



**HAL**  
open science

# Étude de variants du gène de la calséquestrine de type 2 (Casq2)

Guillaume Sarrabay

► **To cite this version:**

Guillaume Sarrabay. Étude de variants du gène de la calséquestrine de type 2 (Casq2). Médecine humaine et pathologie. 2013. dumas-00879469

**HAL Id: dumas-00879469**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00879469>**

Submitted on 4 Nov 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE**

Année 2013

N°

**ETUDE DE VARIANTS DU GENE DE LA CALSEQUESTRINE  
DE TYPE 2 (CASQ2)**

**MEMOIRE**

**DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE**

*Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de*

**THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN  
MEDECINE DIPLOME D'ETAT**

**Guillaume SARRABAY**

Né (e) le : 14 avril 1983

A Marseille (13)

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE

Le : 28 octobre 2013

DEVANT LE JURY composé de :

Président du jury : Monsieur le Professeur JOUK Pierre-Simon

MEMBRES :

Monsieur le Professeur FAURE Patrice

Madame le Docteur ROUX-BUISSON Nathalie

Monsieur le Docteur FAURE Julien



## REMERCIEMENTS

Au Professeur Pierre-Simon JOUK, vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse acceptez pour cela mes plus sincères remerciements.

Au Professeur Patrice FAURE, recevez toute ma gratitude d'avoir accepté d'être membre de ce jury de thèse.

Au Docteur Julien FAURE, acceptez toute ma reconnaissance pour votre participation à ce jury, et pour votre aide à la rédaction de ce travail, ainsi que pour tout votre enseignement des deux dernières années.

Au Docteur Nathalie ROUX-BUISSON, je vous adresse tous mes remerciements pour avoir accepté de diriger cette thèse, acceptez toute ma gratitude pour ce que vous m'avez appris, ainsi que pour votre rigueur, votre patience, et votre persévérance.

Je remercie également le Docteur Isabelle MARTY pour m'avoir accueilli dans l'équipe « Muscle et Pathologie » de l'Institut des Neurosciences de Grenoble où j'ai pu réaliser une grande partie de ce travail.

Je remercie le Docteur Florence AMBLARD, ainsi que toutes les personnes du laboratoire de Génétique Chromosomique, pour m'avoir permis de découvrir cette discipline. J'aurais souhaité pouvoir en apprendre encore davantage.

Je remercie toutes les personnes du laboratoire de Biochimie Génétique et Moléculaire du Centre Hospitalo-Universitaire de Grenoble et de l'équipe 4 de l'Institut des Neurosciences de Grenoble avec qui j'ai pu travailler et qui ont contribué à cette thèse.

Je remercie aussi tous ceux que j'ai pu croiser pendant ces 4 ans d'internat, internes, externes, techniciens, biologistes, chercheurs, cadres de santé, et secrétaires.

Merci en particulier à tous mes co-internes et à l'équipe du GIN, pour ces bons moments passés ensemble, ces pauses café, ces restos, ces pots de thèse, ces sorties au ski, ces congrès, ces afterwork, voire même ces gardes, resteront de supers souvenirs, et j'espère qu'il y en aura d'autres.

Merci à mes amis de Grenoble, j'ai passé de très belles et inoubliables années avec vous, vous allez me manquer terriblement, mais le fil ne sera pas coupé je vous le promets.

Merci à mes amis d'ailleurs, de Lyon, de Marseille, de Paris (remarquez que l'ordre est alphabétique), je souhaite que nos vies soient encore liées longtemps.

Et le plus important, merci à ma famille, que j'aime et à qui je pense tous les jours, même si je ne le dis pas toujours.

## LISTE MCU-PH

Occupation Actuelle	Section/ss° CNU	Discipline universitaire	Observation
APTEL Florent Depuis 01/09/2012	55.02	Ophthalmologie	
BOISSET Sandrine Depuis 01/09/2012	45.01	Bactériologie, virologie	
BONNETERRE Vincent Depuis 01/09/2011	46.02	Médecine et santé au travail	
BOTTARI Serge Depuis 01/10/1993	44.03	Biologie cellulaire	
BOUTONNAT Jean Depuis 01/09/2000	42.02	Cytologie et histologie	DEMISSION
BOUZAT Pierre Depuis 01/09/2012	48.01	Anesthésiologie-réanimation	
BRENIER-PINCHART M.Pierre Depuis 01/11/2001	45.02	Parasitologie et mycologie	
BRIOT Raphaël Depuis 01/09/2009	48.04 (47.02 sur poste de Ringelsen)	Thérapeutique, médecine d'urgence	
CALLANAN-WILSON Mary Depuis 01/09/2002	47.01	Hématologie, transfusion	
DECAENS Thomas Depuis 01/09/2013			
DERANSART Colin Depuis 01/09/2004	44.02	Physiologie	
DETANTE Olivier Depuis 01/09/2009	49.01	Neurologie	
DIETERICH Klaus Depuis 01/09/2012	47.04	Génétique	
DUMESTRE-PERARD Chantal Depuis 01/09/2004	47.03	Immunologie	
EYSSERIC Hélène Depuis 01/10/2009	46.03	Médecine légale et droit de la santé	
FAURE Julien Depuis 01/09/2008	44.01	Biochimie et biologie moléculaire	
GILLOIS Pierre Depuis 01/09/2010	46.04	Biostat, informatique médicale et technologies de communication	
GRAND Sylvie Depuis 01/09/1995	43.02	Radiologie et imagerie médicale	
GUZUN Rita Depuis 01/09/2012	44.04	Nutrition	
LAPORTE François Depuis 01/10/1991	44.01	Biochimie et biologie moléculaire	
LARDY Bernard Depuis 01/09/2007	44.01	Biochimie et biologie moléculaire	
LARRAT Sylvie Depuis 01/09/2009	45.01	Bactériologie, virologie	
LAUNOIS-ROLLINAT Sandrine Depuis 01/09/2001	44.02	Physiologie	
LONG Jean-Alexandre Depuis 01/09/1999	52.04	Urologie	
MAIGNAN Maxime Depuis 01/09/2013	48.04	Médecine d'urgence	
MALLARET Marie-Reine Depuis 01/08/1992	46.01	Epidémiologie, économie de la santé et prévention	
MARLU Raphaël Depuis 01/09/2013	47.01	Hématologie	
MAUBON Danièle Depuis 01/09/2010	45.02	Parasitologie et mycologie	
MC LEER (FLORIN) Anne Depuis 01/09/2011	42.02	Cytologie et histologie	
MOUCHET Patrick Depuis 01/10/1992	44.02	Physiologie	

PACLET Marie-Hélène Depuis 01/09/2007	44.01	Biochimie et biologie moléculaire	
PAYSANT François Depuis 01/02/2008	46.03	Médecine légale et droit de la santé	
PELLETIER Laurent Depuis 01/01/2006	44.03	Biologie cellulaire	
RAY Pierre Depuis 01/09/2003	47.04	Génétique	
RIALLE Vincent Depuis 01/09/2001	46.04	Biostat, informatique médicale et technologies de communication	
ROUSTIT Matthieu Depuis 01/08/1990	48.03	Pharmacologie clinique	
ROUX-BUISSON Nathalie Depuis 01/09/2012	44.01	Biochimie et génétique moléculaire	
SATRE Véronique Depuis 01/09/2005	47.04	Génétique	
SEIGNEURIN Arnaud Depuis 01/09/2013	46.01	Epidémiologie, économie de la santé et prévention	
STASIA Marie-Josée Depuis 01/08/1992	44.01	Biochimie et biologie moléculaire	

## LISTE PU-PH

Occupation Actuelle	Section.ss° CNU	Discipline Universitaire	Observation
ALBALADEJO Pierre Depuis 01/09/2008	48.01	Anesthésiologie-réanimation	
ARVIEUX-BARTHELEMY Catherine Depuis de 01/09/2007	53.02	Chirurgie générale	
BACONNIER Pierre Depuis 01/10/1993	46.04	Biostat, informatique médicale et technologies de communication	
BAGUET Jean-Philippe Depuis 01/09/2006	51.02	Cardiologie	
BALOSSO Jacques Depuis 01/09/2003	47.02	Radiothérapie	
BARRET Luc Depuis 01/10/1992	46.03	Médecine légale et droit de la santé	
BAUDAIN Philippe Depuis 01/05/1990	43.02	Radiologie et imagerie médicale	
BEANI Jean-Claude Depuis 01/10/1992	50.03	Dermato-vénérologie	
BENHAMOU Pierre Yves Depuis 01/09/2003	54.04	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques	
BERGER François Depuis 01/09/2001	44.03	Biologie cellulaire	
BETTEGA Georges Depuis 01/09/2013	55.03	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie	
BONAZ Bruno Depuis 01/09/2001	52.01	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie	
BOSSON Jean-Luc Depuis 01/01/2006	46.04	Biostat, informatique médicale et technologies de communication	
BOUGEROL Thierry Depuis 01/09/1998	49.03	Psychiatrie d'adultes	
BOUILLET Laurence Depuis 01/09/2012	53.01	Médecine interne	
BRAMBILLA CHRISTIAN Depuis 01/10/1989	51.01	Pneumologie	
BRAMBILLA Elisabeth Depuis 01/10/1993	42.03	Anatomie et cytologie pathologiques	
BRICAULT Ivan Depuis 01/09/2011	43.02	Radiologie et imagerie médicale	
BRICHON Pierre-Yves Depuis 01/10/1993	51.03	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire	
CAHN Jean-Yves Depuis 01/09/2004	47.01	Hématologie	
CARPENTIER Françoise Depuis 01/09/1997	48.04	Thérapeutique, médecine d'urgence	
CARPENTIER Patrick Depuis 01/10/1990	51.04	Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire	
CESBRON Jean-Yves Depuis 01/09/1999	47.03	Immunologie	
CHABARDES Stephan Depuis 01/09/2010	49.02	Neurochirurgie	
CHABRE Olivier Depuis 01/09/2002	54.04	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques	
CHAFFANJON Philippe Depuis 01/09/2005	42.01	Anatomie	
CHAVANON Olivier Depuis 01/09/2006	51.03	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire	
CHIQUET Christophe Depuis 01/09/2007	55.02	Ophthalmologie	
CHIROSEL Jean-Paul Depuis 01/06/1990	42.01	Anatomie	
CINQUIN Philippe Depuis 01/10/1992	46.04	Biostat, informatique médicale et technologies de communication	
COHEN Olivier Depuis 01/09/2003	46.04	Biostat, informatique médicale et technologies de communication	

COUTURIER Pascal Depuis 01/09/2007	53.01	Gériatrie et biologie du vieillissement	
CRACOWSKI Jean-Luc Depuis 01/09/2009	48.03	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique	
DE GAUDEMARIS Régis Depuis 01/07/1992	46.02	Médecine et santé au travail	
DEBILLON Thierry Depuis 01/09/2003	54.01	Pédiatrie	
DEMATTEIS Maurice Depuis 01/09/2010	48.03	Addictologie	
DEMONGEOT Jacques Depuis 01/10/1989	(46.04)	Biostat, informatique médicale et technologies de communication	
DESCOTES Jean-Luc Depuis 01/09/1997	52.04	Urologie	
ESTEVE François Depuis 01/09/2004	43.01	Biophysique et médecine nucléaire	
FAGRET Daniel Depuis 01/10/1992	43.01	Biophysique et médecine nucléaire	
FAUCHERON Jean-Luc Depuis 01/09/2001	53.02	Chirurgie générale	
FERRETTI Gilbert Depuis 01/09/2000	43.02	Radiologie et imagerie médicale	
FEUERSTEIN Claude Depuis 01/07/1992	44.02	Physiologie	
FONTAINE Eric Depuis 01/01/2006	44.04	Nutrition	
FRANCOIS Patrice Depuis 01/09/1998	46.01	Epidémiologie, économie de la santé et prévention	
GARBAN Frédéric Depuis 01/09/2011	47.01	Hématologie, transfusion	
GAUDIN Philippe Depuis 01/09/2001	50.01	Rhumatologie	
GAVAZZI Gaetan Depuis 01/09/2011	53.01	Gériatrie et biologie du vieillissement	
GAY Emmanuel Depuis 01/09/2004	49.02	Neurochirurgie	
GODFRAND Catherine Depuis 01/09/2013	42.03	Anatomie et cytologie pathologiques	
GRIFFET Jacques Depuis 01/03/2010	54.02	Chirurgie infantile	
HALIMI Serge Depuis 01/10/1990	44/04	Nutrition	
HENNEBICQ Sylviane Depuis 01/09/2012	54.05	Biologie et médecine du développement et de la reproduction	-
HOFFMANN Pascale Depuis 01/09/2012	54.03	Gynécologie-obstétrique	
HOMMEL Marc Depuis 01/09/1995	49.01	Neurologie	
JOUK Pierre-Simon Depuis 01/09/1997	54.05	Génétique	
JUVIN Robert Depuis 01/10/1993	50.01	Rhumatologie	
KAHANE Philippe Depuis 01/09/2007	44.02	Physiologie	
KRACK Paul Depuis 01/09/2003	49.01	Neurologie	
KRAINIK Alexandre Depuis 01/09/2009	43.02	Radiologie et imagerie médicale	
LABARERE José Depuis 01/09/2012	46.01	Epidémiologie, économie de la santé et prévention	
LANTUEJOL Sylvie Depuis 01/09/2008	42.03	Anatomie et cytologie pathologiques	
LECCIA Marie-Thérèse Depuis 01/09/2002	50.03	Dermato-vénérologie	
LEROUX Dominique Depuis 01/09/1996	47.04	Génétique	
LEROY Vincent Depuis 01/09/2007	52.01	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie	

LETOUBLON Christian Depuis 01/05/1992	53.02	Chirurgie générale	
LEVY Patrick Depuis 01/09/1997	44.02	Physiologie	
MACHECOURT Jacques Depuis 01/10/1989	51.02	Cardiologie	
MAGNE Jean-Luc Depuis 01/07/1990	51.04	Chirurgie vasculaire	
MAITRE Anne Depuis 01/09/2007	46.02	Médecine et santé au travail	
MAURIN Max Depuis 01/09/2002	45/01	Bactériologie-virologie	
MERLOZ Philippe Depuis 01/10/1991	50.02	Chirurgie orthopédique et traumatologie	
MORAND Patrice Depuis 01/09/2007	45.01	Bactériologie-virologie	
MOREAU-GAUDRY Alexandre Depuis 01/09/2013	46.04	Biostat, informatique médicale et technologies de communication	
MORO Elena Depuis 01/09/2012	49.01	Neurologie	
MORO-SIBILOT Denis Depuis 01/09/2005	51.01	Pneumologie	
MOUSSEAU Mireille Depuis 01/09/1994	47.02	Cancérologie	
MOUTET François Depuis 01/10/1990	50.04	Chirurgie plastique, reconstructrice & esthétique, brûlologie	
PALOMBI Olivier Depuis 01/09/2011	42.01	Anatomie	
PARK Sophie Depuis 01/09/2013	47.01	Hématologie	
PASSAGIA Jean-Guy Depuis 01/09/1994	49.02	Neurochirurgie	
PAYEN DE LA GARANDERIE Jean-François Depuis 01/09/1996	48.01	Anesthésiologie-réanimation	
PELLOUX Hervé Depuis 01/09/2001	45.02	Parasitologie et mycologie	
PEPIN Jean-Louis Depuis 01/09/2004	44.02	Physiologie	
PERENNOU Dominique Depuis 01/04/2008	49.05	Médecine physique et de réadaptation	
PERNOD Gilles Depuis 01/09/2007	51.04	Médecine vasculaire	
PIOLAT Christian Depuis 01/09/2009	54.02	Chirurgie infantile	
PISON Christophe Depuis 01/09/1994	51.01	Pneumologie	
PLANTAZ Dominique Depuis 01/09/2003	54.01	Pédiatrie	
POLACK Benoît Depuis 01/09/1998	47.01	Hématologie	
POLOSAN Mircea Depuis 01/09/2013	49.03	Psychiatrie d'adultes	
PONS Jean-Claude Depuis 01/09/1998	54.03	Gynécologie-obstétrique	
RAMBEAUD Jean-Jacques Depuis 01/07/1991	52.04	Urologie	
REYT Emile Depuis 01/10/1992	55.01	Oto-rhyno-laryngologie	
RIGHINI Christian Depuis 01/09/2010	55.01	Oto-rhyno-laryngologie	
ROMANET J. Paul Depuis 01/10/1991	55.02	Ophtalmologie	
SARAGAGLIA Dominique Depuis 01/07/1992	50.02	Chirurgie orthopédique et traumatologie	
SCHMERBER Sébastien Depuis 01/09/2005	55.01	Oto-rhyno-laryngologie	
SCHWEBEL Carole Depuis 01/09/2012	48.02	Réanimation, médecine d'urgence	

SCOLAN Virginie Depuis 01/09/2013	46.03	Médecine légale et droit de la santé	
SERGENT Fabrice Depuis 01/09/2011	54.03	Gynécologie-obstétrique	
SESSA Carmine Depuis 01/09/2005	51.04	Chirurgie vasculaire	
STAHL Jean-Paul Depuis 01/10/1992	45.03	Maladies infectieuses, maladies tropicales	
STANKE Françoise Depuis 01/09/2011	48.03	Pharmacologie fondamentale	
TAMISIER Renaud Depuis 01/09/2013	44.02	Physiologie	
TIMSIT Jean-François	48.02	Réanimation	MUTATION
TONETTI Jérôme 01/09/2007 au 31/12/2010	50.02	Chirurgie orthopédique et traumatologie	
TOUSSAINT Bertrand Depuis 01/09/2008	44.01	Biochimie et biologie moléculaire	
VANZETTO Gérald Depuis 01/09/1999	51.02	Cardiologie	
VUILLEZ Jean-Philippe Depuis 01/09/1999	43.01	Biophysique et médecine nucléaire	
WEIL Georges Depuis 01/09/2011	46.01	Epidémiologie, économie de la santé et prévention	
ZAOUI Philippe Depuis 01/09/2002	52.03	Néphrologie	
ZARSKI Jean-Pierre Depuis 01/09/1994	52.01	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie	

# SOMMAIRE

<b>AVANT-PROPOS</b>	<b>- 11 -</b>
<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE ET PROBLEMATIQUE</b>	<b>- 13 -</b>
<b>I. LA CONTRACTION CARDIAQUE</b>	<b>- 14 -</b>
<b>A. Anatomie du cœur et circulation sanguine</b>	
<b>B. L'activité électrique cardiaque</b>	
<b>C. Le cardiomyocyte, unité fonctionnelle de la contraction</b>	
<b>D. Le couplage excitation-contraction</b>	
<b>E. Le complexe de relâchement du calcium (CRC)</b>	
1. Le récepteur des dihydropyridines ou DHPR	
2. Le canal calcique calcium-dépendant RyR2	
3. La triadine cardiaque	
4. La junctine	
5. La calséquestrine de type 2 (Casq2)	
<b>II. CASQ2 ET PATHOLOGIE</b>	<b>- 26 -</b>
<b>A. La protéine Casq2</b>	
<b>B. La tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique (TVPC)</b>	
1. Aspects cliniques et paracliniques	
2. Mécanismes physiopathologiques de la TVPC	
3. Aspects génétiques	
<b>III. CRITERES DE PATHOGENICITE DES VARIATIONS NUCLEOTIDIQUES</b>	<b>- 36 -</b>
<b>A. Variation faux-sens</b>	
1. Prévalence de la mutation	
2. Ségrégation familiale	
3. Degré de conservation de l'acide aminé	
4. Nature du changement physico-chimique de l'acide aminé	
<b>B. Mutations affectant l'épissage</b>	
1. Physiologie de l'épissage	
2. Méthodes d'études des mutations d'épissage	
<b>OBJECTIFS DU PROJET</b>	<b>- 44 -</b>

<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>- 46 -</b>
<b>I. POPULATION ET PATIENTS</b>	<b>- 47 -</b>
<b>II. METHODE DE SEQUENÇAGE GENOMIQUE</b>	<b>- 47 -</b>
<b>A.Extraction d'ADN</b>	
<b>B.Amplification</b>	
<b>C.Réaction de séquence</b>	
<b>D.Electrophorèse capillaire</b>	
<b>III. ETUDE DE L'EPISSAGE</b>	<b>- 51 -</b>
<b>A. Etude bioinformatique</b>	
1. Variants situés dans les zones consensus d'épissage 5' et 3'	
2. Variants situés en dehors des zones consensus d'épissage	
<b>B. Etude par minigène de la variation c.838+88T&gt;G</b>	
1. Mutagenèse dirigée	
2. Culture cellulaire et transfection	
3. Extraction d'ARN, transcription inverse et PCR	
<b>IV. ETUDE DE LA VARIATION C.44C&gt;G ; P.S15C</b>	<b>- 56 -</b>
<b>A. Clonage du cDNA de CASQ2 tagué hémagglutinine (HA)</b>	
<b>B. Mutagenèse dirigée</b>	
<b>C. Culture cellulaire et transfection</b>	
<b>D. Anticorps utilisés</b>	
<b>E. Immunofluorescence</b>	
<b>F. Etudes biochimiques</b>	
1. Lysats cellulaires	
2. Immunoblot	
3. Etude de glycosylation	
4. Etude de polymérisation	
5. Immunoprécipitation	

