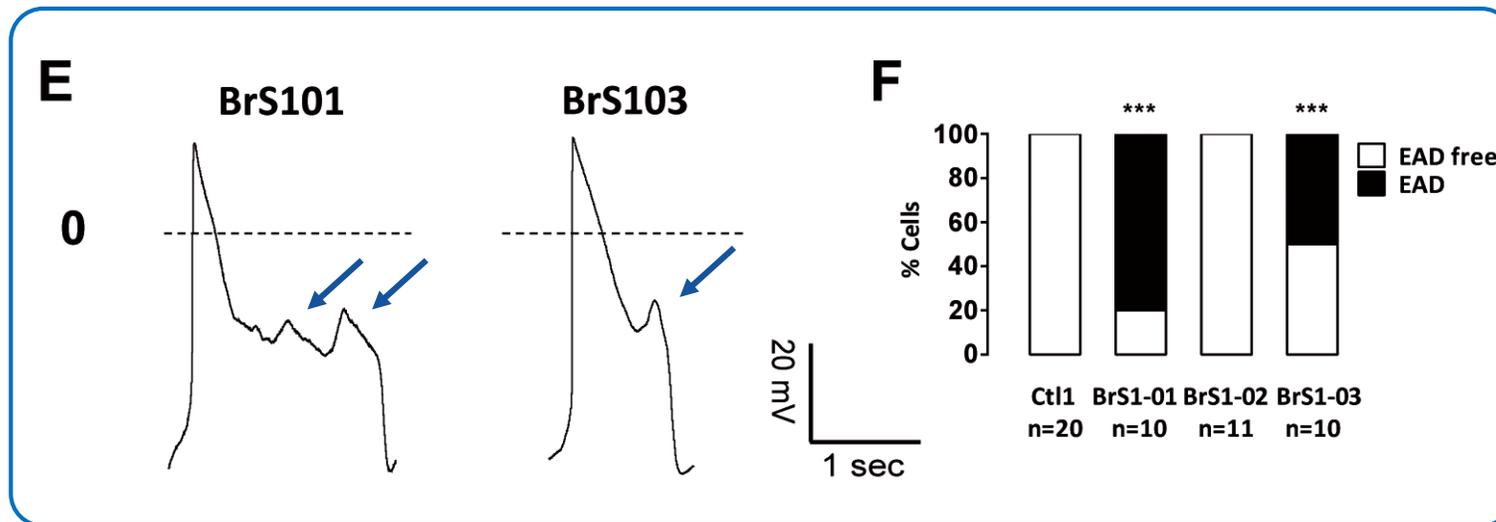
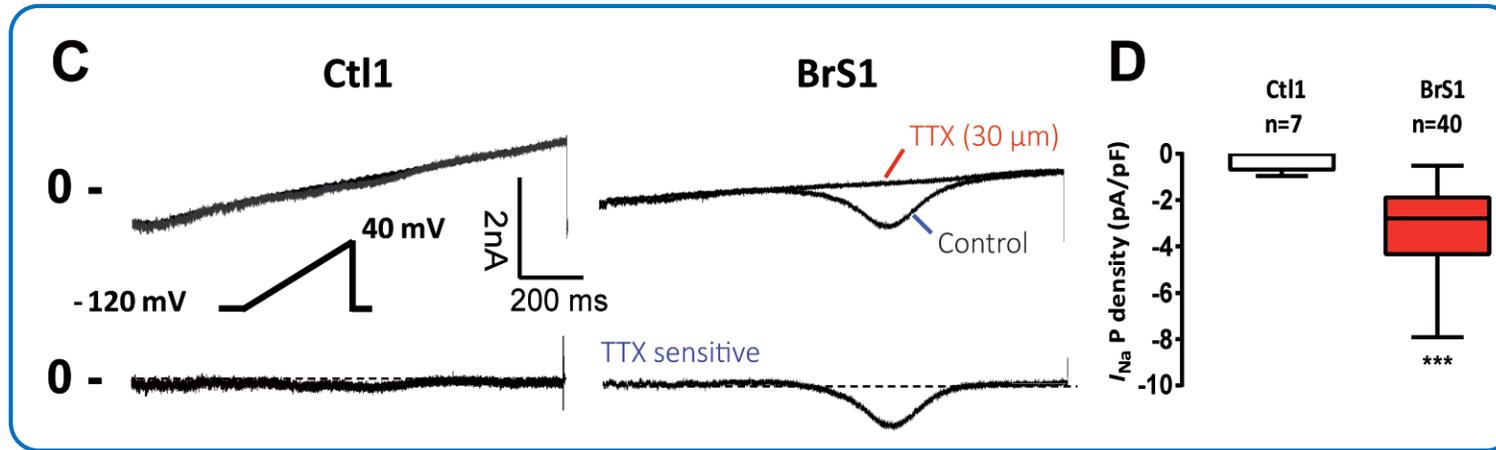
# Les cellules du patient présentent une diminution d' $I_{Na}$