**RESULTATS** - 64 -

**I. ETUDE DE L'IMPACT SUR L'ÉPISSAGE DES MUTATIONS CASQ2** - 65 -

A. Mutations du gène *CASQ2*

B. Etude bioinformatique de l'impact sur l'épissage des mutations du gène *CASQ2*

1. Variants situés dans les zones consensus d'épissage 5' et 3'
2. Variants situés hors des zones consensus 5' et 3'

C. Etude de l'impact sur l'épissage de la variation c.838+88T>G

**II. ETUDE DE LA MUTATION c.44C>G ; p.S15C** - 77 -

A. Contexte clinique et génétique

B. Clonage du cDNA de *CASQ2* humaine sauvage et mutagenèse dirigée p.S15C

C. Etude en immunoblot

D. Etude de localisation en immunofluorescence

E. Etude de la glycosylation de *Casq2*

F. Etude de polymérisation de *Casq2*

G. Immunoprécipitation

**DISCUSSION** - 91 -

**I. ETUDE DE L'ÉPISSAGE** - 77 -

A. Variants situés au niveau des sites consensus d'épissage

B. Variants situés en dehors des sites consensus d'épissage

**I. ETUDE DE LA MUTATION FAUX-SENS p.S15C de *Casq2*** - 77 -

A. Clonage de *Casq2*

B. Mutation p.S15C

**CONCLUSION** - 103 -

**BIBLIOGRAPHIE** - 105 -

**ANNEXES** - 110 -

## ABREVIATIONS

<b>3'UTR</b> : 3' untranslated region	<b>HRP</b> : horse radish peroxydase
<b>5'UTR</b> : 5' untranslated region	<b>IF</b> : immunofluorescence
<b>AA</b> : acide aminé	<b>IB</b> : immunoblot
<b>ADN</b> : acide désoxyribonucléique	<b>IP</b> : immunoprecipitation
<b>ADNc</b> : ADN complémentaire	<b>kDa</b> : kilodalton
<b>ADP</b> : adénosine di-phosphate	<b>MES</b> : MaxEntScan
<b>ARN</b> : acide ribonucléique	<b>NCX</b> : échangeur Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>
<b>ASPH</b> : protéine aspartate β hydroxylase	<b>NMD</b> : nonsense mediated mRNA decay
<b>ATP</b> : adénosine tri-phosphate	<b>PA</b> : potential d'action
<b>Ca<sup>2+</sup></b> : cation calcium divalent	<b>Pb</b> : paire de base
<b>Casq2</b> : calséquestrine de type 2	<b>PBS</b> : phosphate buffer saline
<b>CEC</b> : couple excitation contraction	<b>PCR</b> : polymérase chain reaction
<b>CELF</b> : CUG-binding protein and embryonic lethal abnormal vision-type RNA-binding protein 3-like factors	<b>PS</b> : peptide signal
<b>CRC</b> : complexe de relâchement du calcium	<b>RE</b> : reticulum endoplasmique
<b>COS-7</b> : African green monkey kidney fibroblast-like cell line	<b>RIPA</b> : radioimmunoprecipitation assay
<b>CRC</b> : complexe de relâchement du calcium	<b>RRM</b> : RNA Recognition Motif
<b>CT1</b> : cardiac triadin 1	<b>RS</b> : reticulum sarcoplasmique
<b>DAD</b> : delayed afterdepolarization	<b>RSj</b> : reticulum sarcoplasmique jonctionnel
<b>DHPR</b> : récepteur des dihydropyridines	<b>Ryr2</b> : canal à la ryanodine de type 2
<b>DO</b> : densité optique	<b>SDS</b> : sodium dodecylsulfate
<b>DMEM</b> : Dulbecco's modified eagle's medium, glucose 40,5g/L, L-glutamine 1%	<b>SERCA</b> : sarco/endo reticulum Ca <sup>2+</sup> ATPase
<b>ECG</b> : électrocardiogramme	<b>SNP</b> : single nucleotide polymorphism
<b>ESE</b> : exonic splicing enhancer	<b>snRNP</b> : small nuclear ribonucleoproteins
<b>ESS</b> : exonic splicing silencer	<b>SOICR</b> : Store Overload Induced Ca <sup>2+</sup> Release
<b>FKBP12.6</b> : FK506 binding protein	<b>SR</b> : Serin/arginin Rich (protein)
<b>GFP</b> : green fluorescent protein	<b>SSF</b> : Splicing Site Finder
<b>GS</b> : goat serum	<b>SRP</b> : signal recognition particle
<b>HEK-293</b> : human embryonic kidney cells, clone 293	<b>TV</b> : tachycardie ventriculaire
<b>HSF</b> : Human Splicing Finder	<b>TVPC</b> : tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique
	<b>VSV-G</b> : protéine G du virus de la stomatite vésiculaire
	<b>WB</b> : western-blot

## Avant-propos

La mort subite d'origine cardiaque est une cause principale de la mortalité cardio-vasculaire et constitue un enjeu de santé publique avec 250 000 à 400 000 décès par an aux Etats-Unis (Towbin et al. 1995). Le décès est dû à un trouble aigu du rythme cardiaque, le plus souvent secondaire à une cardiopathie ischémique. Plus rarement, le trouble du rythme peut être d'origine héréditaire, comme lors de la tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique (TVPC). La TVPC est une pathologie arythmogène héréditaire rare, responsable de mort subite chez l'enfant ou l'adulte jeune. Le diagnostic de la TVPC est difficile et se fait sur l'anamnèse et les données électrocardiographiques (ECG, épreuve d'effort, Holter). Une fois le diagnostic établi, le traitement repose sur les  $\beta$ -bloquants, le flécaïnide, et éventuellement la mise en place d'un défibrillateur implantable.

Plusieurs gènes ont été impliqués dans la TVPC : *RYR2*, *CASQ2*, *TRDN*, et *CALMI*, qui codent des protéines impliquées dans l'homéostasie calcique cardiaque. La génétique moléculaire occupe une place importante dans la prise en charge de cette pathologie car elle permet, une fois la ou les mutation(s) causale(s) identifiée(s) chez le proband, de réaliser un diagnostic présymptomatique chez les apparentés afin de mettre en place un traitement prophylactique chez les individus à risque.

Les mutations du gène *RYR2* sont impliquées dans plus de la moitié des cas de TVPC, associées à une transmission autosomique dominante de la maladie. Les autres gènes sont beaucoup plus rarement impliqués (<10%) et associés à une transmission autosomique récessive de la pathologie.

Mon mémoire a porté sur l'étude des mutations du gène *CASQ2* identifiées au laboratoire de Biochimie Génétique et Moléculaire du CHU de Grenoble de 2007 à 2013.

Le gène *CASQ2* code pour la calséquestrine de type 2 (Casq2), une protéine présente dans le reticulum sarcoplasmique (RS) des cardiomyocytes, qui a un rôle dans le stockage, la chélation et la libération du calcium nécessaire à la contraction cardiaque.

Peu de mutations sont à ce jour décrites pour ce gène, et l'identification de nouveaux variants peut poser des problèmes d'interprétation, particulièrement quand il s'agit de mutations faux-sens, de mutations synonymes ou de mutations introniques profondes, dont la pathogénicité est difficile à évaluer. Les mutations du gène *CASQ2* sont de nature hétérogène. Des mutations non-sens, des microdélétions, des mutations d'épissage ou des mutations faux-sens sont rapportées. Mon travail a consisté recenser les mutations du gène *CASQ2* identifiées en Biochimie Génétique et Moléculaire, à étudier leur impact potentiel sur l'épissage et à initier le développement de l'étude fonctionnelle des mutations du gène *CASQ2* au laboratoire.

**INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE ET  
PROBLEMATIQUE**

# **I. La contraction cardiaque**

## ***A. Anatomie du cœur et circulation sanguine***

Le cœur est constitué de quatre cavités, l'oreillette droite (OD) et le ventricule droit (VD) qui constituent le « cœur droit », et l'oreillette gauche (OG) et le ventricule gauche (VG) qui forment le « cœur gauche ». Il existe un système valvulaire qui permet d'orienter le flux de sang, avec la valve mitrale entre l'OG et le VG, la valve tricuspide entre l'OD et le VD, la valve aortique à la sortie du VG et la valve pulmonaire à la sortie du VD.

Histologiquement, la paroi cardiaque est composée de trois couches, l'épicaarde, une membrane fibreuse qui se trouve sur la face externe du cœur, l'endocarde qui tapisse l'intérieur de cœur, et entre les deux le myocarde qui est la composante musculaire du cœur.

Lors de la circulation sanguine, le sang oxygéné est ramené des poumons au cœur via les veines pulmonaires, passe dans l'oreillette gauche, puis dans le ventricule gauche, et est éjecté vers l'aorte. Le sang irrigue les tissus, puis est ramené par le système veineux systémique vers le cœur droit. Le ventricule droit éjecte à son tour le sang veineux vers les poumons, via l'artère pulmonaire, puis le sang revient vers le cœur gauche. Chaque battement cardiaque est composé d'une phase de contraction musculaire appelée systole, suivie d'une phase de relaxation appelée diastole.

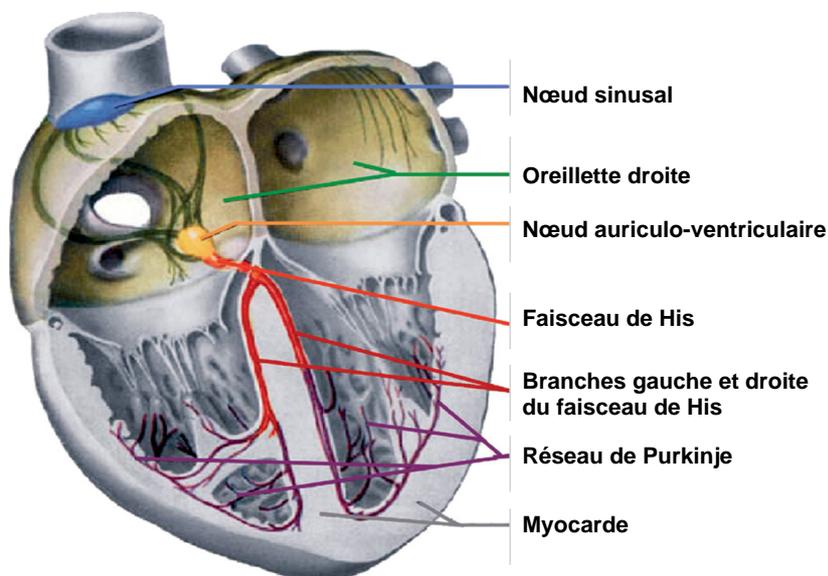
## ***B. L'activité électrique cardiaque***

Le myocarde est un muscle strié à commande involontaire : on parle d'automatisme cardiaque. Des cellules myocardiques spécialisées, les cellules nodales, génèrent un courant

électrique de façon spontanée. Elles sont organisées en un tissu nodal, qui forme ainsi les voies de conduction (Figure 1).

Le tissu nodal est composé d'un nœud sinusal, qui génère les impulsions, d'un nœud auriculo-ventriculaire qui reçoit et ralentit l'influx reçu pour permettre la synchronisation entre les contractions auriculaires et ventriculaires, et d'un faisceau de His qui se divise en deux branches, chacune destinée à un hémicoeur, et qui se ramifient pour porter le nom de réseau de Purkinje, permettant la transmission aux deux ventricules.

**Figure 1 : Le tissu de conduction cardiaque (d'après Kreuzberg et al. 2006).**



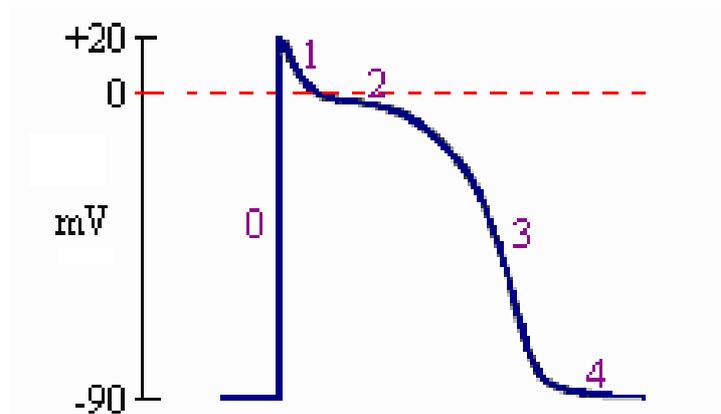
Au niveau cellulaire, les impulsions électriques se propagent sous la forme de potentiels d'action (PA), correspondant à une phase de dépolarisation de la membrane cellulaire, très rapide, suivie d'une phase de repolarisation de la membrane cellulaire avec retour au potentiel membranaire de repos (Figure 2).

Le potentiel d'action est divisé en cinq phases distinctes. La phase 0 correspond à la dépolarisation rapide : le potentiel intracellulaire de la membrane passe de sa valeur négative de repos à une valeur positive en quelques millisecondes. Puis la phase 1 est la phase de

repolarisation rapide précoce. Ensuite la phase 2 correspond à la phase de plateau du potentiel d'action. Elle correspond à une repolarisation lente qui peut durer plusieurs centaines de millisecondes. La phase 3 est dite de repolarisation finale rapide. Cette repolarisation rapide résulte de l'activation de courants potassiques sortants combinés à l'inactivation des courants calciques entrants. Enfin, la phase 4 est celle du potentiel transmembranaire de repos pour les cellules myocardiques.

### **Figure 2 : Le potentiel d'action d'un cardiomyocyte ventriculaire**

(<http://medsante.med.univ-rennes1.fr>)



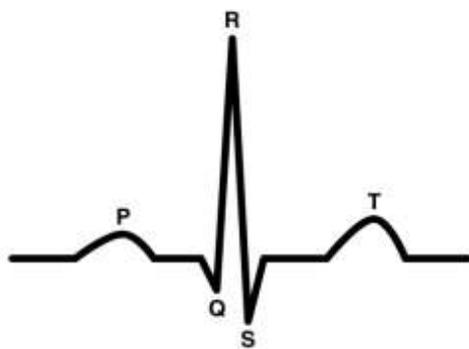
Phase 0 : dépolarisation rapide  
Phase 1 : repolarisation rapide précoce  
Phase 2 : plateau  
Phase 3 : repolarisation finale rapide  
Phase 4 : potentiel de repos

Les potentiels d'action sont la somme électrique de plusieurs événements qui résultent de mouvements ioniques passant à travers différents canaux ioniques voltage-dépendant.

On peut trouver parmi eux un canal sodique  $Na_v 1.5$ , dont l'activation est responsable de la phase 0 ou dépolarisation rapide (entrée de sodium dans la cellule), un canal calcique  $Ca_v 1.2$ , dont l'ouverture entraîne une entrée de calcium (phase 2), et quatre canaux potassiques  $K_v 4.3$ ,  $K_v 7.1$ ,  $K_v 11.1$ , et  $K_{ir} 2.1$ , responsables d'une sortie de potassium à tendance repolarisante (phases 1 à 4).

L'électrocardiogramme (ECG) permet d'enregistrer l'activité électrique du cœur de surface, en utilisant des électrodes appliquée sur la peau d'un sujet (Figure 3). L'ECG est un outil diagnostique qui permet d'observer, entre autres, des troubles du rythme en pathologie cardiaque où le tracé apparaît alors modifié.

### **Figure 3 : Tracé électrocardiographique normal**

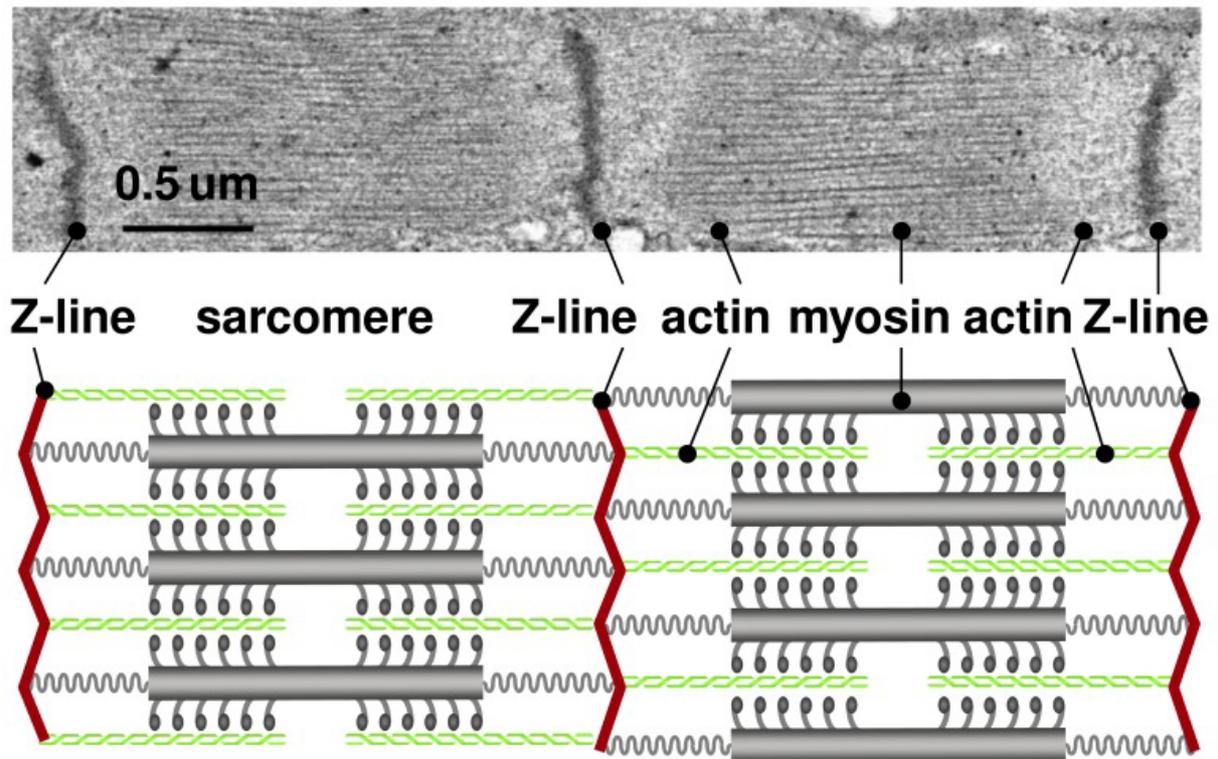


Ce schéma montre un schéma d'un enregistrement ECG normal. On distingue trois phases : 1. l'onde P correspondant à la dépolarisation auriculaire, 2. le complexe QRS correspondant à la dépolarisation ventriculaire et la repolarisation auriculaire, et 3. l'onde T correspondant à la repolarisation ventriculaire.

### ***C. Le cardiomyocyte, unité fonctionnelle de la contraction***

Le tissu myocardique est composé de cellules contractiles : les cardiomyocytes. Ces cellules présentent des similitudes avec les cellules du muscle squelettique, comme leur capacité à se contracter. Elles ont également un aspect strié, car leur cytoplasme est rempli de myofibrilles, des structures tubulaires allongées d'un diamètre de 1 à 2  $\mu\text{m}$ , elles-mêmes constituées de sarcomères, l'unité contractile du cardiomyocyte. Un sarcomère est défini en microscopie comme le segment qui s'étend d'une ligne Z à une autre (Figure 4). Il est constitué de filaments fins et épais. Un filament fin est constitué d'actine, de tropomyosine, et de troponines différentes (I, C et T). Quant aux filaments épais, ils sont formés de myosine.

**Figure 4 : L'unité sarcomérique (Zöllner et al. 2012).**



Représentation schématique d'unités sarcomériques mises en parallèle avec une image obtenue par microscopie électronique.

A la différence du rhabdomyocyte, le cardiomyocyte est une cellule mononucléée, résultat d'une fusion de plusieurs myoblastes. Par ailleurs, les cytoplasmes des cellules cardiaques sont en communication directe via de nombreuses jonctions communicantes, ce qui permet à l'ensemble de ces cellules de se comporter comme un syncytium.

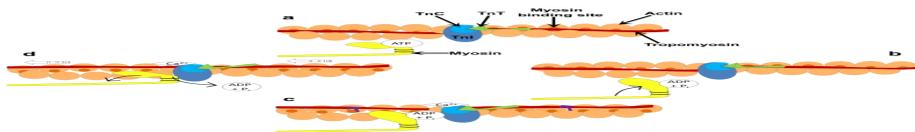
La contraction de la cellule est  $\text{Ca}^{2+}$  et adénosine triphosphate (ATP) dépendante. Elle est rendue possible par le glissement des filaments épais sur les filaments fins, et se déroule en plusieurs phases (Figure 5) :

1. Le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire se fixe sur le site spécifique de la troponine C. Cette fixation modifie la conformation de la molécule de tropomyosine, qui glisse alors dans la profondeur de la gouttière de la chaîne hélicoïdale d'actine, libérant ainsi les sites de

fixation spécifiques de la myosine présents sur la molécule d'actine. Les têtes globulaires de myosine se fixent alors sur les sites spécifiques de l'actine. Dans le même temps, la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  sur la troponine C permet la levée de l'inhibition exercée par la troponine I sur l'activité ATPasique de la tête de myosine. Cette activité ATPasique permet, en présence d'ions  $\text{Mg}^{2+}$  l'hydrolyse de l'ATP en adénosine diphosphate (ADP) et phosphate inorganique (Pi). Tout ceci aboutit à la formation d'un complexe Actine-Myosine-ADP-Pi.

2. Le Pi, dans un premier temps, puis l'ADP, dans un second temps, se détachent de ce complexe, ce qui permet une modification de l'angle formé par les têtes de myosine fixées à l'actine et donc un glissement des filaments d'actine sur les filaments de myosine. La traction au niveau des deux extrémités d'un filament épais de myosine s'effectue en sens opposé.
3. Le complexe actine-myosine reste stable et seule la présence d'une nouvelle molécule d'ATP permet la rupture de la liaison entre l'actine et la myosine, le redressement des têtes de myosine et la formation d'un nouveau complexe myosine-ATP. Si la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  est suffisamment élevée, le cycle se reproduit.

**Figure 5 : Le cycle de l'interaction actine-myosine** (England et al. 2013).



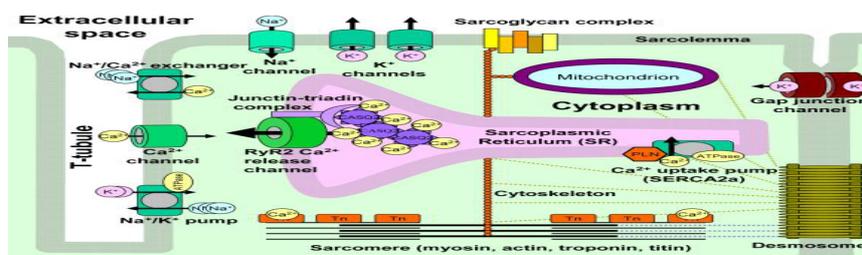
**a** : L'ATP se fixe sur son site spécifique au niveau de la tête de la myosine. **b** : L'ATP est hydrolysée en ADP et Pi permettant à la tête de myosine de pivoter vers le filament d'actine. **c** : La liaison d'un ion  $\text{Ca}^{2+}$  à la troponine C (TnC) induit un changement conformationnel du complexe, permettant le mouvement de la tropomyosine autour du filament d'actine (flèche mauve). **d** : Le relâchement de l'ADP et du Pi par la tête de myosine aboutit à son extension, permettant le glissement des filaments. L'ATP se refixe rapidement sur son site spécifique, ainsi la myosine se détache de l'actine, permettant au cycle de se répéter.

## D. Le couplage excitation-contraction

Le stimulus électrique aboutit donc à la contraction cardiaque, grâce au rôle central du calcium qui permet l'interaction actine-myosine. Le couplage excitation-contraction (CEC) est ainsi défini comme l'ensemble des phénomènes par lesquels l'excitation électrique aboutit à la contraction musculaire (Bers 2002). Il est rendu possible dans le cœur au niveau de la dyade, une zone de rapprochement entre deux structures membranaires particulières, les tubules transverses (tubules T) et le reticulum sarcoplasmique (RS) (Figure 6) :

- les tubules T sont des invaginations de la membrane cellulaire du cardiomyocyte. Elles permettent la conduction de l'onde électrique vers la dyade.
- le RS est un organe intracellulaire spécialisé dans le stockage et la libération du calcium. Il est organisé en un réseau longitudinal le long des sarcomères, et en un réseau terminal au niveau de la dyade : le RS jonctionnel (RSj).

**Figure 6 : La dyade, lieu du CEC (Faggioni et al. 2012).**



Lors de l'arrivée du PA, le DHPR s'ouvre et entraîne une augmentation locale de Ca<sup>2+</sup> cytoplasmique. Cet influx modéré de calcium active le canal RyR2 qui lui fait face, qui s'ouvre à son tour, conduisant à une sortie massive de calcium du RS vers le cytoplasme. Le RS permet le stockage de Ca<sup>2+</sup> dans la cellule et sa libération rapide dans le cytoplasme grâce au canal RyR2 et à des protéines associées dont Casq2, principale protéine chélatrice du calcium dans le RS. La concentration locale en Ca<sup>2+</sup> augmente, atteignant 1μM, activant les unités myofibrillaires. Le repompage de Ca<sup>2+</sup> vers le RS est assuré par une pompe Ca<sup>2+</sup>-ATPase, la SERCA2a, et une partie sort vers le milieu extracellulaire via un échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>.

Le CEC est réalisé par un assemblage macromoléculaire appelé le complexe de relâchement du calcium (CRC) situé au niveau de la dyade et centré sur deux canaux calciques :

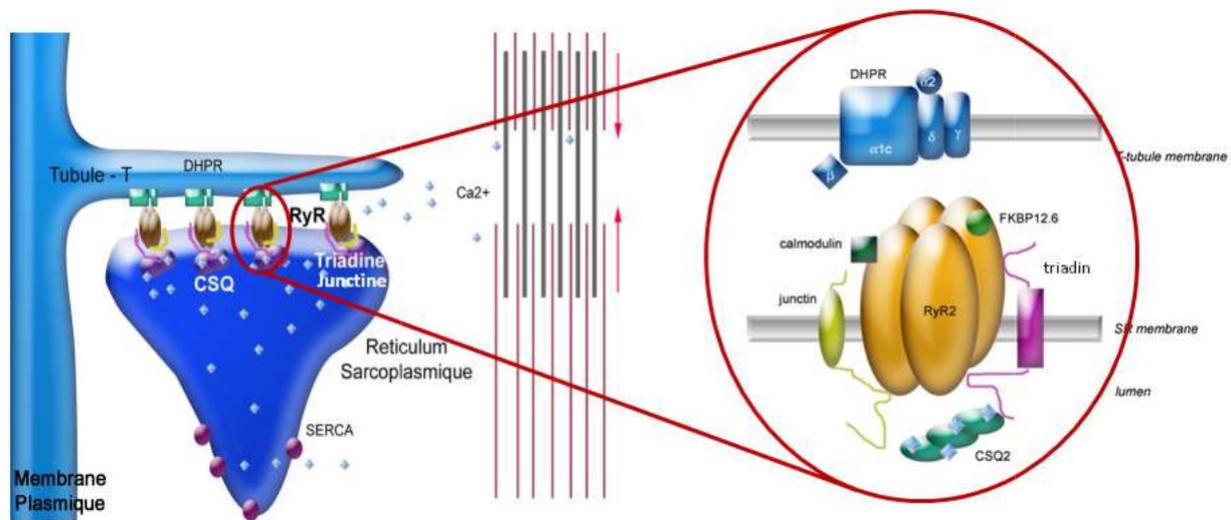
- le récepteur des dihydropyridines (DHPR) situé sur la membrane plasmique au niveau du tubule T.
- le récepteur de la ryanodine de type 2 (RyR2) situé, en face, sur la membrane du RSj.

Le CEC est donc le carrefour du mécanisme qui permet à l'influx électrique d'aboutir à une contraction. A chaque battement cardiaque, lors de la dépolarisation membranaire, le DHPR s'ouvre et un influx modéré de calcium entre dans le cytoplasme (Figure 6). Cet influx active et ouvre le canal RyR2 situé sur la membrane du RS, ce qui a pour conséquence une sortie massive de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme. Le calcium ainsi massivement libéré, va permettre l'activation des unités myofibrillaires et aboutir à la contraction cardiaque. En diastole, une partie du  $\text{Ca}^{2+}$  est repompé dans le RS du  $\text{Ca}^{2+}$  par la SERCA2a, une pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, et une partie du calcium est exclu hors de la cellule via le NCX, un échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  situé sur la membrane plasmique.

## E. Le complexe de relâchement du calcium (CRC)

Le CRC est un complexe macromoléculaire composé des canaux calciques DHPR et RyR2 et de nombreuses protéines associées, principalement la calséquestrine de type 2, la triadine et la junctine (figure 7).

**Figure 7 : Schéma du Complexe de relâchement calcique (CRC)**



Le CRC se situe au sein de la dyade représentée en fuchsia à gauche, on y voit des canaux RyR2 faisant face à des DHPR. A droite, on voit en détail les protéines du CRC, avec le RyR2 (jaune or), le DHPR (bleu), Casq2 (turquoise), la triadine (fuchsia), la junctine (jaune pâle), FKBP12.6 (vert clair) et la calmoduline (vert foncé).

### 1. Le récepteur des dihydropyridines ou DHPR

C'est un canal calcique voltage dépendant de type L (long lasting). Il est composé de 5 sous-unités. La sous-unité  $\alpha_1$  forme le pore alors que les 4 autres,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , et  $\gamma$  jouent un rôle de régulation. Ce canal sensible au voltage s'ouvre lorsque le potentiel d'action a été déclenché, il laisse alors passer des ions calcium en faible quantité, qui vont à leur tour activer l'ouverture du canal RyR2. Des mutations de la sous-unité  $\alpha_1$  cardiaque sont décrites dans le syndrome de Timothy (atteinte multisystémique avec QT long congénital).

## 2. Le canal calcique calcium-dépendant RyR2

Il fait partie de la famille des récepteurs à la ryanodine, qui comprend trois isoformes :

- RyR1 est fortement exprimé dans le muscle squelettique, et à bas niveau dans le cœur, le muscle lisse (Neylon et al. 1995) ainsi que d'autres tissus comme l'estomac, le thymus, le rein (Nakai et al. 1990) le cervelet, les cellules de Purkinje (Marks et al. 1989). Il a été montré récemment qu'il était également exprimé dans les lymphocytes B (Vukcevik et al. 2010).
- RyR2 est très exprimé dans le muscle cardiaque (Nakai et al. 1990), les cellules de Purkinje du cervelet et du cortex cérébral (Lai et al. 1992), et à bas niveau dans l'estomac, les reins, le thymus (Kuwajima et al. 1992).
- RyR3 se retrouve dans différents tissus tels que le muscle squelettique, le muscle lisse (Neylon et al. 1995), ainsi qu'au niveau cérébral (Hakamata et al. 1992).

Le RyR2 est une grande protéine (4967 acides aminés), il est codé par le gène *RYR2*, et il présente 65% (Hakamata et al. 1992) de similitude de séquence avec les deux autres isoformes.

RyR2 est le principal canal calcique du RS dans le muscle cardiaque. Ce récepteur est un homotétramère de poids moléculaire (>500kDa/ sous-unité), formé d'une majeure partie N-terminale cytoplasmique (90% de la protéine), qui contient les sites responsables de la régulation du canal sur son versant cytoplasmique, et une partie C-terminale transmembranaire, qui participe à la formation du pore permettant le passage des ions  $Ca^{2+}$  à travers la membrane du RS.

La régulation de RyR2 par différentes protéines régulatrices est essentielle à l'homéostasie calcique cardiaque. Les principales protéines régulatrices cytoplasmiques sont la calstabilité 2

ou FKBP12.6 et la calmoduline ainsi que des kinases et phosphatases. Au niveau du réticulum sarcoplasmique, Casq2, la junctine et la triadine jouent un rôle important.

Le calcium est le facteur de régulation le plus important de l'ouverture et de la fermeture de RyR2 (Chen et al. 1994). RyR2 possède deux sites cytosoliques de fixation du calcium, l'un de haute affinité est responsable de son ouverture lors du CRC, et l'autre de faible affinité joue un rôle lors de son inactivation à la fin du CRC (Bezprozvanny et al. 1991). Le RyR2 est également sensible au  $Ca^{2+}$  intraluminal du RS, même si le mécanisme de régulation est incertain (Lanner et al. 2010).

### **3. La triadine cardiaque**

C'est une protéine transmembranaire du RS. Elle est codée par le gène *TRDN*, qui peut, par épissage alternatif donner quatre isoformes différentes de cette protéine.

L'isoforme cardiaque, CT1 (cardiac triadin 1), interagit avec RyR2 et Casq2 grâce à sa partie luminale, côté C-terminal, via un domaine composé d'une alternance de lysines et de glutamates. L'interaction avec Casq2 se fait entre les résidus situés entre 210 et 224 de la triadine, et une région riche en aspartates (chargés négativement) de Casq2 situés entre les acides aminés 354 à 367. Cette interaction est de type « polar zipper » (Kobayashi et al. 2000). Cette protéine pourrait un rôle dans l'organisation structurale du CRC (Fourest-Lieuvain et al. 2012), la modulation de l'activité canalaire de RyR2 (Gyorke et al. 2004), ou l'ancrage de Casq2 à RyR2 (Guo and Campbell et al. 1995).

### **4. La junctine**

C'est une protéine codée par le gène *ASPH*, exprimée spécifiquement dans les muscles cardiaque et squelettique. Ce gène produit par épissage alternatif également deux autres protéines : la junctate et la protéine aspartate  $\beta$  hydroxylase (ou ASPH).

Comme la triadine, c'est une protéine transmembranaire du RS. Il est à noter qu'elle présente 60% d'identité de séquence avec la triadine.

## **5. La calséquestrine de type 2 (Casq2)**

Cette partie va être détaillée dans le chapitre qui suit.

## II. Casq2 et pathologie

### A. La protéine Casq2

Casq2 est l'isoforme cardiaque de la calséquestrine. Elle présente 80% d'homologie de séquence avec l'isoforme musculaire squelettique : la calséquestrine de type 1. Elle se trouve majoritairement dans les cardiomyocytes, mais est aussi présente en faible quantité dans les fibres lentes du muscle squelettique.

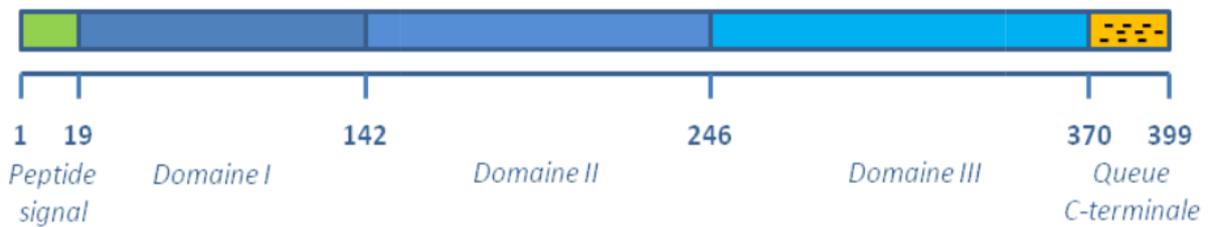
Elle est codée par le gène *CASQ2* qui est situé sur le chromosome 1 en 1p11- p13.3. Ce gène a une longueur de 69kb et possède 11 exons. Son ARN messager a quant à lui une longueur de 2716 paires de bases (NM\_001232.3).

La protéine Casq2 comporte 399 acides aminés, c'est la protéine majeure de chélation des ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans le réticulum sarcoplasmique (Beard et al. 2004). Elle présente une faible affinité pour les ions  $\text{Ca}^{2+}$ , mais peut en stocker jusqu'à 40 par molécule de Casq2 (Murphy et al. 2011).

Sa structure cristallographique a été définie en 2007 chez l'homme (Kim et al. 2007) (Figure 9). Elle est organisée en 3 domaines « thioredoxine-like » et le centre de chacun de ces domaines est hydrophile. Elle possède en outre un grand nombre de charges négatives à son extrémité C-terminale (Kim et al. 2007) (Figures 8). La structure de Casq2 lui permet de lier les ions  $\text{Ca}^{2+}$  en formant des interactions électrostatiques entre l'ion divalent et deux résidus chargés négativement.

## Figure 8 : Représentation de Casq2

### a. Structure primaire



### b. Structure en trois dimensions (d'après Kim et al. 2007).

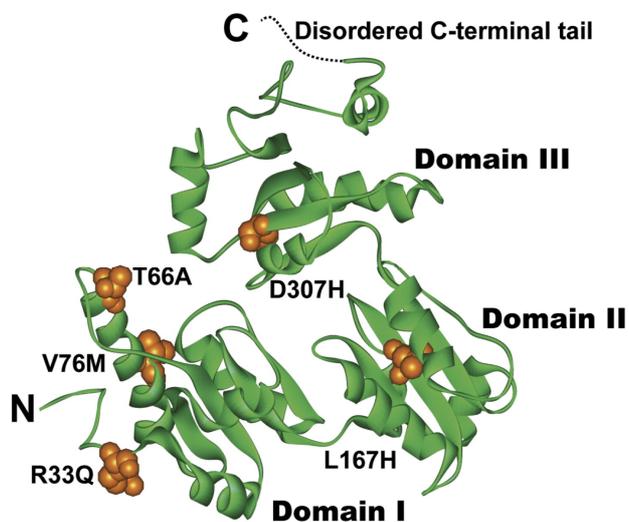


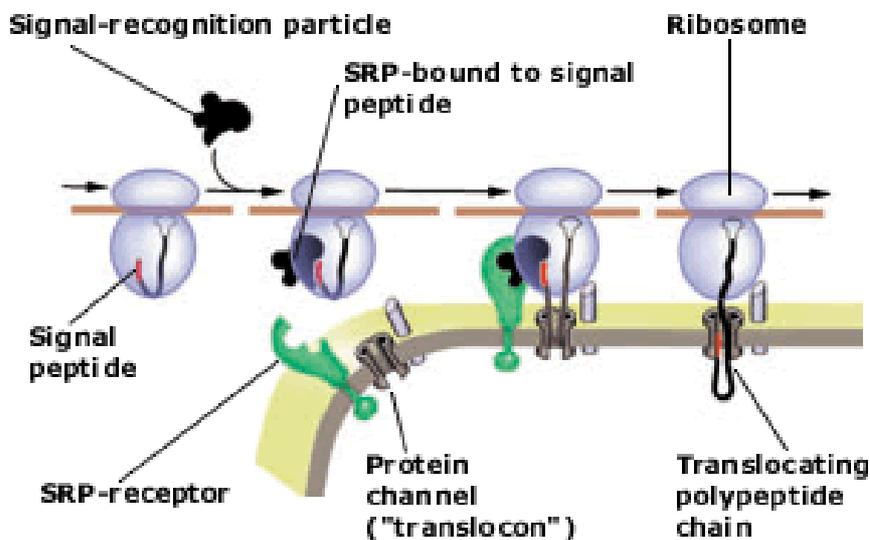
Schéma montrant les trois domaines « thioredoxine-like » de Casq2 ainsi que sa queue C-terminale chargée négativement. Des mutations faux-sens sont représentées sur cette structure 3D.

Casq2 est synthétisée à l'état de précurseur possédant un peptide signal (PS) en N-terminal (AA 1 à 19) qui intervient dans l'adressage de la protéine au reticulum. Le peptide signal est ensuite clivé pour former la protéine mature.

Comme pour de nombreuses protéines intraluminales du reticulum, l'adressage de Casq2 se fait grâce à cette courte séquence située à l'extrémité N-terminale de la protéine (Figure 9).

**Figure 9 : Reconnaissance et clivage du peptide signal d'une protéine soluble** (source :

[www.nobelprize.org](http://www.nobelprize.org)).



Le SRP se lie au PS ce qui bloque l'élongation. Cette dernière ne reprend que lorsque le SRP est à son tour reconnu par son récepteur, ce qui permet la translocation de la protéine dans le reticulum. Quand cette dernière a totalement pénétré dans le RE, une endopeptidase clive le PS ce qui libère la protéine dans la lumière du RE.

Après la traduction de l'ARN messenger par le ribosome des acides aminés correspondant à la séquence du PS, celui-ci est reconnu par la SRP (signal recognition particle), ce qui arrête l'élongation. Pour que la traduction se poursuive, il faut que la SRP soit également reconnue par son récepteur spécifique, qui est associé au translocon, un pore situé dans la membrane du RE. Cette étape est suivie d'une translocation de la protéine à travers le pore. Enfin, le PS est reconnu et clivé par une endopeptidase spécifique présente dans la lumière du reticulum permettant la libération de Casq2 mature dans sa lumière. Casq2 reste ensuite dans la lumière du réticulum où elle va jouer son rôle de protéine chélatrice du calcium.

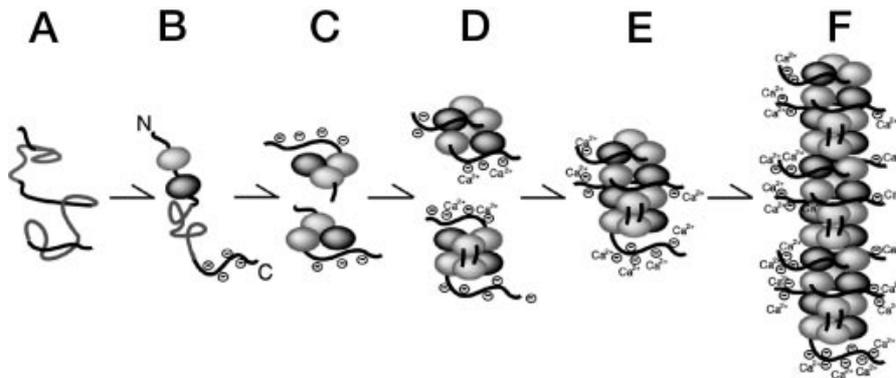
Beaucoup de protéines de la lumière du réticulum sont en transit, en route pour d'autres destinations. D'autres protéines cependant, comme Casq2, sont résidentes du réticulum. Ces protéines résidentes du réticulum présentent classiquement des signaux de rétention dans le réticulum, au niveau de leur extrémité C-terminale, formés de 4 acides aminés (séquence

KDEL), et qui sont responsables de leur maintien dans le réticulum. Le mécanisme de rétention dans le RS de Casq2 reste incertain. En effet, Casq2 ne présente pas de motif consensus de rétention connu, comme la séquence peptidique KDEL. Des hypothèses ont été évoquées, telles que la polymérisation de Casq2, ou son interaction avec d'autres protéines, comme la triadine et la junctine, ce qui la retiendrait à l'intérieur du RS. Ainsi, il a été montré que l'absence de triadine chez la souris entraînait une diminution de concentration de la calséquestrine dans le RS (Shen et al. 2007), ce qui serait compatible avec un mécanisme de rétention impliquant des interactions de Casq2 avec ses partenaires.

Des modifications post-traductionnelles de la protéine sont connues, mais dont le rôle reste imprécis. Casq2 possède un site de N-glycosylation en position 335 et deux sites de phosphorylation sur les sérines 385 et 393, dans la partie C-terminale. Des études sur des mutants de Casq2 sur ces sérines ont montré une augmentation de la capacité de la protéine à lier le calcium (Sanchez et al. 2011).

Outre sa fonction de chélation des ions  $\text{Ca}^{2+}$ , la protéine Casq2 possède une propriété de polymérisation, dépendante de la concentration intra-luminale en ions  $\text{Ca}^{2+}$  (interactions front-to-front, interactions back-to-back, Figure 10). La protéine est à l'état monomérique lorsque la concentration intraluminale en  $\text{Ca}^{2+}$  est faible, et elle forme des polymères de haut poids moléculaire quand cette concentration augmente, permettant d'atteindre une concentration calcique de 20mM en évitant que les cations  $\text{Ca}^{2+}$  ne précipitent (Park et al. 2003).

**Figure 10 : Polymérisation de Casq2**



A faible concentration intra-luminale en  $\text{Ca}^{2+}$ , les 3 domaines du monomère de Casq2 se repoussent (A). A mesure qu'augmente la force ionique du milieu, les domaines s'attirent et s'associent entre eux (B, C). Les monomères s'associent entre eux par un mode « front-to-front » et forment des dimères (D). Les dimères s'associent ensuite selon le modèle « back-to-back » pour former des tétramères (E), qui forment à leur tour des polymères, pouvant chélater un grand nombre d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ .

La protéine Casq2 interagit directement avec la triadine au niveau de résidus aspartates situés entre les acides aminés 354 et 367 (Shin et al. 2000), et avec la junctine. Via ces interactions avec la triadine et la junctine, Casq2 interagit donc au moins de façon indirecte avec RyR2, une interaction directe restant à ce jour hypothétique.

## ***B. La TVPC, une pathologie liée à des mutations de CASQ2***

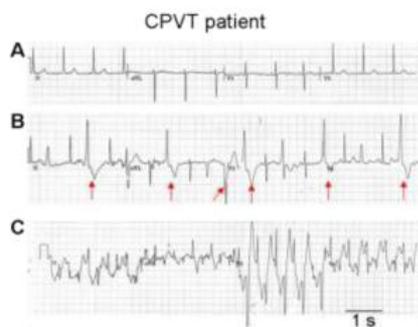
### **1. Aspects cliniques et paracliniques**

La tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique (TVPC) est un trouble du rythme cardiaque héréditaire responsable de morts subites chez l'enfant et l'adulte jeune. C'est une pathologie rare dont la prévalence est estimée à 1/ 10 000 (Liu et al. 2008).

Elle se caractérise par des syncopes à répétition causées par le stress adrénergique, c'est-à-dire à l'effort ou à l'émotion. Les symptômes peuvent être un malaise, des palpitations, des vertiges, voire un arrêt cardiorespiratoire. L'âge moyen de survenue des premiers symptômes

est de 8 ans. L'ECG de repos est la plupart du temps normal, le diagnostic se fait davantage lors d'une épreuve d'effort, ou lors d'un Holter ECG, qui vont pouvoir mettre en évidence des épisodes d'arythmie évocateurs (Figure 11). Lors d'une épreuve d'effort, une arythmie apparaît à l'effort à partir de 120 battements par minute, des extrasystoles apparaissent de façon sporadique, et on peut ensuite observer un épisode de tachycardie ventriculaire (TV) bidirectionnelle ou polymorphe.

**Figure 11 : Tracé électrocardiographique de tachycardie ventriculaire lors d'une épreuve d'effort (d'après Faggioni et al. 2012)**



- A : on observe un rythme sinusal en début de test.
- B : des extrasystoles commencent à apparaître.
- C : une tachycardie ventriculaire bidirectionnelle est mise en évidence.

Le traitement repose sur les  $\beta$ -bloquants au long cours. Le flécaïnide est également utilisé de façon efficace (Watanabe et al. 2009). La pratique sportive est contre indiquée, car étant un facteur de survenue d'arythmies. Dans les formes résistantes, la pose d'un défibrillateur implantable est à évoquer (Wilde et al. 2008). En l'absence de traitement, c'est une pathologie à pronostic péjoratif présentant une mortalité de 50% à 40 ans (Hayashi et al. 2009).

Un bilan familial est réalisé chez les apparentés d'un cas index diagnostiqué, comprenant un ECG, une épreuve d'effort et un Holter ECG. Une échographie est généralement réalisée pour éliminer d'autres étiologies.

## 2. Mécanismes physiopathologiques de la TVPC

Dans la TVPC, les dysfonctions du CRC seraient à l'origine de libérations anormales de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS, en l'absence de dépolarisation cellulaire. Cet événement est appelé libération spontanée de calcium (Priori and Chen, 2011). Ce phénomène, favorisé par la surcharge en  $\text{Ca}^{2+}$  du RS, est alors nommé libération de calcium induite par une surcharge du stock calcique (SOICR, Store Overload Induced  $\text{Ca}^{2+}$  Release).