# Les cellules du patients présentent une diminution d' $I_{Ca,L}$

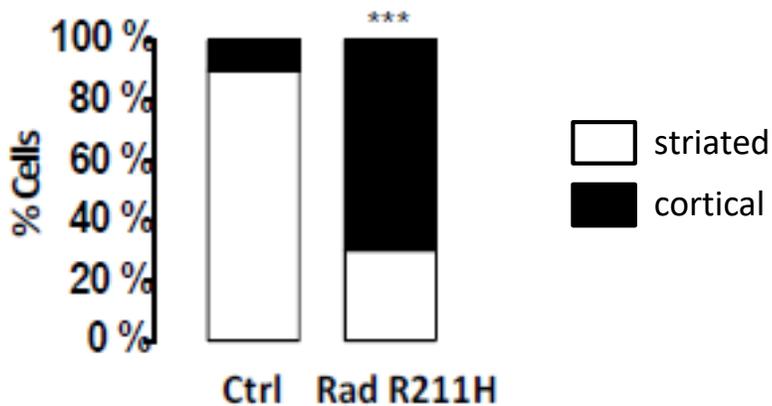
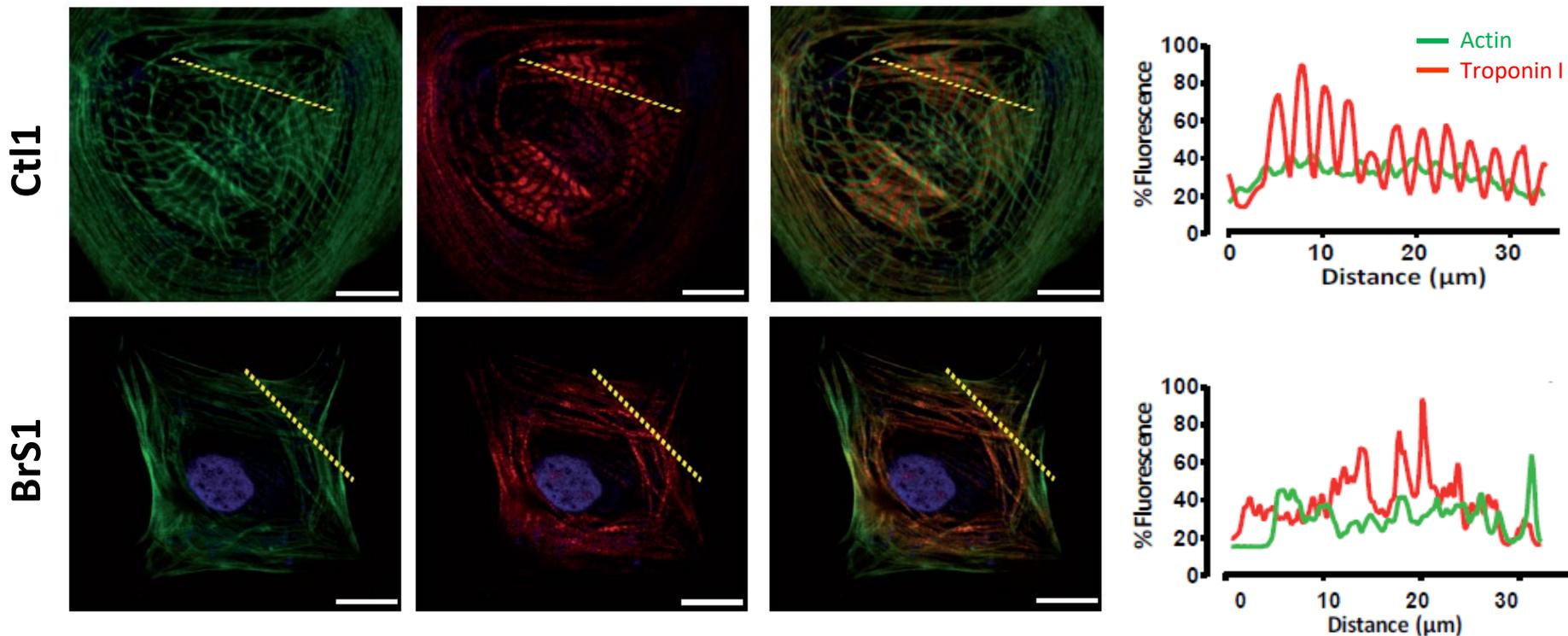