En cas d'anomalies de fonctionnement des canaux RyR2, on observe des libérations inadaptées de calcium du RS pendant la diastole (canal « fuyant » en diastole) conduisant à une surcharge cytosolique (Figure 12). Une augmentation de la concentration cytosolique en calcium peut ainsi activer le courant entrant dépolarisant de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  et inhiber le courant potassique  $\text{I}_{\text{K1}}$ . Ce courant entrant est susceptible de dépolariser la membrane cellulaire après la fin du PA, produisant une post-dépolarisation tardive ou DAD (delayed afterdepolarization). Si le DAD atteint le seuil d'activation du canal sodique, il peut déclencher un PA. Cela se traduit par un courant transitoire entrant. Le seuil peut alors être atteint, et générer un courant sodique entrant. La dépolarisation résultante est appelée DAD et peut causer un PA si le seuil d'activation du canal sodique est atteint (Leenahrdt et al. 2012). Une extrasystole ou une arythmie peut dès lors être observée (Lacampagne et al. 2008).

### **Figure 12 : Mécanisme des DAD dans la TVPC.**

A : en situation normale, l'activité du RyR2 est négligeable au repos : la faible quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  libérée est rapidement repompée.

B : en cas d'anomalie (fuite de RyR2) : le  $\text{Ca}^{2+}$  libéré active l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  et peut déclencher un PA tardif (DAD) si le seuil d'activation du canal sodique est atteint.

Les mutations de RyR2 ou Casq2 associées à la TVPC favoriseraient le SOICR et les DADs selon plusieurs mécanismes. Les mutations de RyR2 pourraient par exemple être responsables de modification du seuil de sensibilité du canal au calcium. Les mutations de Casq2 pourraient entraîner une diminution du pouvoir tampon du calcium du RS, ainsi que des anomalies de régulation de RyR2, ou une instabilité structurale du CRC.

### **3. Aspects génétiques**

Le premier gène mis en cause dans les TVPC a été *RYR2*, associé à une forme autosomique dominante (Priori et al. 2001). Puis a été publiée une forme autosomique récessive de la maladie, impliquant le gène *CASQ2* (Lahat et al. 2001). Plus récemment, des mutations du gène *TRDN* ont été associées au phénotype de TVPC (Roux Buisson et al, 2012). Le gène *CALM1*, codant la calmoduline 1, a aussi été décrit comme pouvant être responsable de cette pathologie (Nyegaard et al. 2012).

D'autres gènes, *KCNJ2* codant un canal potassique, et *ANK2* codant une protéine du cytosquelette sont impliqués dans des formes de tachycardies ventriculaires pouvant mimer la TVPC (Jabbari et al. 2011, Tester et al. 2006).

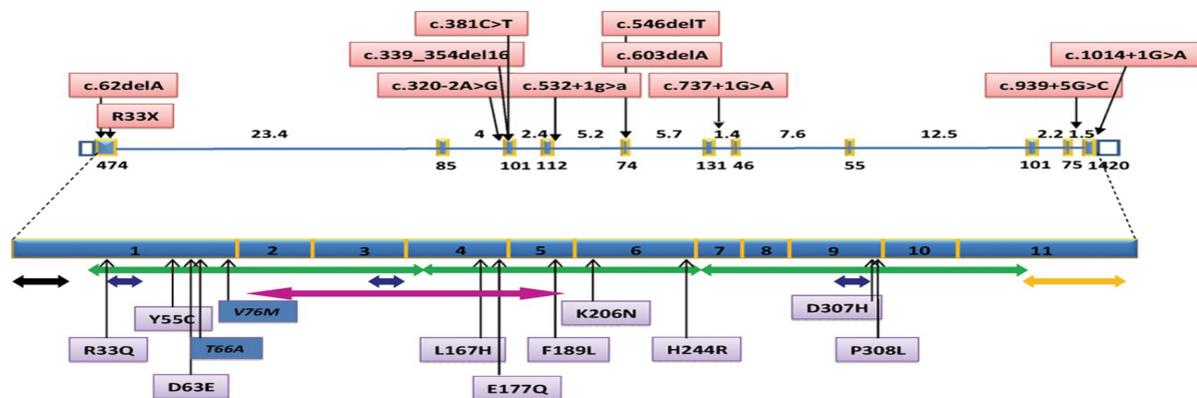
Les recommandations actuelles préconisent l'analyse de *RYR2* et *CASQ2* chez tout proband pour lequel une épreuve d'effort a posé le diagnostic ou une suspicion de TVPC (Ackerman et al. 2011). Si une mutation est retrouvée, il est recommandé de chercher la mutation familiale chez les apparentés du premier degré, associé à un bilan clinique et paraclinique. Les apparentés chez qui la ou les mutation(s) est (sont) retrouvée(s) peuvent bénéficier d'un traitement prophylactique par  $\beta$ -bloquants en raison du risque de survenue de mort subite.

Plus de 100 mutations ont été identifiées dans le gène *RYR2* tandis que les mutations identifiées dans le gène *CASQ2* sont plus rares avec une vingtaine de variations publiées à ce jour (Leenhardt et al. 2012).

Le mode de transmission de la TVPC associé à des mutations du gène *CASQ2* est autosomique récessif dans la quasi-totalité des cas, avec des cas d'homozygotie, souvent observés dans un contexte de consanguinité, et des cas d'hétérozygotie composite. De rares cas de forme autosomique dominante ont été suspectés cependant (de la Fuente et al. 2008 ; Kirchhefer et al. 2010).

La nature des mutations publiées pour *CASQ2* est variée, on trouve des mutations faux-sens, des mutations non-sens, des mutations d'épissage, ainsi que des microdélétions (Figure 13).

**Figure 13 : Mutations de *CASQ2* répertoriées dans la littérature (Leenhardt et al. 2012)**



Les mutations non-sens, les délétions et mutations affectant l'épissage donnant une protéine tronquée, sont en rouge, en haut. En bas, sont notées en violet les variations faux-sens, et en bleu deux polymorphismes

### **a) Mutations faux-sens**

Une dizaine de mutations faux-sens a été identifiée, toutes localisées au niveau des domaines thioredoxine-like. Certaines de ces mutations ont été particulièrement étudiées, et il a été montré qu'elles étaient associées à des anomalies de stockage de calcium dans le RS (Lahat et al. 2002, Terentyev et al. 2006, di Barletta et al. 2006, Kirchhefer et al. 2009).

### **b) Mutations d'épissage**

La plupart des mutations de *CASQ2* affectant l'épissage rapportées dans la littérature touche un des dinucléotides canoniques des sites d'épissage donneur (GT) ou accepteur (AG). C'est le cas des mutations c.532+1G>A (Postma et al. 2002), c.737+1G>A, c.1014+1G>A et c.320-2A>G (Roux-Buisson et al. 2011).

La mutation intronique c.939+5G>C située dans l'intron 9, et la mutation synonyme c.381C>T (p.=) située dans l'exon 3 étaient situées à l'extérieur des sites consensus d'épissage donneur (GT) et accepteur (AG). L'impact sur l'épissage de ces deux mutations était moins évident et a été étudié à l'aide d'un minigène d'épissage (Roux-Buisson et al. 2011).

### **c) Microdélétions**

Toutes les microdélétions décrites décalent le cadre de lecture et provoquent l'apparition d'un codon stop dans la protéine (c.62delA ; p.L23fs37\* (Postma et al. 2002) ; c.339\_354del ; p.S113Rfs\*6 (di Barletta et al. 2006) ; c.546delT ; p.F182Lfs\*28 (Hayashi et al. 2009).

### **d) Mutation non-sens**

Une seule mutation non-sens a été publiée, c.97C>T ; p.R33\* (Postma et al. 2002), entraînant l'apparition d'un codon stop prématuré très précoce en position 33.

### **III. Critères de pathogénicité et étude des variations nucléotidiques**

Les variations trouvées au cours du séquençage peuvent être de différentes natures. Il est établi que les mutations non-sens, les mutations d'épissage au niveau des sites consensus, les délétions et les insertions ont un impact fort, donnant une protéine tronquée non fonctionnelle, qui pourra être dégradée. L'ARN peut également être dégradé avant même la traduction par le nonsense mediated mRNA decay (NMD) (Schweingruber et al. 2013). Le caractère pathogène de ces variations est admis.

En revanche, les mutations faux-sens, les mutations synonymes ou les mutations introniques profondes sont d'interprétation plus délicate.

#### ***A. Variation faux-sens***

Le seul moyen d'affirmer la pathogénicité d'une mutation est l'étude fonctionnelle *in vitro* ou chez l'animal. Quand une variation a fait l'objet d'une étude fonctionnelle démontrant l'impact de la variation sur la protéine, la probabilité du caractère pathogène est forte. Dans le cas contraire, plusieurs critères sont utilisés pour évaluer a priori l'impact d'une variation de signification inconnue chez un patient. Le probable caractère bénin ou pathogène d'une variation faux-sens est basé sur les critères présentés ci-dessous.

##### **1. Prévalence de la mutation**

Une mutation est considérée comme plus probablement pathogène si elle est absente d'une population contrôle de 200 individus (400 chromosomes) pour une variation dominante, ou si elle est absente ou existe isolée à l'état hétérozygote pour une variation récessive. En pratique,

des bases de données (NCBI, 1000 Genomes Project, Exome Variant Server) sont utilisables à cet effet.

## **2. Ségrégation familiale**

L'étude la ségrégation familiale permet de savoir si la mutation est présente chez les membres d'une famille, et si sa ségrégation suit la survenue du phénotype chez les individus.

## **3. Degré de conservation de l'acide aminé**

Chaque acide aminé dans une protéine est soumis à la pression de sélection. Ainsi, il existe une très faible variabilité de certains acides aminés entre les différentes isoformes d'une protéine au sein d'une espèce, ou entre les espèces, quand il s'agit d'un domaine important pour que la protéine soit fonctionnelle. A l'inverse, certains domaines protéiques sont davantage polymorphes, et un changement d'acide aminé dans un de ces domaines n'aura généralement pas ou peu d'impact sur la fonction protéique.

## **4. Nature du changement physico-chimique de l'acide aminé**

Les acides aminés possèdent des propriétés différentes. Certains sont chargés positivement ou négativement, certains sont hydrophobes. Leur encombrement stérique est également différent. Ainsi, la nature du changement qui se produit en substituant un acide aminé par un autre est un argument pour interpréter le retentissement sur la fonction protéique.

## ***B. Mutations affectant l'épissage***

Il est décrit dans la littérature que 50% des mutations affectent l'épissage (Lopez-Bigas et al. 2005). Ces mutations peuvent se situer n'importe où dans le gène. Il peut s'agir de variations modifiant les sites consensus d'épissage, mais aussi de variations introniques profondes ou exoniques. Pour ces dernières, le mécanisme physiopathologique ne serait donc pas uniquement la modification de la séquence d'acide aminé de la protéine, mais bien l'épissage de l'ARN messager (ARNm).

La compréhension de l'impact sur l'épissage de variations nucléotidiques située hors des sites consensus donneurs et accepteurs n'est pas évidente à appréhender. Pour rendre le raisonnement plus simple, un rappel sur la physiologie de l'épissage est présenté en premier.

### **1. Physiologie de l'épissage**

L'épissage des pré-ARN messagers constitue une étape obligatoire pour la très grande majorité des transcrits primaires chez les eucaryotes. Il est sujet à de nombreuses variantes, ou épissages alternatifs, qui permettent l'assemblage de transcrits codant pour des protéines requises de manière transitoire ou traduisant une adaptation pathologique.

Il s'effectue de façon coordonnée avec la transcription et se déroule en deux étapes successives impliquant deux réactions de trans-estérification.

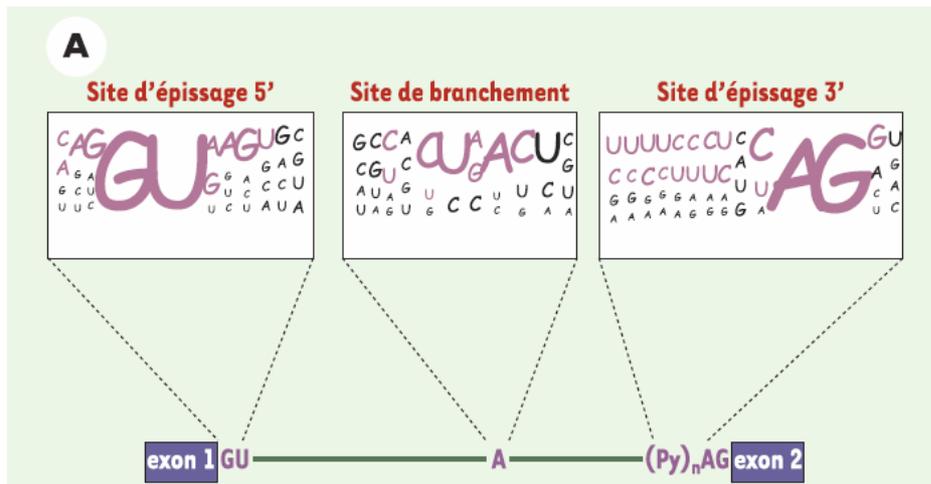
#### ***a) Les sites d'épissage***

Trois motifs sont nécessaires :

- le site donneur d'épissage : le dinucléotide GU en 5' de l'intron à exciser
- le site accepteur d'épissage : le dinucléotide AG en 3' de l'intron

- le site de branchement : le nucléotide A en amont du site 3' accepteur, lui-même suivi d'une séquence riche en pyrimidines (Yn) d'une longueur comprise entre 10 et 40 nucléotides.

**Figure 14 : Les zones consensus d'épissage (d'après Cartegni et al. 2002)**



Séquences consensus d'épissage des sites 5', 3', et du site de branchement. La taille des lettres est proportionnelle à la fréquence à laquelle on retrouve le nucléotide dans les zones consensus.

Les régions consensus sont ainsi définies comme :

- pour la région du site donneur 5' le dinucléotides GU, ainsi que les 3 nucléotides en amont, et les 5 nucléotides en aval pour un total de 11 nucléotides
- pour la région du site accepteur 3' : le dinucléotide AG, ainsi que les 10 nucléotides en amont, et les 2 nucléotides en aval pour un total de 14 nucléotides

### ***b) Le spliceosome***

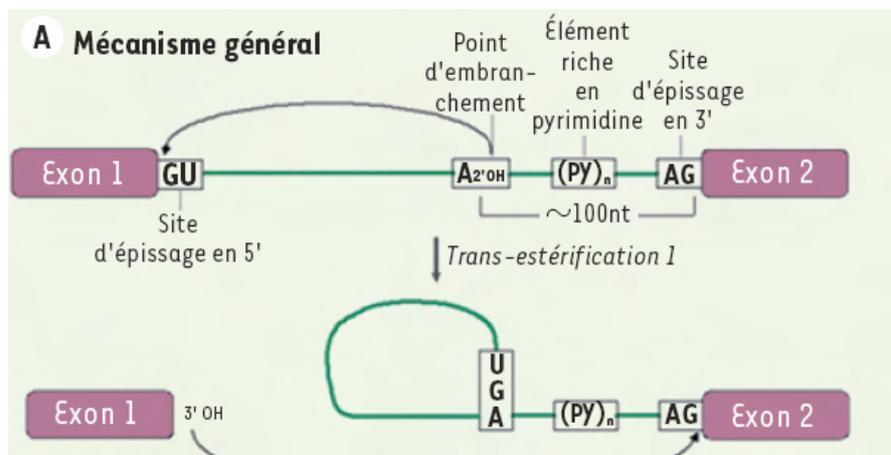
Cette réaction a lieu au sein du spliceosome, un complexe dont l'assemblage et le fonctionnement requièrent plus de 150 polypeptides et cinq ribonucléoprotéines, les snRNP (small nuclear ribonucleoproteins). Le spliceosome a deux fonctions : la reconnaissance des sites d'épissage et les étapes couplées d'élimination des introns et de ligation des exons. Plusieurs familles de protéines jouent un rôle majeur parmi lesquelles les protéines SR

(Serin/arginin Rich), hnRNP (heterogenous nuclear ribonucleoproteins) et CELF (CUG-binding protein and embryonic lethal abnormal vision-type RNA-binding protein 3-like factors).

### c) *Le mécanisme d'épissage*

La réaction d'excision-épissage d'un pré-ARNm se déroule en deux étapes successives, impliquant chacune une réaction de trans-estérification (Figure 15). Lors de la première étape, le groupement 2' hydroxyle de l'adénosine du site de branchement attaque le phosphate du site d'épissage 5'. Cette réaction engendre un exon 5' libre et un lasso intermédiaire. Lors de la deuxième étape, le 3' hydroxyle de l'exon 5' attaque le phosphate du site d'épissage 3', produisant ainsi l'ARNm et le lasso d'intron.

**Figure 15 : Mécanisme général de l'épissage** (Cartegni et al. 2002).



Une première réaction de transestérification par le point de branchement sur le site donneur 5' libère ce dernier et permet la deuxième réaction de transestérification sur le site accepteur 3'. La ligation des deux exons s'accompagne de la libération du lasso intronique.

### ***d) La régulation de l'épissage***

La reconnaissance des sites d'épissage n'est pas suffisante pour que le spliceosome s'assemble, des séquences régulatrices sont nécessaires, qu'elles soient activatrices (ESE pour Exonic Splicing Enhancer, ISE pour Intron Splicing Enhancer) ou inhibitrices (ESS pour Exonic Splicing Silencer, ISS pour Intron Splicing Silencer).

Les ESE constituent des séquences exoniques sur lesquelles des protéines régulatrices de l'épissage se fixent, dont la famille la plus connue est celle des protéines SR (Serine/arginine rich). Les protéines de cette famille présentent des structures communes : un ou deux motifs reconnaissant l'ARN pré-messager (RRM : RNA Recognition Motif) et un domaine carboxy-terminal riche en sérine-arginine (domaine SR). Le domaine RRM se fixe à l'ARN, et le domaine SR recrute directement ou indirectement des composants de la machinerie d'épissage (Black, 2003).

## **2. Méthodes d'études des mutations d'épissage**

Les mécanismes fondamentaux de l'épissage peuvent donc être altérés par exemple quand une substitution nucléotidique survient, c'est-à-dire en cas de mutation faux-sens, synonyme, ou non-sens. Une modification d'un site consensus aura pour conséquence une non-reconnaissance de ce site, et un intron peut ne pas être épissé. Quand un site consensus n'est pas reconnu, c'est un autre site en amont ou en aval qui sera utilisé à la place. Ce site alternatif peut être le site consensus de la jonction intron/exon suivante, on parle alors de saut d'exon. Il est également possible qu'un site cryptique soit utilisé à la place d'un site consensus, ce qui peut conduire à une rétention d'un fragment intronique, ou à la perte d'un fragment exonique. L'anomalie d'épissage peut entraîner une modification importante de la séquence protéique ou un décalage du cadre de lecture responsable de l'apparition d'un codon stop prématuré. La conséquence est une modification importante de la séquence protéique

donnant une protéine tronquée (ou trop longue en cas de rétention intronique sans décalage du cadre de lecture), qui sera dysfonctionnelle, ou bien dégradée. En cas de codon stop prématuré, le mécanisme de nonsense mediated mRNA decay (NMD) peut entraîner la dégradation de l'ARNm, empêchant la synthèse protéique (Green et al. 2003).

Il existe plusieurs moyens d'étude de l'épissage. Le test de référence est l'étude du transcrit *in vivo*. Pour cela, il est nécessaire d'obtenir un prélèvement tissulaire, où l'expression du gène étudié est effective. L'ARN peut ensuite être directement extrait, puis étudié par RT-PCR et séquencé afin de rechercher un transcrit aberrant. Une fois l'anomalie identifiée au niveau de l'ARN, il faut identifier au niveau génomique la variation responsable de l'altération de l'épissage. Il n'est malheureusement pas toujours possible d'obtenir une biopsie pour toutes les études. En effet, s'il est aisé de réaliser un prélèvement sanguin quand l'expression du gène d'intérêt se fait au niveau leucocytaire, certains gènes peuvent n'avoir par exemple qu'une expression cardiaque, ou cérébrale. La question de la balance bénéfique/risque d'un tel prélèvement se pose alors.

Des approches indirectes ont donc été développées, comme l'analyse *in silico*, qui consiste en l'analyse bioinformatique de l'effet d'une variation sur l'épissage. Des algorithmes ont été créés en fonction des séquences consensus répertoriées, et utilisent des scores permettant d'évaluer l'impact d'un variant sur l'épissage, de façon prédictive.

L'étude de l'épissage *in vitro* par minigène se développe de plus en plus. Elle repose sur l'utilisation d'une série de 3 exons flanqués de quelques centaines de base d'intron, insérée dans un plasmide. La mutation d'intérêt est induite, puis le plasmide est transfecté dans des cellules en culture. Les transcrits sont ensuite extraits, puis leur taille est étudiée grâce à une RT-PCR suivie d'une migration sur gel d'agarose. L'utilisation du minigène est également

utilisé comme complément après étude de transcrits car elle permet d'affirmer que la variation induite est bien responsable de l'altération de l'épissage.

## Objectifs du projet

L'objectif de mon travail a été d'étudier les variants du gène *CASQ2* identifiés au laboratoire de Biochimie Génétique et Moléculaire du CHU de Grenoble.

Dans une première partie, j'ai recensé les différentes mutations dans ce gène, identifiées au laboratoire de 2007 à 2013.

Je me suis particulièrement intéressé à étudier l'impact potentiel sur l'épissage des variations du gène *CASQ2*. En effet, la détermination de l'impact sur l'épissage de toute variation est primordiale en clinique, en particulier les variations de signification inconnue comme les variations synonymes, faux-sens ou introniques profondes dont le caractère pathogène peut être alors mieux défini. Cette étude a été réalisée *in silico* pour l'ensemble des mutations répertoriées et complétées par une analyse à l'aide système de minigène pour la variation intronique c.838+88T>G.

Dans une seconde partie, j'ai entrepris l'étude fonctionnelle d'une variation faux-sens c.44C>G ; p.S15C située dans la partie codant pour le peptide signal, dont la caractérisation était particulièrement intéressante car il s'agit de la première variation du gène *CASQ2* situé dans cette région de la protéine à ma connaissance. De plus, très peu de données sont disponibles dans la littérature concernant les mutations localisée au niveau d'un peptide signal en pathologie humaine. Les hypothèses physiopathologiques de départ qui ont été posées pour ce travail reposent sur un défaut de reconnaissance de la séquence du peptide signal par différents acteurs : i) soit par la protéine SRP, ce qui entraînerait un défaut d'adressage de la protéine vers le RS, ii) soit par l'endopeptidase, ce qui pourrait altérer le clivage du PS et

perturber le trafic de la protéine, ou sa maturation et donc ses propriétés biochimiques, comme sa capacité à se polymériser.

Pour confirmer ou invalider ces hypothèses, j'ai cloné au préalable l'ADN complémentaire (ADNc) de *CASQ2* dans un plasmide d'expression, puis recherché un éventuel défaut d'adressage de la protéine ou une dégradation de la protéine par différentes études de localisation en immunofluorescence et différentes études biochimiques.

## **MATERIELS ET METHODES**

## **I. Population et patients**

Les patients inclus dans cette étude correspondent aux probands qui ont été explorés pour le gène *CASQ2* entre les années 2007 et 2013 au laboratoire de Biochimie Génétique et Moléculaire du CHU de Grenoble. Ce sont des patients pour qui le diagnostic de TVPC était posé ou fortement suspecté, principalement adressés des centres de référence nationaux (CNR) des troubles du rythme cardiaques d'origine héréditaire (Paris, Lyon, Nantes).

## **II. Méthode de séquençage génomique**

Après extraction de l'ADN leucocytaire à partir d'un prélèvement de sang périphérique, les régions exoniques codantes du gène *CASQ2* et les bornes introniques ont été analysées par PCR séquençage.

### **A. Extraction d'ADN**

A partir de sang sur tube EDTA, un culot de leucocytes est obtenu par lyse hypotonique des hématies. L'ADN leucocytaire est extrait selon la méthode au chlorure de guanidine : les leucocytes sont lysés par de chlorure de guanidine en présence de protéinase K, puis l'ADN est précipité en présence d'éthanol, et dissout dans un tampon Tris-EDTA (Tris-HCl 10mM pH 7.4 ; EDTA 1mM pH 8). Une quantification par spectrophotométrie est ensuite réalisée (Nanodrop 2000c, ThermoFisher Scientific) par mesure de l'absorbance à 260nm. La contamination protéique est également évaluée par la mesure de l'absorbance à 280nm et le rapport des densités optiques (DO) suivant :  $DO\ 260 / DO\ 280$ . Enfin, la pureté est estimée en mesurant l'absorbance à 230nm et par le rapport  $DO260 / DO\ 230$ .

Les ratios optimaux pour un ADN extrait de bonne qualité sont  $DO\ 260 / DO\ 280 > 1.80$  et  $DO\ 260 / DO\ 230 = 2.20$ .

## **B. Amplification**

Une étape d'amplification de fragments d'intérêt est ensuite réalisée par Polymerase Chain Reaction (PCR) grâce des amorces spécifiques (séquences des amorces en annexe 1).

Le mix de PCR est réalisé de la manière suivante :

- 1 $\mu$ L d'ADN du patient (ADN à 50ng/ $\mu$ L)
- 0,1 $\mu$ L amorce sens (100pM)
- 0,1 $\mu$ L amorce anti-sens (100pM)
- 2,5 $\mu$ L tampon 10X
- 2,5 $\mu$ L dNTPs (2mM)
- 0,05 $\mu$ L Taq Qiagen
- 18,75 $\mu$ L H<sub>2</sub>O

La PCR est programme selon le schéma suivant:

- Dénaturation initiale : 95°C 5min
- Amplification (30 cycles) : 94°C 30sec, X°C 30sec, 72°C 1 min (X est la température d'hybridation des amorces)
- Elongation finale : 72°C 5 min

Les caractéristiques des amorces utilisées sont indiquées dans le tableau 1.

**Tableau 1 : Conditions d'utilisation des amorces utilisées.**

Exon	Amorces PCR	Taille amplifiat (pb)	Nb de cycles	Température d'hybridation (°C)	Amorce de séquençage
1	1 F/R	599	30	60	1R
2	2 eF/Rb	329	30	60	2eF
3	3 eF/eR	304	30	60	3eF
4	4F/R	298	30	60	4F
5	5 eF/eR	483	30	60	5eF
6	6 Fe/R	319	30	60	6eF
7	7 Fb/Rb	374	30	60	7Rb
8	8 F/R	260	30	60	8F
9	9 Fe/Re	508	30	60	9Fe
10	10 F/R	361	30	60	10F
11	11F/R	476	30	60	11F

Les produits de PCR sont contrôlés par migration sur un gel d'agarose. Préalablement à la réaction de séquence, une purification des produits d'amplification permet l'élimination des amorces et des dNTP en utilisant une exonucléase et une phosphatase alcaline (ExoSAP-IT, Affymetrix) selon le protocole qui suit : 1µL d'ExoSAP-IT est ajouté à 5µL d'amplifiat et incubé à 37°C pendant 15 minutes, puis les enzymes sont inactivées à 80°C pendant 15 minutes.

### ***C. Réaction de séquence***

La réaction de séquençage est réalisée à l'aide d'amorces de séquençage (tableau 2), de dNTP non marqués, de ddNTPs marqués par un fluorophore, et d'une polymérase.

A l'amplifiat purifié (de 0.5 à 6µL selon la qualité de l'amplification) sont ajoutés 1.6µL d'amorce de séquençage à 2pmol/µL, et 2.25µL de réactif BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit contenant les dNTPs, les ddNTPs\* marqués par un fluorophore, et la polymérase (Applied Biosystem). De l'eau complète ce mix pour un volume total de 10µL.

Le programme de réaction de séquence comprend une dénaturation initiale (1 min à 96°C) suivie de 25 cycles de réaction de séquence (10 sec à 96°C, 5 sec à 50°C, 4 min à 60°C).

Les produits de réaction de séquence sont purifiés afin d'éliminer les réactifs en excès. On incube 15 minutes à température ambiante un mélange composé du produit de réaction de séquence avec 1µL d'EDTA 125 mM, 1µL d'acétate de sodium 3M, 50µL d'éthanol à 100%.

Après une centrifugation à 2000g à 4°C de 45 minutes, le surnageant est éliminé par retournement et une brève centrifugation. Le culot est repris par 65µL d'éthanol à 70%, homogénéisé par vortex et centrifugé à 1650g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot est séché 15 minutes à température ambiante, puis repris par 15µL de Hi-Di formamide (Applied Biosystem), compatible avec la migration électrophorétique.

### ***D. Electrophorèse capillaire***

Les échantillons sont ensuite introduits sur une plaque 96 puits, et chargés sur un séquenceur ABI Prism 3130XL (Applied Biosystem) où une électrophorèse capillaire est réalisée, et un électrophorégramme est recueilli sous forme de pics de fluorescence. Un logiciel (Seqscape V2.5, Applied Biosystem) permet la comparaison des électrophorégrammes recueillis avec des séquences de référence.

### III. Etude de l'épissage

#### A. Etude bioinformatique

L'Association Nationale des Praticiens de Génétique Moléculaire (ANPGM) a mené une étude collaborative sur l'utilisation d'outils de prédiction informatiques de mutations d'épissage et leur interprétation. Elle propose des recommandations selon la localisation de la variation.

#### 1. Variants situés dans les zones consensus d'épissage 5' et 3'

Pour ces variants, l'algorithme décisionnel ci-dessous est proposé (Figure 16). Cet algorithme concerne l'étude de variants situés en zone consensus d'épissage, c'est-à-dire au niveau des dinucléotides invariants AG ou GT, ou des nucléotides à proximité intervenant dans la reconnaissance du site physiologique par la machinerie d'épissage. Une modification d'un nucléotide dans cette région est susceptible d'entraîner une perte de la reconnaissance du site physiologique lors de l'épissage et d'entraîner des aberrations d'épissage.

**Figure 16 : Etude de variants situés en zone consensus (D'après Houdayer et al. 2012).**



Comme indiqué figure 17, l'ANPGM recommande l'utilisation du logiciel MaxEntScan (MES) (disponible sur <http://www.umd.be/HSF/>), pour étudier la probabilité d'impact sur un site d'épissage d'une variation située à proximité. Ce logiciel prédit l'abolition d'un site physiologique avec une sensibilité de 96%, si on suit l'algorithme proposé. Le logiciel va comparer la force du site physiologique au niveau de la séquence sauvage (séquence génomique sans la variation) avec la force du site physiologique au niveau de la séquence porteuse du variant étudié. On considère que la variation est à risque d'abolir le site consensus physiologique d'épissage si le score du site étudié est affaibli d'au moins 15% plus faible par la variation.

La prédiction n'est exploitable que si le score du site d'épissage physiologique au niveau de la séquence sauvage est suffisamment élevé, c'est-à-dire supérieur au seuil de robustesse. Le seuil de robustesse est calculé comme la moyenne des scores de tous les exons du gène, à laquelle on soustrait 2 écarts-types. Si le score du site physiologique est trop faible, c'est-à-dire inférieur à la moyenne des scores - 2 écarts-types, la prédiction est considérée comme manquant de fiabilité. Si le score du site physiologique est suffisamment élevé, c'est-à-dire supérieur au seuil de robustesse, la prédiction est considérée comme fiable.

En plus du logiciel MaxEntScan, l'ANPGM propose d'utiliser de façon optionnelle le logiciel SpliceSiteFinder (SSF) pour affiner la spécificité du test. On considère que le logiciel SSF prédit que la variation est à risque d'abolir le site physiologique si le score du site étudié est affaibli d'au moins 5% par la variation. Ce site n'étant plus disponible, le logiciel Alamut (<http://www.interactive-bioinformatics.com/>) a été utilisé car il dispose d'une matrice « SpliceSiteFinder-like ».

Quand une abolition d'un site était prédite, j'ai utilisé le logiciel Cryp skip (<http://cryp-skip.img.cas.cz/>) pour prédire l'effet de l'abolition d'un site naturel (saut d'exon versus utilisation d'un site cryptique).

Si les logiciels prédisent un impact de la variation étudiée sur l'épissage, l'ANPGM considère qu'il est légitime de poursuivre l'étude de la variation avec une analyse de transcrits ou une étude par minigène. C'est ce qui a été fait pour la variation c.939+5G>C, antérieurement à ce travail.

## **2. Variants situés en dehors des zones consensus d'épissage**

Pour la création de site *de novo*, le groupe recommande un score d'une valeur au minimum égale à 80% de la valeur du site physiologique correspondant.

J'ai choisi ici les logiciels Human Splicing Finder (HSF) (<http://www.umd.be/HSF/>), qui combine des matrices différentes (HSF, MES, et des matrices analysant les séquences régulatrices (ESE, ESS)) et NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>).

L'analyse des séquences régulatrices (ESE, ESS) via les logiciels de prédiction n'est pas recommandée tant qu'une cartographie précise n'a pas été établie pour chaque gène d'intérêt (Doktor et al. 2011). De même, il n'est pas recommandé à ce jour de suivre les prédictions concernant les points de branchement, en raison d'une dégénération du motif et d'un manque de données (Corvelo et al. 2010). Ces analyses ne sont donc pas présentées dans les résultats.

## ***B. Etude par minigène de la variation c.838+88T>G***

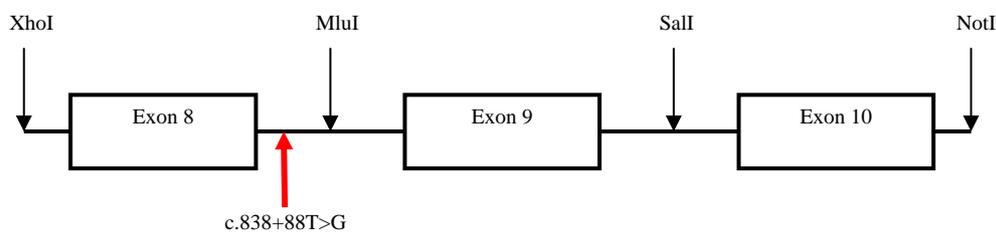
### **1. Mutagénèse dirigée**

Le minigène utilisé a été choisi de manière à inclure la région de l'intron 8 du gène *CASQ2* où se situe le nucléotide c.838+88T afin de pouvoir étudier l'effet de la substitution

c.838+88T>G. Pour inclure la majorité des facteurs régulateurs de l'épissage, le minigène contient plus de 200 nucléotides des séquences introniques en amont et en aval de chaque exon inclus dans le minigène. Le minigène est constitué de la succession de trois exons avec leurs bornes introniques pour chacun (Figure 17). Un système de cassette a été conçu avec des sites de restriction présents dans la séquence à chaque extrémité des séquences introniques pour faciliter l'insertion de la séquence à étudier si nécessaire.

Le minigène a été inséré dans un plasmide d'expression de mammifère, pCI-neo.

**Figure 17 : Représentation schématique du minigène de CASQ2.**



Le minigène comporte les exons 8, 9 et 10 du gène *CASQ2*. Il est constitué de 3 exons, séparés par 200 paires de bases introniques. Des sites de restrictions se trouvent entre chaque exon, permettant une excision ciblée, et l'introduction de l'exon désiré. La flèche rouge indique la localisation de la variation c.838+88T>G.

J'ai introduit la variation c.838+88T>G par mutagenèse dirigée à l'aide du kit Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit II XL selon les recommandations du fabricant, en utilisant les amorces de mutagenèse sens T88G\_F et anti-sens T88G\_R, choisies à l'aide du logiciel QuikChange Primer Design Program ([www.agilent.com/genomics/qcpd](http://www.agilent.com/genomics/qcpd)) (Tableau 2).

**Tableau 2. Amorces utilisées pour la mutagenèse c.838+88T>G.**

<b>Séquence de référence génomique</b>	5' - CCTCACCTTTCTCTTCTCTCACAT <u>CCC</u> ATCCACAAT - 3'
<b>Amorce T88G_F</b>	5' - CCTCACCTTTCTCTTCTCTCACAG <u>CCC</u> ATCCACAAT - 3'
<b>Amorce T88G_R</b>	5' - GGAGTGGAAAGAGAAGAGAGTGT <u>C</u> GGGTAGGTGTTA - 3'

## **2. Culture cellulaire et transfection**

Des cellules HEK-293 (Human Embryonic Kidney) ont été cultivées en milieu DMEM, 10% SVF (Serum de veau fœtal), 1% Pénicilline-Streptomycine, à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Elles ont été utilisées pour être transfectées avec le plasmide pCI-neo contenant le minigène contenant la séquence sauvage ou porteuse de la variation c.838+88T>G. La transfection a été réalisée selon les recommandations du fabricant à l'aide du kit Exgen®, en utilisant 5µg d'ADN, pour 600 000 cellules en P35.

## **3. Extraction d'ARN, transcription inverse et PCR**

Quarante-huit heures après transfection, les cellules ont été récoltées après avoir été trypsinées, puis lavées à l'aide de PBS (centrifugation à 800 rpm). Le culot cellulaire a été repris dans 50 µl de Trizol puis l'ARN a été extrait à partir du culot cellulaire, en utilisant le kit PureLink RNA Mini® (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant. La concentration d'ARN a été déterminée par spectrophotométrie à l'aide d'un Nanodrop 2000c (ThermoFisher Scientific). Une transcription inverse a été réalisée comme suit : à partir de 500ng d'ARN total, une hybridation à 500ng d'oligodT est réalisée pendant 5 minutes à 65°C. Les échantillons sont incubés sur glace, puis après ajout de 4µL de tampon 5X, de 2µL de dNTP (10mM), de 0.5µL de RT Transcriptor® (Roche), et de 0.5µL de RNase inhibitor (Roche), une élongation de 30 minutes à 55°C est faite. A partir de l'ADN complémentaire obtenu, le cDNA spécifique de l'ARN issu de l'épissage du minigène a été amplifié pour comparer la taille des transcrits obtenus à partir du minigène sauvage et du minigène muté. La PCR a été réalisée en utilisant un couple d'amorces plasmidiques pCINEO F et R, bornant le minigène (séquence en annexe 2) et avec le programme suivant : dénaturation initiale à 95°C 5min, puis 35 cycles d'amplification (94°C 30sec, 56°C 30sec, 72°C 1 min) suivie d'une élongation finale à 72°C 5 min.

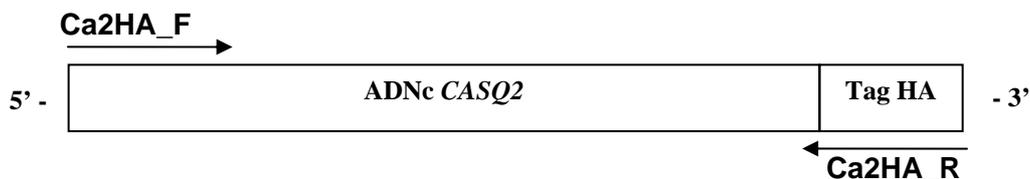
## IV. Etude de la variation c.44C>G ; p.S15C

### A. Clonage du cDNA de CASQ2 tagué hémagglutinine (HA)

L'ADNc de *CASQ2* avait été préalablement amplifié à partir de tissu cardiaque humain avant le début de ce travail dans un plasmide d'expression bactérien, pCR2.1, à l'aide des amorces Ca2rnaF et Ca2rnaR (Annexe 3). Ce travail avait été réalisé en vue du sous-clonage de *CASQ2* dans le plasmide d'expression de cellules de mammifère pcDNA3.1 que j'ai réalisé pour permettre des études d'expression ultérieures.

Pour sous-cloner le cDNA de *CASQ2* dans pcDNA3.1, j'ai conçu des amorces permettant : i) d'amplifier la séquence codante de l'ADNc à partir de la construction existante dans pCR2.1, ii) d'insérer une séquence KOZAK en 5'UTR, pour optimiser les conditions d'expression par transfection iii) d'ajouter une étiquette hémagglutinine en 3' (HA) pour faciliter la détection de la protéine (Figure 18).

**Figure 18 : Dessin de la construction contenant le cDNA de CASQ2.**



Le cDNA de *CASQ2* a été amplifié avec les amorces Ca2HA F et R avec insertion d'un tag HA (séquence en annexe 4).

L'amplification a été réalisée à partir de 100 ng d'ADN (matrice contenant la séquence codante de *CASQ2* dans pCR2.1) en utilisant 1µL de chaque amorce à 10µM, 0.2µL de polymérase de type Taq (Qiagen), 2.5µL de tampon 10x (Qiagen), 2.5µL de dNTP, et de l'eau pour un volume total de 25µL. La PCR a été réalisée selon le schéma suivant :

- dénaturation initiale : 95°C pendant 10 minutes
- 30 cycles d'amplification (94°C 30 sec, 60°C 30 sec, 72°C 1 min)
- élongation finale : 72°C pendant 10 minutes.

Le produit d'amplification a été contrôlé sur gel et intégré dans le plasmide pCR2.1-TOPO à l'aide du kit TOPO-TA Cloning® (Invitrogen). Le plasmide pCR2.1 contenant l'ADNc de *CASQ2* a ensuite été amplifié par transformation bactérienne (bactéries Oneshot TOP 10). 2µL ont été incubés, sur glace, avec les bactéries compétentes pendant 20 minutes, puis un choc thermique à 42°C pendant 30 secondes a été effectué. Puis les bactéries ont été incubées pendant 60 minutes dans un milieu de culture non sélectif (SOC), à 37°C, et sélectionnées sur une gélose contenant de la kanamycine qui est un des antibiotiques de résistance du vecteur pCR2.1-TOPO. Les géloses ont été mises à l'intérieur d'une étuve à 37°C pendant 14 heures puis 20 colonies ont été repiquées dans un milieu de culture liquide (LB avec adjonction de kanamycine) pendant encore 14 heures. L'extraction a été réalisée grâce à un kit Miniprep (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. A cette étape, un séquençage a été fait par l'entreprise GATC, en utilisant des oligonucléotides commerciaux du plasmide situé de part et d'autre de la localisation de l'insert (T7F, M13R).

Un sous-clonage du cDNA de *CASQ2* tagué HA dans le plasmide d'expression de mammifère pcDNA3.1 a ensuite été réalisé.

15 µL de plasmide pCR2.1 contenant la séquence sauvage de *CASQ2* et 1.6µL de plasmide pcDNA3.1 ont d'abord subi une double digestion (enzymes de restriction : KpnI, XbaI, buffer BamHI, Fermentas) pendant 2 heure à 37°C. Les produits de digestion ont été déposés sur un gel d'acrylamide pour être purifiés et les bandes d'intérêt extraites du gel à l'aide du kit Nucleospin Extract II (Clontech). Les produits purifiés ont été contrôlés sur gel puis une ligation a été réalisée grâce au Rapid DNA Ligation Kit (Roche), utilisé selon les recommandations du fabricant. Enfin, les produits de ligation ont été amplifiés par transformation bactérienne et les plasmides extraits par Miniprep® (Qiagen).

## ***B. Mutagenèse dirigée***

Une mutagenèse dirigée a été réalisée comme décrit précédemment, à l'aide du kit Quikchange II XL Site-directed Mutagenesis (Stratagene) et du logiciel QuikChange Primer Design (Agilent) pour dessiner les amorces. Cette mutagenèse dirigée a été réalisée pour induire la mutation p.S15C, différente d'un seul AA de la séquence sauvage, afin d'étudier l'impact de cette variation.

Les constructions plasmidiques pcDNA3.1 contenant la séquence sauvage du cDNA de *CASQ2* et la séquence mutée p.S15C ont été vérifiées par digestion enzymatique et séquençage.

## ***C. Culture cellulaire et transfection***

Les lignées cellulaires COS-7 (dérivées de rein de singe) et HEK-293 (Human embryonic kidney) ont été cultivés à 37°C avec enrichissement à 5% en CO<sub>2</sub>, avec un milieu DMEM (Gibco), contenant 10% de SVF et 1% de pénicilline-streptomycine.

Pour les études d'immunofluorescence, les cellules COS-7 ont été transfectées à l'aide du kit Exgen® (Euromedex) avec 200 000 cellules par P35 contenant des lamelles, et 3µg d'ADN par échantillon.

Pour les études en immunoblot, les cellules HEK 293 ont étéensemencées dans des P60 (1 million de cellules par boîte). Un protocole de transfection en phosphate de calcium a été utilisé : 7.5µg d'ADN sont mélangés à 23µL de CaCl<sub>2</sub> (250mM final) et d'eau pour un volume total de 185µL. Puis le même volume d'un tampon HBS2x est ajouté au goutte-à-goutte sur agitation au vortex, et le mélange déposé sur les cellules en culture.

## ***D. Anticorps utilisés***

Les anticorps primaires et secondaires utilisés sont résumés dans les tableaux 3 et 4.

**Tableau 3 : Anticorps primaires**

Cible	Espèce	Dilution IF	Dilution IB	Dilution IP	Origine
HA	Souris	1/300	1/2 000	/	Cell Signaling
Calnexine	Lapin	1/500	/	/	Enzo
Giantine	Lapin	1/2 000	/	/	Abcam
Casq2	Lapin	/	/	Pur	Thermoscientific

IF : Immunofluorescence / IB : Immunoblot / IP : Immunoprécipitation

**Tableau 4 : Anticorps secondaires**

Cible	Couplage	Dilution IF	Dilution IB	Origine
Souris	Alexa 488	1/1 000	/	Invitrogen
Lapin	Cyanine 3	1/1 000	/	Invitrogen
Souris	HRP	/	1/10 000	Jackson
Lapin	HRP	/	1/10 000	Jackson

HRP : Horse Radish Peroxydase

## ***E. Immunofluorescence***

L'étude de localisation de la protéine Casq2 a été réalisée en immunofluorescence, à l'aide d'anticorps anti-HA. Des co-immunomarquages ont été réalisés avec un anticorps anti-calnexine, comme marqueur du reticulum endoplasmique et anti-giantine, comme marqueur du cis-Golgi. Après culture et 24h de transfection, les cellules COS-7 ont été lavées en PBS puis fixées pendant 6 minutes, à -20°C, avec du méthanol stocké à -20°C, puis les cellules ont à nouveau été lavées en PBS. Les lamelles ont été incubées avec les anticorps primaires dilués dans du PBS avec 5% de serum de chèvre (GS) pendant 2 heures. Après 3 lavages successifs

en PBS-GS 5%, l'incubation avec les anticorps secondaires a été réalisée. Les lamelles ont été lavées en PBS, et rincées à l'eau avant d'être montées sur lame.