# Les cellules du patient présentent un courant $\text{Na}^+$ persistant



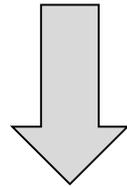
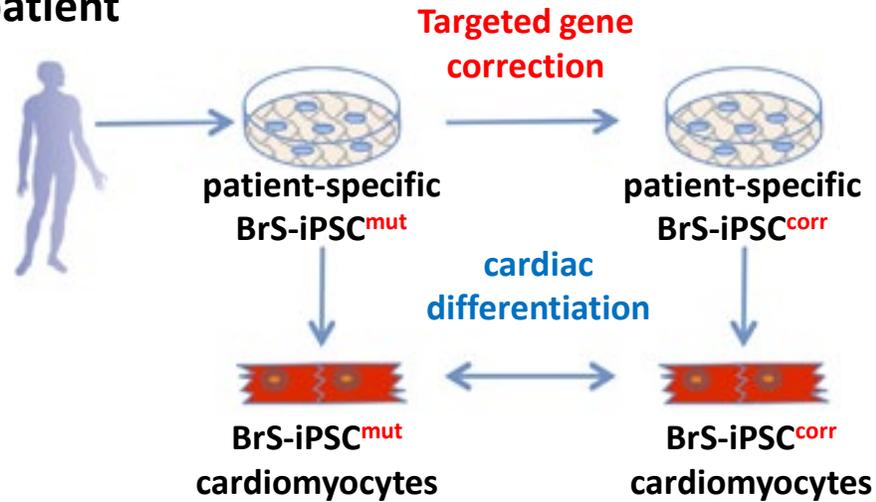
EAD = early afterdepolarization (post-dépolarisation précoce)

# Les cellules du patients ont des anomalies du cytosquelette



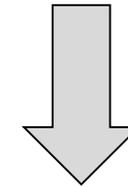
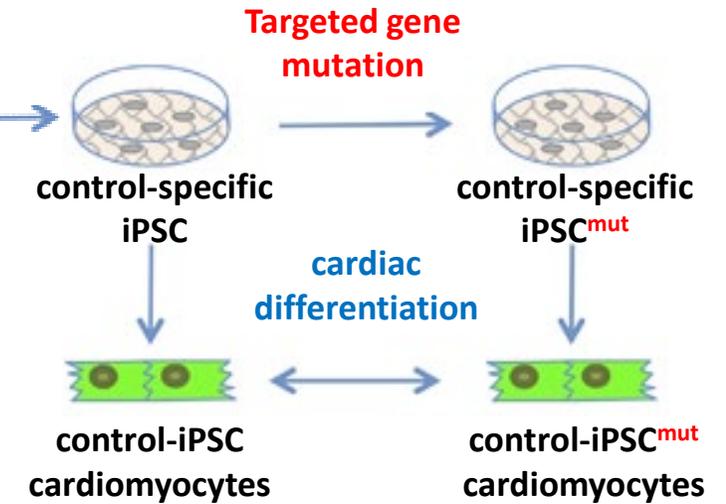
# Contrôle isogénique