## ***F. Etudes biochimiques***

### **1. Lysats cellulaires**

Après 24 heures de transfection, les cellules ont été lavées en PBS puis lysées grâce à un tampon RIPA (NaCl : 1.75g, NP-40 :2mL, SDS20% :1mL, deoxycholate : 2g, Tris 1M pH=7.6 :5mL, et de l'eau pour un volume de 200mL) pendant 15 minutes sur glace, puis les boîtes ont été récoltées mécaniquement par grattage et transférées dans un tube de 1.5mL. Après une centrifugation, le surnageant a été récolté et rapidement congelé à -20°C.

Les lysats protéiques ont été dosés selon la méthode de Folin-Lowry : les échantillons, ainsi qu'une gamme de BSA de concentration connue, sont mélangés à du SDS, un réactif cuproalcalin, puis au réactif de Folin (Sigma-Aldrich). Après une incubation de 45 minutes à l'obscurité, l'absorbance à 660 nm est mesurée et les concentrations protéiques calculées.

### **2. Immunoblot**

Les échantillons de lysats cellulaires ont été portés à ébullition pendant 3 minutes avec un tampon de dénaturation avant d'être chargés (20µg) sur un gel de polyacrylamide à 8% pour la migration (90V, voltage constant). Puis un transfert a été réalisé sur glace, à ampérage constant (200mA pendant 90 minutes) sur une membrane de nitrocellulose. La membrane a été incubée pendant 30 minutes dans un tampon TBS-Tween 0.05% (50mM Tris-HCl, pH=7.6, 150mM de NaCl, Tween20 à 0.05%) contenant 5% de lait pour permettre une saturation de la membrane. Elle a ensuite été incubée sur la nuit, à 4°C, avec agitation, avec

l'anticorps primaire. Après lavages, la membrane a été incubée avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase pendant 2 heures et lavée. Les protéines reconnues par les anticorps sont révélées par un substrat chimiluminescent de la peroxydase (Pierce ECL WesternBlotting substrate, Thermo Scientific) pendant 5 minutes et l'image enregistrée à l'aide d'un imageur Chemidoc XRS® (BioRad) après 10 minutes d'exposition.

### **3. Etude de glycosylation**

Des cellules HEK-293 ont été transfectées avec le plasmide pCDNA3.1 contenant la séquence de *CASQ2* sauvage ou mutée, ou un plasmide pVSV-G ts045, utilisé comme contrôle de l'action de l'endoglycosidase dans cette expérience. En effet, ce plasmide contient une séquence codante pour une protéine thermosensible du virus de la stomatite vésiculaire : VSV-G, couplée à la Green Fluorescent Protein (GFP). Cette dernière a pour particularité d'être mal repliée à 40°C et d'être retenue dans le RE, la rendant accessible à l'action de l'endoglycosidase H.

Les transfections ont été réalisées comme décrit précédemment, à la différence des températures d'incubation. Pour pCDNA3.1, l'incubation s'est faite à 37°C. Pour pVSV-G ts045, l'incubation s'est faite 16h à 40°C. Puis pendant les 2 dernières heures, une boîte a été incubée à 40°C, et l'autre à 32°C. Les lysats ont ensuite été récoltés. Les échantillons ont été traités à l'endoglycosidase H (Endoglycosidase H, Roche) selon le protocole suivant : 15µg de protéines ont été dilués au 1/5<sup>e</sup> dans du PBS (pH=5.5), puis incubés avec 1µL d'endoglycosidase pendant 1 heure, avant d'être portés à ébullition avec un tampon de dénaturation, pour être analysés en SDS-PAGE.

#### **4. Etude de polymérisation**

Après 24h de transfection, les cellules HEK-293 ont été remises en suspension grâce une incubation à 37°C de 5 minutes avec 1mL de trypsine, et l'ajout de 9mL de milieu de culture pour stopper l'action de l'enzyme. Les cellules ont été centrifugées à 800rpm pendant 5 minutes. Le surnageant a été éliminé, et remplacé par 14mL de PBS afin de remettre les cellules en suspension. Cette opération a été effectuée 3 fois. Puis les culots cellulaires ont été resuspendus dans 5mL de tampon imidazole-sucrose 8%, une solution hypotonique, puis une lyse mécanique a été réalisée par aspirations successives à travers une aiguille de petit diamètre (29G). Une première centrifugation a permis de séparer les cellules lysées des cellules non lysées. Le surnageant, correspondant aux cellules lysées a été recueilli, et ultracentrifugé (45 minutes à 45 000rpm sous vide). Le surnageant a été éliminé, et le culot a été mélangé à un tampon de charge non dénaturant (5mL de Tris HCl 0.5M pH 6.8, 2g de SDS, 4g de glycérol, 0.1g de bleu de bromophénol qsp 20mL d'eau) avant d'être analysé en SDS-PAGE à 8% d'acrylamide dans les conditions précédemment décrites.

#### **5. Immunoprécipitation (IP)**

Un protocole d'IP a été mis au point en vue d'une étude ultérieure de Casq2 par spectrophotométrie de masse.

100µL de lysat de HEK-293 transfectées (par pCDNA3.1 contenant *CASQ2* sauvage ou muté) ont été incubés avec 3µL d'anticorps anti-casq2 polyclonal pur, sous agitation pendant une nuit, à +4°C. Ont été ajoutées ensuite 20µL de billes de sépharose couplées à de la protéine G. Ces dernières ont été préalablement lavées en répétant 3 fois : ajout de 800µL de PBS, homogénéisation, centrifugation 2 minutes à 5000rpm, et élimination du surnageant. Un séchage final en utilisant une pipette et un cône fin est réalisé après le dernier lavage. Puis les

billes sont équilibrées avec un tampon RIPA. Après une incubation de 2h à température ambiante, les échantillons ont subi des lavages en PBS-Triton à 0.1% suivi de centrifugations. Les culots ont été séchés, et les billes restantes ont été reprises avec 40µL tampon de charge, portées à ébullition 3 minutes et congelées à -20°C. Les 40µL de produit d'IP ont été déposés sur un gel d'acrylamide pour une étude en immunoblot. 20µL de lysat non immunoprécipité ont également été déposés en tant que contrôle.

## **RESULTATS**

## **I. Etude de l'impact sur l'épissage des mutations CASQ2**

### ***A. Mutations du gène CASQ2***

L'analyse du gène *CASQ2* a été réalisée chez 183 probands chez qui le diagnostic de TVPC avait été posé. Pour 180 probands, l'analyse du gène *CASQ2* a été réalisée en seconde intention après analyse du gène *RYR2*. L'analyse a été réalisée en première intention pour trois probands pour lesquels il existait un contexte de consanguinité familiale, en faveur d'une transmission autosomique récessive retrouvée dans le cas du gène *CASQ2*.

Des mutations du gène *CASQ2* ont été identifiées chez 13 probands, 10 cas sporadiques et trois probands avec un contexte familial de consanguinité (Tableau 5). Une mutation homozygote est présente pour chacun des probands analysés dans un contexte familial de consanguinité. Pour les 10 autres patients, une mutation a été retrouvée à l'état homozygote chez un patient, deux mutations à l'état hétérozygote composite chez 6 individus, et pour 6 patients, seule une mutation hétérozygote a été identifiée.

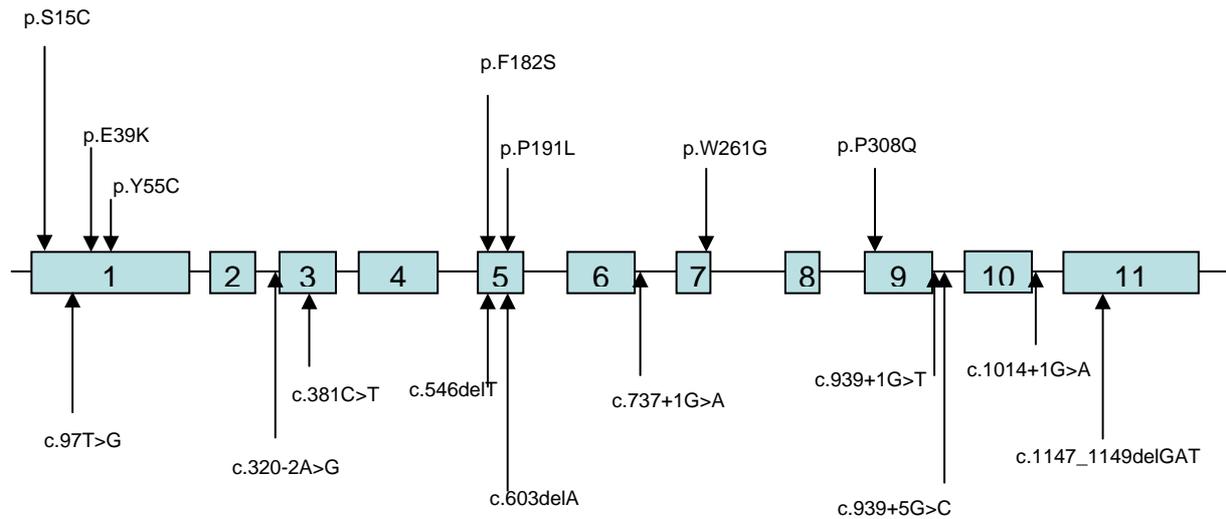
**Tableau 5 : Mutations identifiées au laboratoire.**

Proband	Statut du patient	Mutations identifiées	
		cDNA	Protéine
1	HTZ composite	c.44C>G + c.939+1G>T	p.S15C + altération épissage
2	HTZ composite	c.97C>T + c.838+88T>G	p.R33X + signification inconnue
3	HTZ composite	c.115G>A + c.545T>C	p.G39K + p.F182S
4	HTZ composite	c.164A>G + c.603delA	p.Y55C + p.V203LfsX209
5	Homozygote	c.320-2A>G	altération épissage
6	HTZ composite	c.381C>T + c.546delT	altération épissage + p.F182LfsX209
7	Homozygote	c.572C>T	p.P191L
8	HTZ composite	c.737+1G>A + c.939+5G>T	altération épissage
9	Homozygote	c.781T>G	p.W261G
10	HTZ composite	c.923C>A + c.381C>T	p.P308Q + altération épissage
11	Homozygote	c.1014+1G>A	altération épissage
12	Hétérozygote?	c.1147_1149delGAT + ?	p.D383del + ?
13	Hétérozygote?	c.546delT + ?	p.F182LfsX209 + ?

La variation intronique c.838+88T>G de signification inconnue est indiquée en grisé.

Au total, 17 mutations différentes ont été identifiées : 7 mutations faux-sens, 1 mutation non sens, 3 micro-délétions dont 2 entraînant un décalage du cadre de lecture, et 6 mutations altérant l'épissage (Figure 19). Parmi les 6 mutations altérant l'épissage, quatre affectent les dinucléotides invariants des sites consensus donneurs GT ou accepteurs AG (c.320-2A>G, c.737+1G>A, c.939+1G>T, c.1014+1G>A), tandis qu'une se situe en zone consensus d'épissage (c.939+5G>T), et une se situe hors de cette zone (c.381C>T). Ces mutations sont réparties grossièrement sur l'ensemble du gène. Deux mutations sont retrouvées à deux reprises, une mutation a déjà été identifiée dans la littérature (de la Fuente et al. 2008), treize mutations sont privées.

**Figure 19 : Distribution des mutations de CASQ2 identifiées au laboratoire.**



Les mutations faux-sens sont dans la partie haute du schéma. Dans la partie basse sont indiquées les mutations d'épissage, les délétions et la mutation non-sens.

Parmi les sept mutations faux-sens, six sont situées dans les domaines thiorédoxine-like de la protéine, qui interviennent dans la liaison des ions  $Ca^{2+}$  par Casq2 (tableau 6). Une est située au niveau du peptide signal de la protéine : la mutation p.S15C. Les cinq mutations p.E39K, p.F182S, p.P191L, p.W261G, p.P308Q concernent des acides aminés très conservés de la protéine. Aucune des variations n'a été identifiée parmi 200 chromosomes contrôles.

**Tableau 6 : Mutations faux-sens identifiées.**

Mutation		Substitution physico-chimique	Conservation au sein des espèces	Présence dans une population contrôle
cDNA	Protéine			
c.44C>G	p.S15C	conservatif non	non	non
c.115G>A	p.E39K	conservatif	oui	non
c.164A>G	p.Y55C	conservatif non	non	non
c.545T>C	p.F182S	conservatif non	oui	non
c.572C>T	p.P191L	conservatif non	oui	non
c.781T>G	p.W261G	conservatif non	oui	non
c.923C>A	p.P308Q	conservatif	oui	non

## **B. Etude bioinformatique**

Ont été étudiées en bioinformatique :

- les mutations d'épissage avérées (c.320-2A>G, c.381C>T, c.737+1G>A, c.939+1G>T, c.939+5G>C, c.1014+1G>A) afin de valider l'utilisation de ces logiciels au laboratoire, et de prédire l'effet sur l'épissage grâce à Cryp skip.
- les mutations faux-sens (c.115G>A ; p.E39K, c.164A>G ; p.Y55C, c.545T>C ; p.F182S, c.572C>T ; p.P191L, c.781T>G ; p.W261G, c.923C>A ; p.P308Q) car une altération de l'épissage peut aboutir à une absence de protéine, qui peut avoir un effet fonctionnel plus important qu'une substitution d'un acide aminé.
- les mutations de signification incertaine (c.44C>G ; p.S15C, c.838+88T>G) afin d'étudier leur impact sur l'épissage.

## 1. Variants situés dans les zones consensus d'épissage 5' et 3'

Les variants situés dans les zones consensus d'épissage ont été étudiés grâce aux outils MaxEntScan et Splice Site Finder. Les résultats sont résumés dans le tableau 7.

**Tableau 7 : Prédictions bioinformatiques des variants situés en zone consensus**

Mutations	Seuil de robustesse	MaxEntScan		SpliceSiteFinder-like		Cryp Skip
		Scores sites naturels	Modifications de sites	Scores sites naturels	Modifications de sites	
c.320-2A>G	5': oui 3': oui	5': 9,11 3': 10,82	<b>Site naturel 3': 2,86 (chute &gt;15%)</b>	Site naturel 3': 98,71	<b>Abolition du site 3'</b>	PCR-E: 0,09 <b>Saut d'exon</b>
c.737+1G>A	5': insuffisant 3': oui	5': 5,39 3': 5,89	<b>Site naturel 5': -2,78 (chute &gt;15%)</b>	Site naturel 5': 71,85	<b>Abolition du site 5'</b>	PCR-E: 0,21 <b>Saut d'exon</b>
c.781T>G	5': oui 3': oui	5': 8,91 3': 11,71	Site naturel 5': 7,83 (chute <15%)	/	/	/
c.939+1G>T	5': oui 3': oui	5': 10,1 3': 9,34	<b>Site naturel 5': 1,59 (chute &gt;15%)</b>	Site naturel 5': 87,13	<b>Abolition du site 5'</b>	PCR-E: 0,21 <b>Saut d'exon</b>
c.939+5G>C	5': oui 3': oui	5': 10,1 3': 9,34	<b>Site naturel 5': 3,06 (chute &gt;15%)</b>	Site naturel 5': 87,13	<b>Site naturel 5': 74,43 (chute&gt;5% du site naturel)</b>	PCR-E: 0,21 <b>Saut d'exon</b>
c.1014+1G>A	5': oui 3': oui	5': 7,77 3': 8,97	<b>Site naturel 5': -0,4 (chute &gt;15%)</b>	Site naturel 5': 80,0	<b>Abolition du site 5'</b>	PCR-E: 0,12 <b>Saut d'exon</b>

Calcul des seuils de robustesse des sites sauvages du gène *CASQ2* selon les recommandations de l'ANPGM :

- sites 5' : 5.88
- sites 3' : 5.56

Cryp Skip donne un score entre 0 et 1 :

- entre 0 et 0.5 le saut d'exon est plus probable
- entre 0.5 et 1 la rétention d'intron est plus probable

Une altération de l'épissage par abolition du site naturel correspondant est prédite pour les mutations c.320-2A>G, c.939+1G>T, c.939+5G>C et c.1014+1G>A.

Pour la mutation c.737+1G>A, le score du site sauvage donneur est inférieur au seuil de robustesse, donc trop faible pour que l'analyse bioinformatique soit fiable. Les résultats de l'étude *in silico* ne sont pas utilisables selon les recommandations de l'ANPGM.

Pour la variation c.781T>G, aucune altération de l'épissage n'est prédite, la diminution du score de son site donneur 5' est inférieure à 15%.

Pour les mutations c.320-2A>G, c.737+1G>A, c.939+1G>T et c.1014+1G>A où une abolition du site naturel était prédite, j'ai considéré quelle était la conséquence la plus probable à l'aide du logiciel Cryp Skip. Lorsqu'un site d'épissage est aboli, la conséquence sera soit le saut de l'exon situé à côté, soit l'activation d'un site cryptique d'épissage à proximité. Pour l'ensemble de ces mutations, l'effet le plus probable est un saut d'exon, qui entraîne une délétion respectivement des exons 3, 6, 9 et 10. Les sauts des exons 3, 6 et 9 provoqueraient l'apparition d'un codon stop prématuré, alors que le saut de l'exon 10 ne décalerait pas le cadre de lecture et induirait une délétion des acides aminés 314 à 338, correspondant au troisième domaine thioredoxine-like de la protéine.

Au vu de ces résultats, on retient donc que les quatre variations modifiant les dinucléotides invariants sont considérés comme délétères, avec saut d'exon.

Pour le variant c.939+5G>C, l'étude bioinformatique montre une chute de la reconnaissance du site donneur naturel. Il a donc été décidé de poursuivre l'étude d'impact sur l'épissage par une étude fonctionnelle par minigène (Roux-Buisson et al. 2011) qui a mis en évidence une diminution de taille de transcrite correspondant au saut de l'exon 9, comme prédit par le logiciel Cryp Skip.

Enfin, pour la mutation c.781T>G, l'altération de l'épissage n'était pas retenue, et il n'y a donc pas eu d'étude par minigène. C'est le changement d'acide aminé qui est le plus probablement responsable de l'effet délétère de cette variation.

## 2. Variants situés hors des zones consensus 5' et 3'

Les variants situés en dehors des zones consensus d'épissage ont été analysés à l'aide des outils MaxEntScan (MES), Human Splicing Finder (HSF), et Netgene2 (Tableau 8).

**Tableau 8 : Analyse bioinformatique des variants situés en dehors des zones consensus.**

Mutation	MaxEntScan		Human Splicing Finder		NetGene2
	Scores sites naturels	Modifications de sites	Scores sites naturels	Modification de sites	
c.44C>G	5': 11,08 3': N/A	Aucune modification	5': 98,24 3': N/A	Pas de site de novo	Pas de différence
c.115G>A	5': 11,08 3': N/A	Aucune modification	5': 98,24 3': N/A	Pas de site de novo	Pas de différence
c.164A>G	5': 11,08 3': N/A	Aucune modification	5': 98,24 3': N/A	Pas de site de novo	Pas de différence
c.381C>T	5':9,11 3':10,82	<b>Site de novo 5':10,13 (&gt;80% site naturel)</b>	5': 87,37 3':94,52	<b>Site de novo 5': 93,14 (&gt;80% site naturel)</b>	<b>Site naturel 5': 0,94 Site de novo 5': 0,82 (&gt;80% site naturel)</b>
c.545T>C	5': 9,65 3': 10,25	Aucune modification	5': 93,38 3': 86,79	Pas de site de novo	Pas de différence
c.572C>T	5': 9,65 3': 10,26	Aucune modification	5': 93,38 3': 86,80	Pas de site de novo	Pas de différence
c.838+88T>G	3'(intron 8):9,34 5'(intron 8):9,79	<b>Site de novo 3': 11,84 (&gt;80% du site naturel)</b>	3'(intron 8-9):87,08 5'(intron 8-9):89,32	<b>Site de novo 3': 89,84 (&gt;80% du site naturel)</b>	Pas de différence
c.923C>A	5': 10,1 3': 9,34	Site de novo 3': 2,95 (<80% site naturel)	5': 94,09 3': 87,08	<b>Site de novo 3': 81,62 (&gt;80% du site naturel)</b>	Pas de différence

Aucune activation de site cryptique n'a été mise en évidence pour les variations c.44C>G, c.115G>A, c.164A>G, c.545T>C et c.572C>T.

Les 3 outils prédisent de façon concordante la création d'un site *de novo* pour le variant c.381C>T. Une étude fonctionnelle par minigène a confirmé ces prédictions en montrant une différence de taille des transcrits correspondant à la délétion des 41 derniers nucléotides de l'exon 3, conséquence de la création d'un site donneur d'épissage en position c.380\_381 (Roux-Buisson et al. 2011).

Pour le variant c.923C>A, seul le logiciel HSF suggérait la création d'un site *de novo*, ce qui était insuffisant pour poursuivre l'étude d'impact par minigène.

Pour la variation c.838+88T>G, deux outils de prédiction sur les trois (MES et HSF) étaient en faveur de la création d'un site *de novo*, ce qui a motivé de pousser plus loin l'étude de l'épissage par l'utilisation d'un minigène, développée plus loin.

En conclusion, ces outils bioinformatiques sont une aide précieuse à la décision d'une étude fonctionnelle de l'impact d'une variation sur l'épissage.

### **C. Etude de l'impact sur l'épissage de la variation c.838+88T>G**

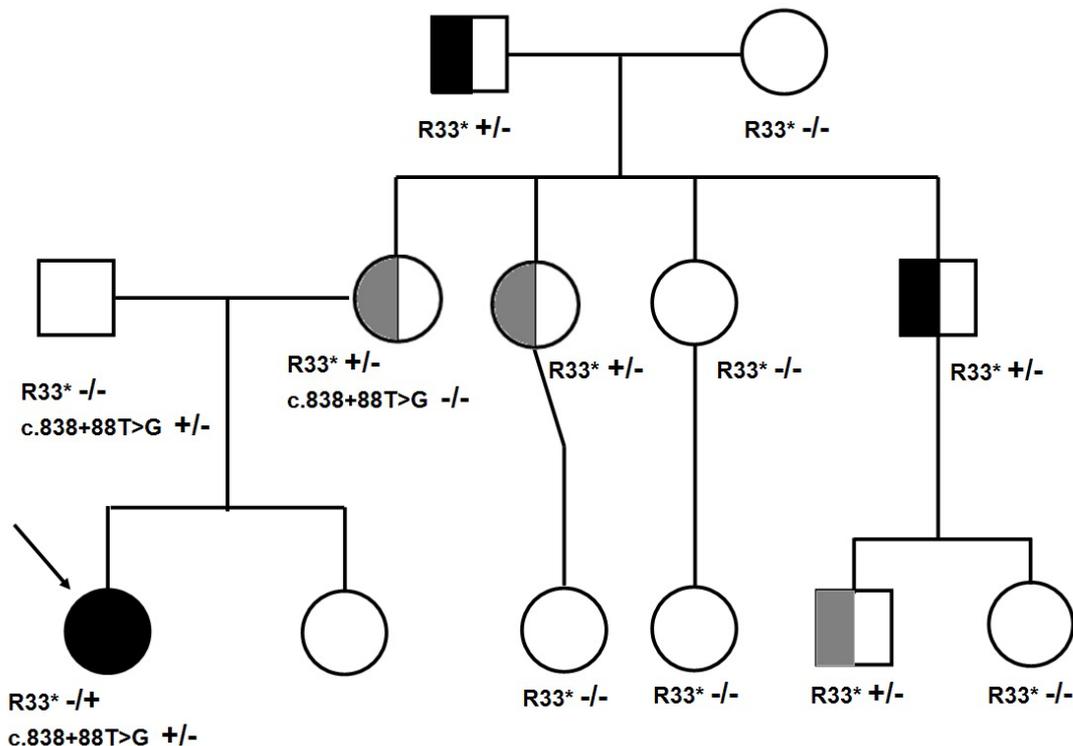
Comme indiqué précédemment, les variations c.939+5G>C et c.381C>T ont été étudiées à l'aide d'un minigène dans un travail antérieur à celui-ci, qui a permis de montrer que ces variations entraînaient respectivement un saut de l'exon 9 *in vitro*, et la création d'un site donneur dans l'exon 3.