patient



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

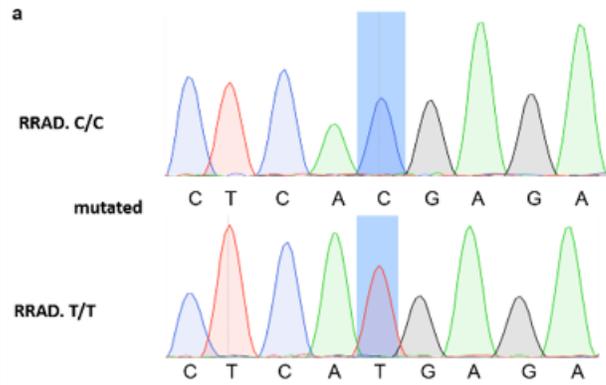
control



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

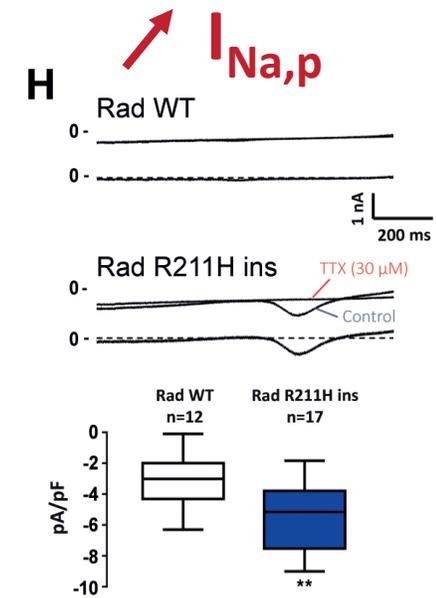
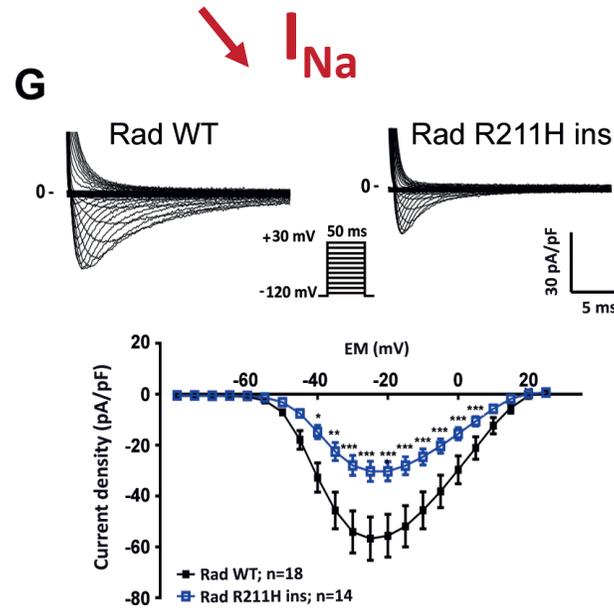
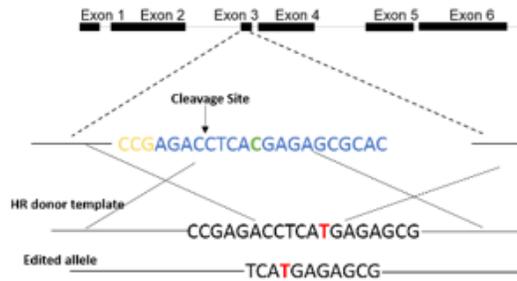
# Effets de l'insertion du variant dans des cellules contrôles