Il avait été décidé de ne pas étudier les transcrits ni leucocytaires ni musculaires car les transcrits leucocytaires sont un reflet inexact de l'épissage cardiaque et la biopsie musculaire squelettique avait été considérée comme trop invasive.

Ici, je me suis intéressé à la variation intronique c.838+88T>G en me basant sur les analyses bioinformatiques qui prédisaient un effet potentiel de cette variation sur l'épissage.

La variation c.838+88T>G a été identifiée en association avec la mutation non-sens p.R33\* chez la patiente 2, un cas sporadique de TVPC, diagnostiquée à 11 ans (tableau 5, p66).

**Figure 20 : Arbre généalogique de la famille du proband 2.**



Arbre généalogique montrant la répartition de la mutation c.97T>G ; R33\*. Le cas index est représenté en noir plein et présente des symptômes de TVPC. Les symboles demi-remplis en noir correspondent à des individus hétérozygotes, présentant des battements ventriculaires prématurés ou des extrasystoles ventriculaires voire des courts épisodes de TV lors de l'épreuve d'effort. Les symboles demi-remplis en gris correspondent aux hétérozygotes qui présentent une exploration négative. La variation c.838+88T>G est indiquée chez le cas index et ses deux parents.

Chez cette patiente, une seule mutation hétérozygote présentant un caractère délétère évident avait été identifiée. Il s'agissait de la mutation non-sens p.R33\*, responsable d'un codon stop très précoce tronquant la protéine de l'ensemble de ces domaines fonctionnels. L'étude familiale montre que la mutation non-sens a été identifiée chez des apparentés qui sont tous asymptomatiques, mais avec pour certains des arythmies mises en évidence à l'épreuve d'effort (figure 20).

Dans ce contexte, plusieurs hypothèses pouvaient être posées pour expliquer la génétique de la TVPC chez ce proband :

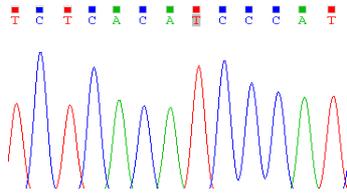
- il s'agissait d'un cas de transmission autosomique dominant à pénétrance variable, avec des individus porteurs pouvant être symptomatiques, asymptomatiques, ou présentant une épreuve d'effort positive.
- il s'agissait d'un cas de transmission autosomique récessive liée à *CASQ2*, et une mutation n'a pas été identifiée (comme dans le cas d'une mutation intronique profonde).
- un autre gène est impliqué dans le phénotype observé chez la patiente.

Dans le contexte de l'hypothèse d'une transmission autosomique récessive généralement admise dans les TVPC associées à des mutations du gène *CASQ2*, nous avons recherché des variations potentiellement pathogènes chez cette patiente. Au niveau des régions analysées, seule une variation hétérozygote non répertoriée dans les bases de polymorphisme a été identifiée : c.838+88T>G au niveau de l'intron 8. Cette variation correspond à la substitution d'une thymine par guanine 88 nucléotides après le début de l'intron 8. Les logiciels de prédiction MES et HSF étaient en faveur de la création d'un site *de novo* en position c.838+87\_88. Une étude familiale a permis de confirmer que les variations c.97C>T et c.838+88T>G se trouvaient en *trans*, ce qui était compatible avec une transmission autosomique récessive de la pathologie (Figure 20). En se basant sur ces arguments, nous avons décidé de poursuivre l'analyse de l'impact potentiel sur l'épissage du variant c.838+88T>G à l'aide d'une étude par minigène.

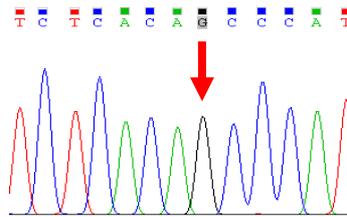
Pour cela, une mutagenèse dirigée c.838+88T>G a été réalisée à partir du minigène décrit dans le paragraphe matériels et méthodes afin d'obtenir un minigène portant une guanine en position 88 de l'intron 8. La séquence a été contrôlée après mutagenèse dirigée (Figure 21).

**Figure 21 : Contrôle de la mutagenèse dirigée c.838+88T>G dans le minigène.**

**a/ Séquence du minigène sauvage**



**b/ Séquence du minigène muté en c.838+88T>G**



La flèche rouge indique le nucléotide muté c.838+88T>G

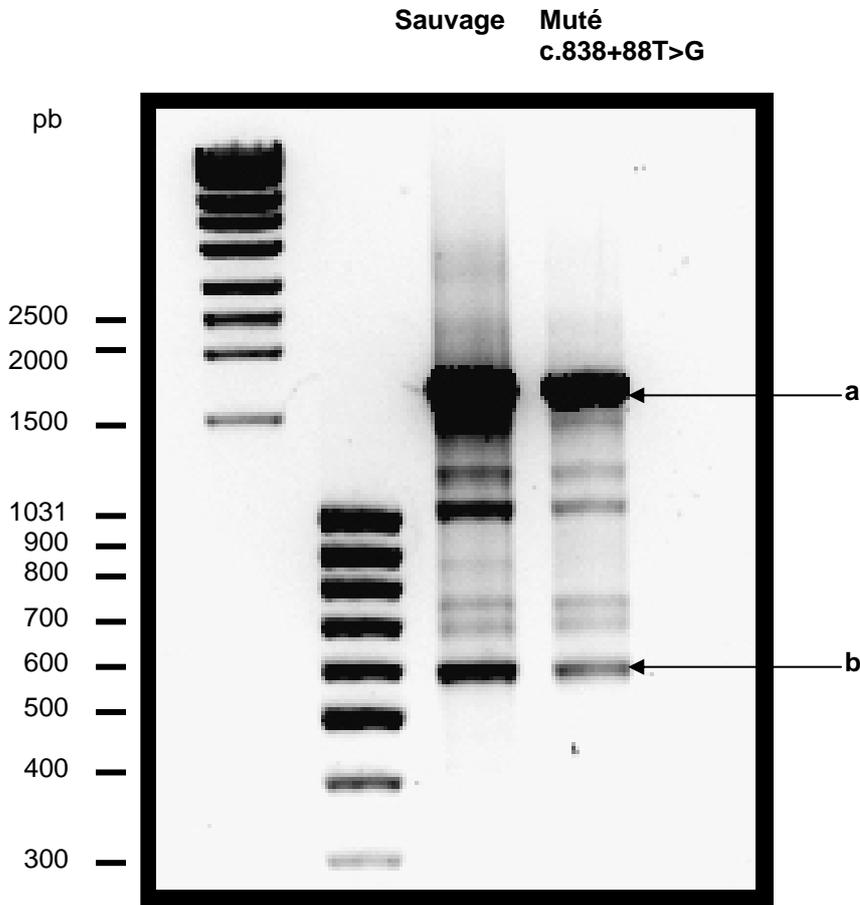
Les plasmides portant les minigènes sauvage ou muté ont ensuite été transfectés dans des HEK-293, et les cellules ont été récoltées. Après extraction de l'ARN et transcription inverse, j'ai réalisé une PCR grâce à deux amorces plasmidiques pCI-neoF et T3R.

L'étude des produits de PCR des transcrits est montrée dans la figure 22.

Pour le minigène sauvage, on observe une bande à 594 pb (flèche b) correspondant au transcrit final épissé (Roux-Buisson et al. 2011) soit une succession des exons 8, 9 et 10 sans les paires de bases introniques. Une bande est observée à 1729 pb et correspond au transcrit du minigène non épissé, c'est-à-dire comprenant les trois exons, ainsi que les paires de bases introniques flanquantes. Enfin, des transcrits intermédiaires sont visibles à différents poids moléculaires, correspondant à des transcrits partiellement épissés.

Pour le minigène muté en c.838+88T>G, on observe également une bande de 594pb pour le transcrit épissé, de même taille que l'ARNm mature observé chez le sauvage (flèche b), ce qui nous a conduit à conclure que la variation c.838+88T>G n'avait aucun impact sur l'épissage dans ce système de minigène.

**Figure 22 : Etude des produits de PCR obtenus après RT-PCR à partir des transcrits du minigène sauvage ou muté c.838+88T>G.**



Concernant le minigène « sauvage », il est observé ici un transcrit primaire de taille attendue 1729 pb qui correspond à l'ARN non épissé (flèche a). Le transcrit qui a subi un épissage de ses introns se situe à la taille attendue, à 594pb (flèche b).

Il est donc très peu probable la variation c.838+88T>G altère l'épissage *in vivo* pour la patiente 2 et ce variant doit être considéré comme un polymorphisme très probable. Pour la patiente 2, une mutation non identifiée sur le gène *CASQ2*, comme une mutation intronique plus profonde par exemple, peut être responsable du phénotype de TVPC de la patiente, selon un mode de transmission autosomique récessif. Un mode de transmission autosomique dominant à pénétrance incomplète peut être également évoqué pour la mutation non-sens c.97C>T ; p.R33\*.

## **//. Etude de la mutation c.44C>G; p.S15C de CASQ2**

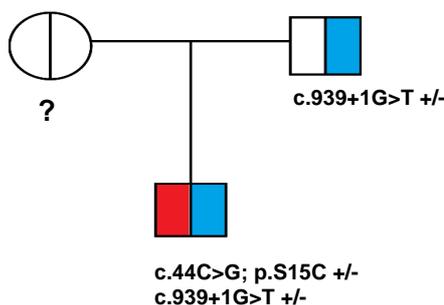
Parmi l'ensemble des mutations identifiées sur le gène *CASQ2*, nous avons trouvé sept mutations faux-sens. L'une d'elles, la variation p.S15C, nous a paru particulièrement intéressante à étudier du fait de sa localisation dans le peptide signal. L'ensemble des mutations faux-sens identifié dans Casq2 à ce jour se situe au niveau des domaines thioredoxine-like de la protéine. Les études fonctionnelles réalisées montrent que ces mutations seraient principalement associées à des anomalies de chélation du calcium par Casq2. La variation p.S15C se situant au niveau du peptide signal (PS) de la protéine, il n'y a aucune raison qu'elle ait un impact sur l'interaction de Casq2 avec les cations  $Ca^{2+}$ . L'hypothèse physiopathologique serait toute autre. Cette mutation en modifiant la séquence consensus du signal peptide pourrait par exemple altérer la reconnaissance du PS par la SRP, et empêcher son adressage au reticulum. La protéine Casq2 pourrait ainsi rester cytosolique, et être dégradée précocement. La mutation pourrait entraîner un défaut d'action de l'endopeptidase de la lumière du reticulum et donc un défaut de clivage du peptide signal. La persistance éventuelle du peptide signal en N-terminal pourrait alors entraîner i) un défaut de localisation de la protéine (anomalie d'adressage ou de trafic), ou ii) une modification de ses propriétés chimiques du fait d'une modification de son extrémité N-terminale, comme sa capacité à polymériser par exemple.

J'ai donc entrepris l'étude de l'impact de la variation p.S15C sur la protéine pour savoir si cette variation avait un effet ou était un polymorphisme sans conséquence. J'ai réalisé ces études par expression ectopique de la protéine Casq2 sauvage ou mutée dans deux modèles de lignées cellulaires non-myogéniques, les cellules COS-7 pour les études en immunofluorescence et les cellules HEK-293 pour les études biochimiques (immunoblot, étude de glycosylation, étude de polymérisation, immunoprécipitation).

## A. Contexte clinique et génétique

Le proband est un cas sporadique de 50 ans adressé pour des syncopes répétées à l'effort depuis plusieurs années. Le séquençage du gène *CASQ2* a permis d'identifier deux variations hétérozygotes chez ce patient : c.44C>G (p.S15C) et c.939+1G>T (proband 1, tableau 6). Lors de l'étude familiale, seule l'analyse du père du proband a pu être réalisée, l'ADN maternel n'étant pas disponible. Cette analyse a permis de montrer que la variation c.939+1G>T est d'origine paternelle et pas la variation c.44C>G (Figure 23). L'étude familiale est compatible avec une transmission autosomique récessive de la pathologie associée aux deux variations c.44C>G et c.939+1G>T, même si une néomutation c.44C>G survenue chez le proband au niveau de l'allèle paternel ne peut être écartée.

**Figure 23 : Famille du proband 1.**

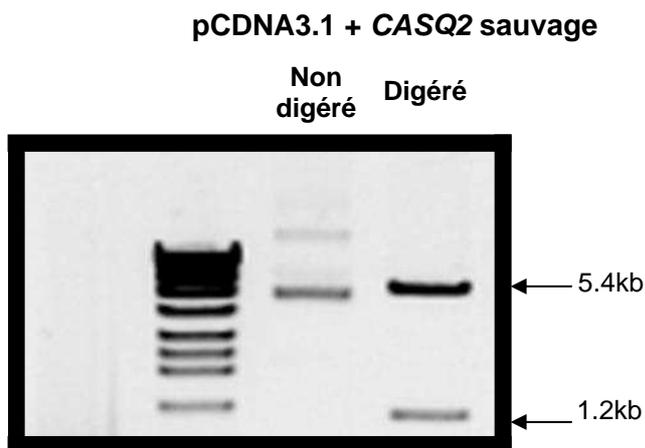


Le proband porteur de deux mutations à l'état hétérozygote.  
Nous n'avons eu accès qu'à l'ADN du père, porteur c.939+1G>T.

## **B. Clonage du cDNA de CASQ2 et mutagenèse dirigée p.S15C**

Le cDNA de *CASQ2* humain a été cloné dans pCR2.1 dans un premier temps. Vingt colonies ont été prélevées, et la séquence codante a été séquencée. Seul un clone présentait une séquence correcte en raison de la faible fiabilité de la Taq polymérase utilisée lors de la PCR. Le clone sélectionné a ensuite été inséré dans le plasmide d'expression de cellules de mammifères, pCDNA3.1. Cette construction a été contrôlée par digestion enzymatique (voir figure 24) et séquençage, ce qui a permis de vérifier l'intégralité de la séquence codante de *CASQ2*, suivie en 3' d'une étiquette HA puis d'un codon stop.

**Figure 24 : Contrôle de digestion de pCDNA3.1 contenant le cDNA de CASQ2 sauvage**



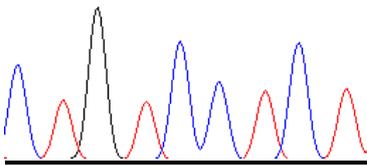
L'insertion du cDNA dans pcr2.1 a été vérifiée par digestion. Les poids moléculaires obtenus sont ceux attendus : pCDNA3.1= 5.4kb ; l'insert *CASQ2* 1.2kb. Le vecteur non digéré présente plusieurs bandes correspondant à des formes super-enroulées.

Le codon correspondant au résidu sérine en position 15 a été changé en cystéine par mutagenèse dirigée à l'aide du kit Quik Change® II XL Site Directed Mutagenesis (Stratagene). L'introduction de la mutation a été contrôlée par séquençage (Figure 25).

**Figure 25 : Séquence du clone de CASQ2 sauvage ou muté p.S15C**

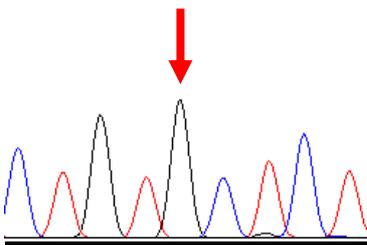
**a. Séquence du clone de CASQ2 sauvage**

C T G T C C T C T



**b. Séquence du clone de CASQ2 muté p.S15C**

C T G T G C T C T



La flèche rouge indique le nucléotide muté c.44C>G reproduisant la mutation observée chez le patient 2.

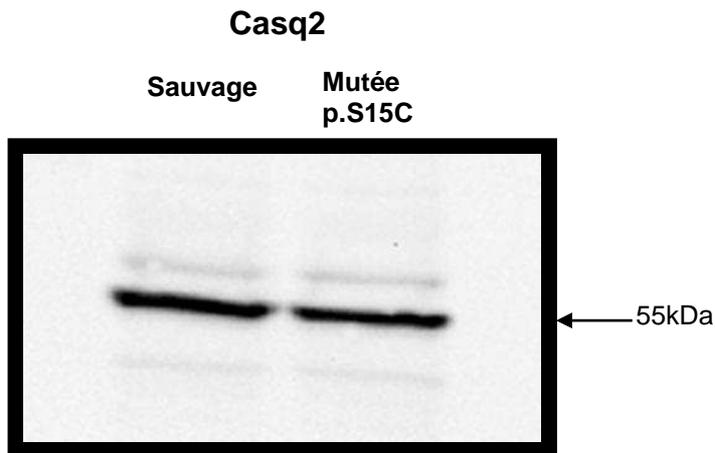
A l'issue de ces manipulations, je disposais donc de deux constructions plasmidiques, l'une contenant la séquence du cDNA de CASQ2 sauvage, et l'autre contenant la séquence du cDNA de CASQ2 muté en p.S15C.

### ***C. Etude en immunoblot***

Compte-tenu des hypothèses initiales d'un possible défaut de clivage du peptide signal lié à la mutation, j'ai recherché par immunoblot une différence de poids moléculaire entre la protéine sauvage et mutée liée à la persistance éventuelle du peptide signal. Le peptide signal correspondant à une séquence de 19 acides aminés, soit environ 2kDa. En cas de non clivage du peptide signal, la protéine mutée aurait donc une masse moléculaire apparente plus élevée que la protéine sauvage d'environ 2 kDa. Par ailleurs, dans l'hypothèse d'un défaut d'adressage au reticulum de la protéine, celle-ci pourrait être dégradée et j'ai donc recherché par immunoblot une éventuelle dégradation de la protéine mutée par rapport à la protéine sauvage.

Après transfection du cDNA de Casq2 sauvage ou mutée dans des cellules HEK-293 et étude de l'expression de Casq2 en immunoblot, on voit qu'il n'existe pas de différence de masse moléculaire apparente entre la protéine sauvage et mutée (Figure 26). Cette expérience n'a donc pas permis pas de mettre en évidence une différence de masse moléculaire qui aurait pu être liée à la persistance du peptide signal dans Casq2 mutée. Par ailleurs, l'intensité des deux bandes protéiques sauvage ou mutée est identique. Cette étude n'a donc pas permis de mettre en évidence de dégradation de la protéine mutée, qui avait été recherchée dans une hypothèse de défaut d'adressage de la protéine.

**Figure 26 : Immunoblot à partir de lysat cellulaire de HEK-293 surexprimant Casq2**

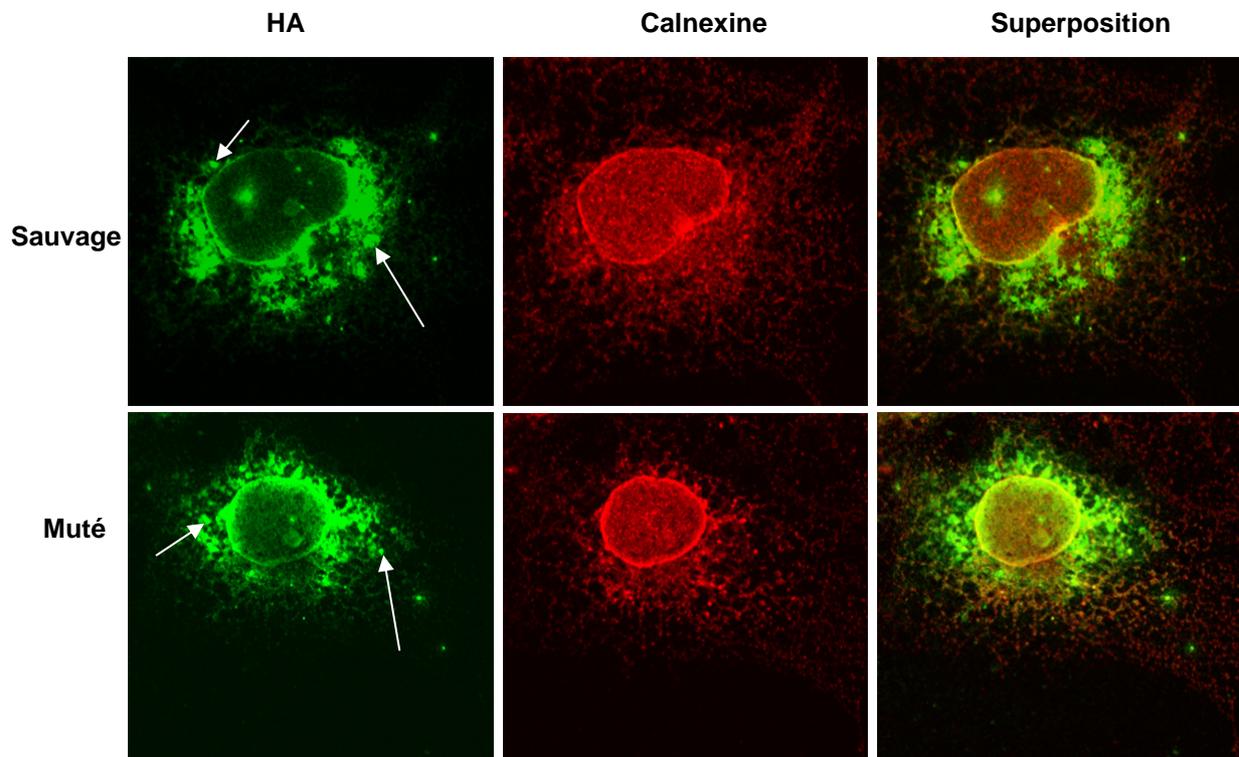


20µg de dépôt de protéine a été réalisée dans chaque ligne. La révélation de la protéine Casq2 a été faite à l'aide d'un anticorps anti-HA. La bande correspondant à Casq2 possède une masse moléculaire apparente 55kDa correspondant au poids moléculaire attendu de la protéine (Kalyanasundaram et al. 2012, figure 27). On n'observe une bande identique pour la protéine sauvage et la protéine mutée.

#### ***D. Etude de localisation en immunofluorescence***

Après transfection et réexpression de la protéine sauvage ou muté p.S15C dans des cellules COS-7, j'ai regardé si la localisation de la protéine était modifiée par la mutation. L'efficacité de la transfection était évaluée à 8%, ce qui permettait d'étudier un nombre suffisant de cellules (n=500 cellules observées). Les résultats de l'étude en immunofluorescence indirecte de la protéine Casq2 sont indiqués figure 27.