## Edition de génome (CRISPR/Cas9)

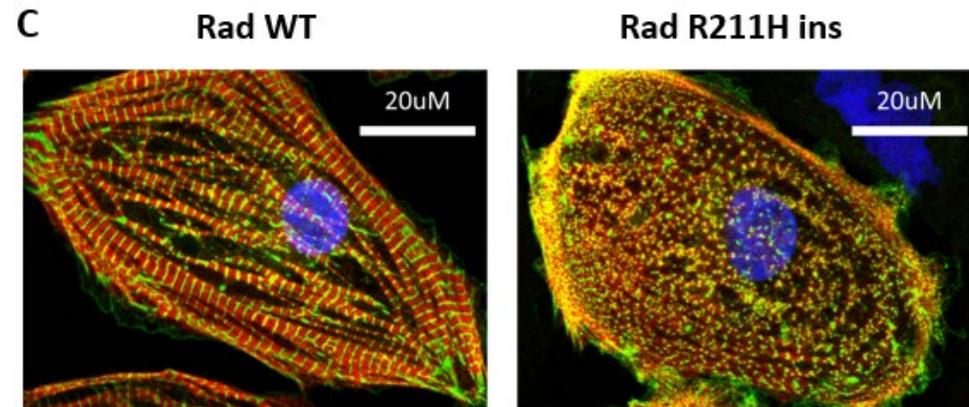


**b**

RRAD locus

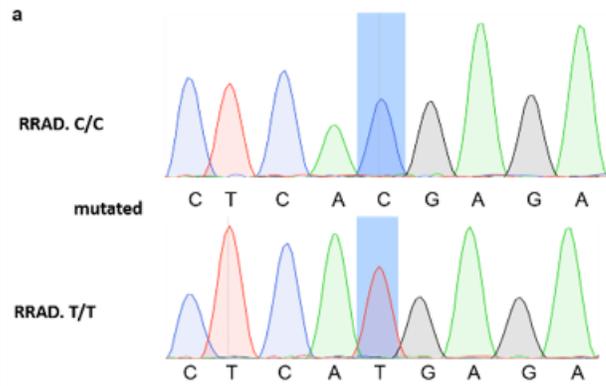


## Défauts structuraux



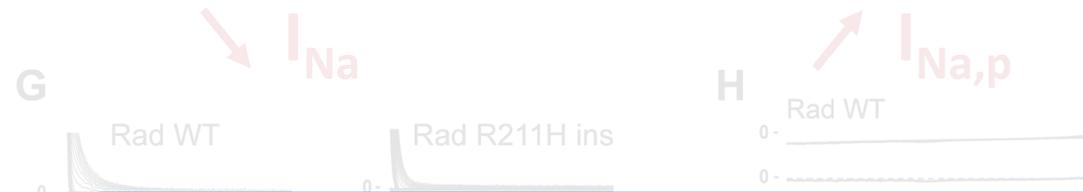
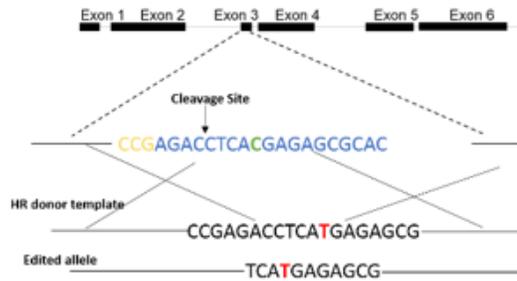
# Effets de l'insertion du variant dans des cellules contrôles

## Genome editing (CRISPR/Cas9 technology)

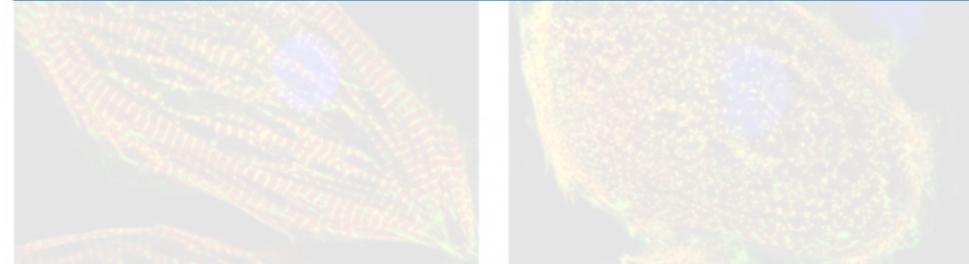
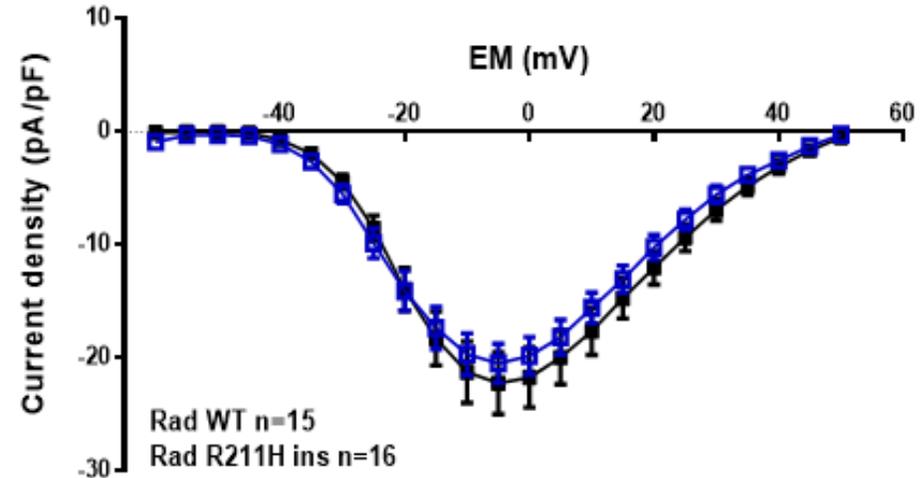


b

RRAD locus



No change in  $I_{Ca,L}$



# 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  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$
  - diminue la vitesse de dépolarisation des potentiels d'action
  - induit un courant  $\text{Na}^+$  persistant
  - prolonge les potentiels d'action et déclenche des post-dépolarisations précoces
  - induit des anomalies structurales

→ **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
  - suggère que la diminution du courant  $\text{Ca}^{2+}$  de type L dans la famille nécessite d'autre(s) facteur(s) en plus du variant p.R211H de ***RRAD***

mécanismes ?

# Modificateurs génétiques et non génétiques d'une canalopathie