**Figure 27 : Co-immunomarquage de la calséquestrine de type 2 et de la calnexine dans des cellules COS-7 surexprimant casq2 taguée HA**



La protéine Casq2 est révélée à l'aide d'un anticorps anti-HA monoclonal et d'un anticorps secondaire anti-souris couplé Alexa488 (en vert). La calnexine est détectée à l'aide d'un anticorps anti-calnexine, polyclonal, et d'un anticorps secondaire anti-lapin couplé Cy3 (rouge).

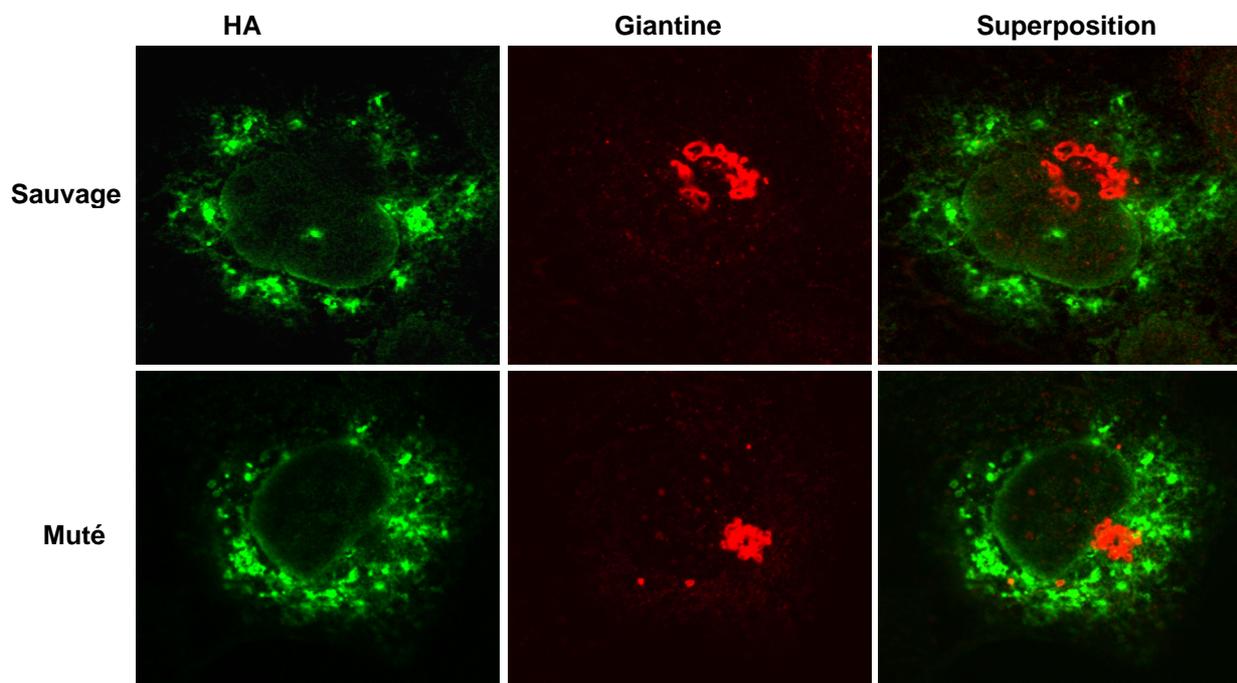
Le marquage calnexine met en évidence le reticulum endoplasmique, avec un aspect typique réticulé. Le marquage de Casq2 taguée HA permet d'observer deux éléments : un marquage de type reticulum endoplasmique d'une part, et des accumulations périnucléaires (flèches blanches) d'autre part.

La première observation est le fait qu'il n'y a pas de différence notable entre les localisations de la protéine sauvage et de la protéine mutée. Ces images montrent que la protéine Casq2 colocalise partiellement avec la calnexine au niveau de reticulum endoplasmique, localisation attendue pour une protéine du reticulum sarcoplasmique exprimée dans une cellule non-musculaire.

Par ailleurs, on observe des images punctiformes périnucléaires à la fois chez Casq2 sauvage et mutée, compatible avec une accumulation locale de la protéine. Le fait qu'une partie de ces images punctiformes colocalise avec la calnexine suggère que Casq2 serait localement accumulée dans le RE.

Toutefois, la question s'est posée de savoir si les marquages punctiformes intenses observés pouvaient correspondre à une localisation de la protéine dans un autre organite subcellulaire, l'appareil de Golgi. La figure 28 figure montre un co-marquage de la calséquestrine et de la giantine, marqueur du cis-Golgi. La superposition des deux images ne montre aucune co-localisation des deux marquages : la protéine casq2 sauvage ou mutée n'est donc pas détectable dans l'appareil de Golgi pas cette technique.

**Figure 28 : Co-immunomarquage de Casq2 et de la giantine dans des cellules COS-7 surexprimant Casq2**



Anticorps anti-HA dont l'anticorps secondaire est couplé au fluorochrome Alexa488 (en vert), et anticorps anti-giantine marquée dont le secondaire est couplé au fluorochrome Cy3 (en rouge).  
Le marquage giantine met en évidence le cis-Golgi, et il n'y a aucune colocalisation avec le marquage de Casq2 sauvage ou mutée

## ***E. Etude de la glycosylation de Casq2***

Nous nous sommes demandé si éventuellement la protéine mutée pouvait perturber la rétention de Casq2 dans le reticulum. Dans ce cas, il serait envisageable que la protéine mutée, comme de nombreuses protéines résidentes du reticulum, transite par le Golgi puis revienne dans le reticulum. Ceci n'aurait pas été détectable en immunofluorescence.

Pour savoir si une protéine est retenue dans le RE ou transite par l'appareil de Golgi puis revient dans le RE, il est possible d'effectuer un test de déglycosylation par l'endoglycosidase H. En effet, la maturation des sucres portés par les protéines commence dans le réticulum et s'achève dans l'appareil de Golgi. Les glycosylations qui surviennent dans le réticulum sont sensibles à l'action de l'endoglycosidase H. En revanche, l'étape de maturation des sucres réalisée par la manosidase II au niveau de l'appareil de Golgi rend les glycoprotéines résistantes à la digestion par l'endoglycosidase H. Ainsi, la résistance à cette enzyme est un moyen de savoir si une protéine a atteint l'appareil de Golgi.

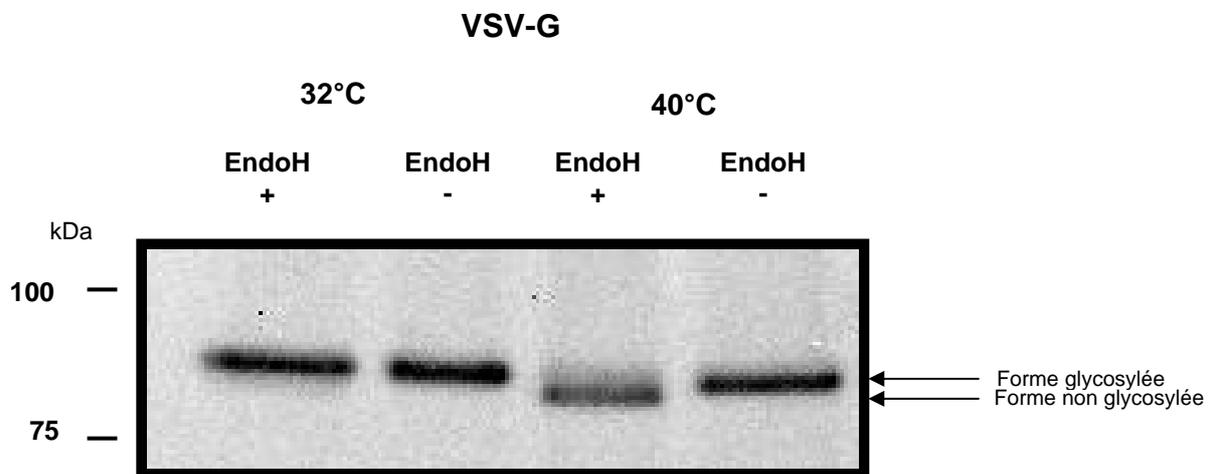
Physiologiquement, Casq2 ne transite pas par l'appareil de Golgi, elle est adressée au reticulum grâce au peptide signal puis est glycosylée au niveau du reticulum, où elle est ensuite retenue par des mécanismes mal compris. La forme physiologique de Casq2 est donc glycosylée et sensible à l'action de l'endoglycosidase H car elle ne transite pas par l'appareil de Golgi (Kirchhefer et al. 2010).

Pour voir si une partie de Casq2 modifiée par la mutation p.S15C, pouvait sortir du reticulum et transiter par l'appareil de Golgi j'ai étudié la déglycosylation de la molécule par l'endoglycosidase H.

Pour cela, j'ai d'abord mis au point une étude de glycosylation à l'aide d'une construction contenant la séquence codante de VSV-GtsO45-GFP, la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculaire-fusionné à la GFP, une glycoprotéine thermosensible dont le transit est modifié selon la température de culture. Cette protéine a la particularité d'être mal repliée à

40°C, et d'être ainsi retenue dans le reticulum endoplasmique à cette température. Cette rétention rend la protéine accessible à l'action de l'endoglycosidase H. En revanche, à 32°C, la protéine se replie correctement et est transportée vers l'appareil de Golgi, où des modifications des sucres par la mannosidase II empêchent l'action de l'enzyme, et donc le clivage des résidus sucrés.

**Figure 29: Immunoblot de VSV-G-GFP à 32° et 40° avec ou sans action de l'endoglycosidase H.**



Immunoblot de VSV-G fusionné avec la GFP (anticorps anti-GFP), montrant VSV-G avec ou sans traitement à l'endoglycosidase H, avec incubation à 32°C (protéine transitant par l'appareil de Golgi) ou à 40°C (protéine retenue dans le RE).

La flèche met en évidence la différence de poids moléculaire de VSV-G retenue dans le RE traitée à l'EndoH. PM attendu de VSV-G : 84.5kDa

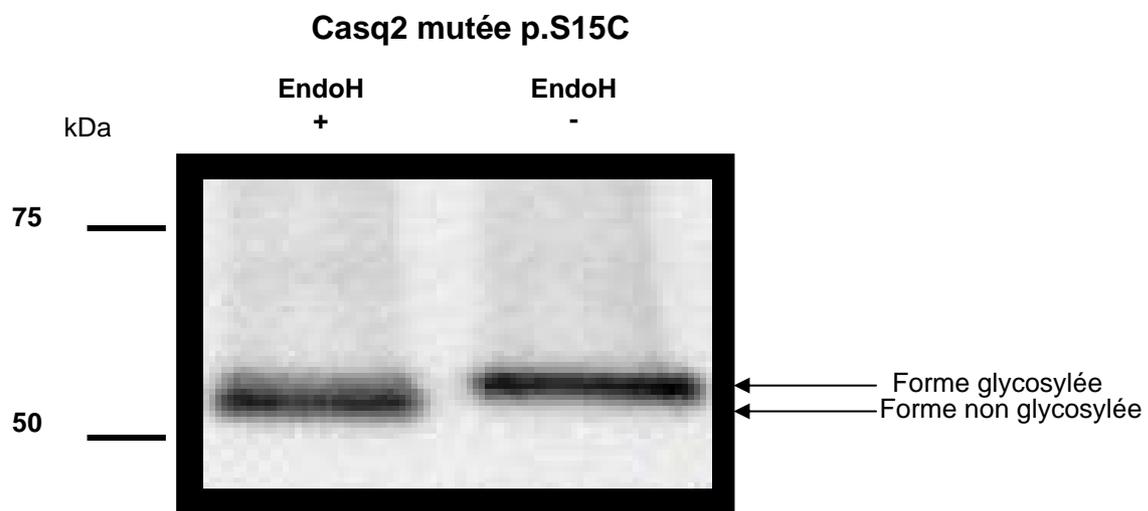
La figure 29 montre l'action de l'endoglycosidase H sur la glycoprotéine VSV-G, dans deux conditions différentes : à 40°C et à 32°C.

L'endoglycosidase H n'a pas d'action sur VSV-G quand les cellules ont été incubées à 32°C, les deux bandes sont à la même hauteur. A 40°C en revanche, la protéine subit l'action de l'enzyme, ce qui valide les conditions expérimentales d'étude de glycosylation.

Dans un second temps, j'ai étudié la sensibilité de la protéine Casq2 mutée à l'endoglycosidase H comme indicateur de rétention de Casq2 dans le RE.

La figure 30 confirme la sensibilité à l'enzyme de Casq2 mutée. Ce résultat montre l'absence de transit de Casq2 mutée p.Ser15Cys par l'appareil de Golgi. Une erreur de manipulation est la raison pour laquelle l'image pour la protéine sauvage n'est pas disponible.

**Figure 30 : Immunoblot de casq2 mutée taguée HA, avec et sans action de l'endoglycosidase H. Anticorps anti-HA utilisé comme anticorps primaire.**

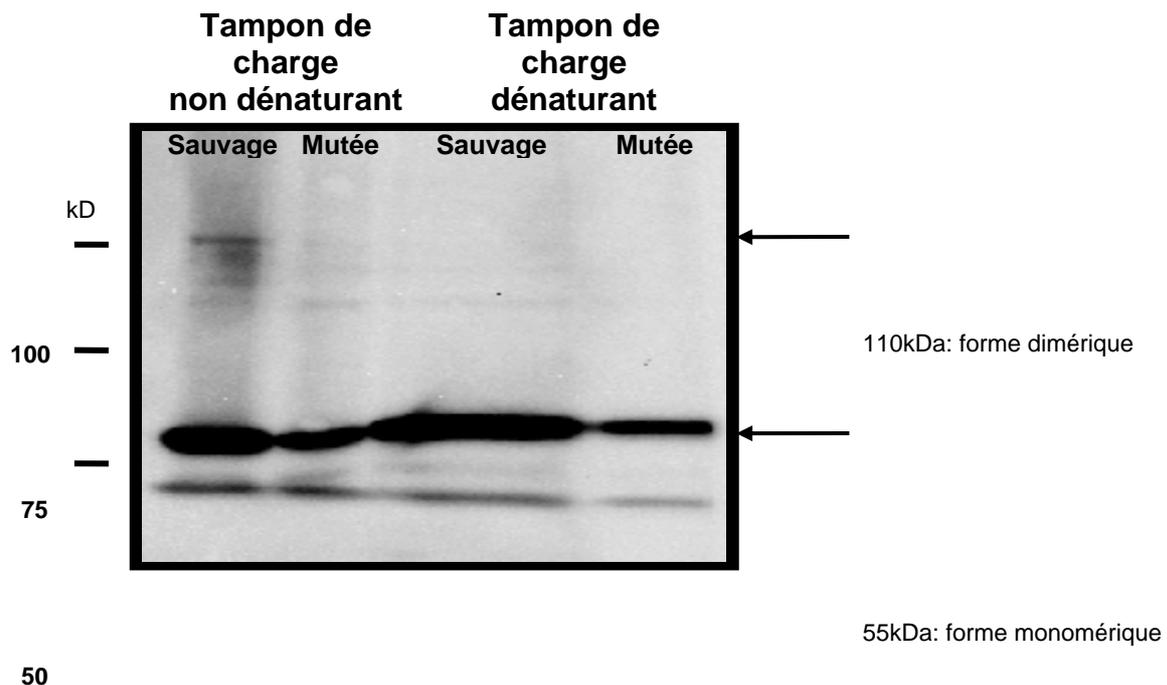


Les deux flèches mettent en évidence la différence de poids moléculaire entre la protéine traitée par l'EndoH et la protéine non traitée, ce qui illustre l'action de l'enzyme.

## F. Etude de polymérisation de Casq2

L'extrémité N-terminale de Casq2 intervient dans le phénomène de polymérisation de la protéine. La mutation p.S15C, altérant potentiellement le clivage du peptide signal, pourrait modifier cette propriété de polymérisation, ce que j'ai étudié par immunoblot. J'ai recherché l'existence de polymères en réalisant une électrophorèse en conditions non dénaturantes. Pour cela, après transfection du cDNA de *CASQ2* sauvage ou mutée dans des cellules HEK-293, j'ai réalisé un lysat protéique en conditions non dénaturantes et révélé par immunoblot la protéine Casq2.

**Figure 31 : Immunoblot de Casq2 en condition dénaturantes**



Les bandes à 55kDa correspondent aux monomères de Casq2. Pour la protéine sauvage déposée avec tampon non dénaturant, une bande au dessus de 100kDa est observée, qui pourrait correspondre à des dimères (110kDa) (flèche noire). Il n'y a pas cette bande présente pour la protéine mutée, mais le dépôt protéique était plus faible comme l'atteste la bande plus faible à 55kDa.

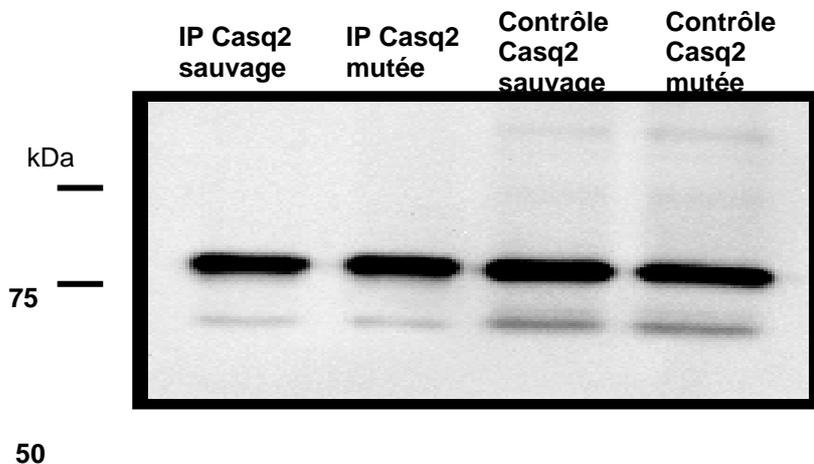
La figure 31 montre, qu'en conditions dénaturantes et non dénaturantes, une même bande à 55kDa correspondant à Casq2 sous forme de monomère est observée pour les 2 constructions de la protéine, sauvage et mutée. En conditions non dénaturantes, une bande à 110kDa apparaît pour Casq2 sauvage, qui pourrait correspondre à la protéine sous forme dimérisée. En effet, ces conditions permettent de respecter davantage les polymères de protéines. Il n'y a en revanche pas de bande observable à cette taille pour la protéine mutée p.S15S, ce qui suggèrerait un défaut de polymérisation. Les conditions dénaturantes utilisées ici comme contrôle, ne montrent que des bandes à 55kDa correspondant à des monomères, pour la protéine sauvage et mutée.

Il est intéressant de noter que la dimérisation de Casq2 se fait selon un mode « front-to-front » entre les deux extrémités N-terminales de deux molécules de Casq2. La persistance du PS chez la protéine mutée p.S15C pourrait expliquer ce défaut de dimérisation de Casq2.

## **G. Immunoprécipitation**

Les investigations précédentes n'ont pas été suffisantes pour affirmer ou infirmer un effet de la mutation p.S15C sur Casq2. Pour pouvoir mettre en évidence la persistance du PS chez la protéine mutée, un séquençage N-terminal va être réalisé en collaboration avec la plateforme EdyP. Un échantillon purifié de Casq2 est nécessaire pour cette analyse, et une immunoprécipitation de la protéine sauvage et mutée a été faite grâce à un anti-Casq2 polyclonal (Figure 32). Des bandes identiques aux contrôles sont visualisables au poids moléculaire attendu. En outre, il y a une atténuation nette du bruit de fond observable sur les contrôles. Ce protocole est donc utilisable pour la future analyse en spectrométrie de masse qui permettra d'attester ou non de la présence du peptide signal chez la protéine mutée.

**Figure 32 : Immunoblot d'IP de Casq2 sauvage et mutée**



Contrôles d'IP de 20% de la quantité de lysat utilisée pour l'IP. Anticorps d'IP: anti-casq2 polyclonal, anticorps primaire utilisé pour le WB : anti-HA.

## **DISCUSSION**

## I. Etude de l'épissage

Une première partie de mon travail a consisté à faire un bilan des mutations du gène *CASQ2* identifiées au laboratoire de Biochimie Génétique et Moléculaire de Grenoble. Il y avait au total 17 mutations identifiées, avec 7 mutations faux-sens, 1 mutations non-sens, 3 microdélétions, et 6 variations altérant l'épissage. Environ la moitié des variations de *CASQ2* est de nature tronquante (9 sur 17), et l'autre moitié est constituée des mutations faux-sens, ce qui est en accord avec les données de la littérature (Leenhardt et al. 2012). Le mécanisme physiopathologique sous-jacent est une absence de protéine dans environ la moitié des cas. Le mécanisme physiopathologique associé aux mutations faux-sens est moins évident, la nature de la substitution de l'acide aminé ayant un impact sur la fonction de la protéine, selon sa localisation et ses propriétés physicochimiques. Les mutations faux-sens peuvent donc être associées à un défaut fonctionnel de la protéine. Elles peuvent également être associées à un défaut quantitatif (absence de protéine) soit parce que la protéine est dégradée, soit parce que la substitution nucléotidique correspondant à la variation faux-sens va entraîner une anomalie d'épissage.

Il a été montré que toute variation nucléotide est susceptible d'altérer l'épissage par des mécanismes plus ou moins complexes. J'ai regardé dans ce travail si les mutations faux-sens identifiées au niveau du gène *CASQ2* étaient susceptibles d'altérer l'épissage.

Ceci présente plusieurs intérêts :

1/ Il s'agit de comprendre le mécanisme pathogène de la variation et donc le mécanisme physiopathologique associé. En effet, pour une mutation faux-sens, c'est le changement d'acide aminé qui entraîne une altération de la fonction de la protéine alors que pour une mutation d'épissage, la conséquence est généralement un saut de l'exon situé à proximité, ou l'utilisation d'un site cryptique d'épissage, ces deux mécanismes conduisant en cas de décalage du cadre de lecture à un codon stop prématuré avec une absence de protéine.

2/ D'autre part il sera intéressant à plus long terme d'établir une éventuelle corrélation phénotype-génotype en fonction de la nature des mutations impliquées, ce qui n'est possible que si la nature des mutations est bien définie. En effet, une mutation d'épissage va donner une protéine tronquée, ce qui se traduira par un défaut quantitatif, à l'inverse d'une mutation faux-sens qui va donner un défaut de fonction de la protéine, c'est-à-dire un défaut qualitatif. Il est intéressant de noter que chez les patients étudiés dans ce travail, seuls 3 sur 13 étaient porteurs de deux mutations faux-sens n'affectant pas l'épissage, ce qui suggère une prépondérance des défauts quantitatifs de Casq2 dans la TVPC.

3/ Enfin, à encore plus long terme, il serait envisageable de proposer différents types de thérapie génique selon la nature de la mutation. Une mutation faux-sens se révélant avoir un mécanisme physiopathologique impliquant l'épissage (le plus souvent un saut d'exon), pourrait éventuellement être la cible d'une thérapie génique par chirurgie des ARNs. Ce type de thérapie est applicable aux mutations d'épissage et les preuves de principes sont de plus en plus nombreuses (Singh et al. 2012, Wilton et al. 2005).

### **A. Variants situés au niveau des sites consensus d'épissage**

Six variations étaient situées au niveau des sites consensus d'épissage : c.320-2A>G, c.737+1G>A, c.781T>G, c.939+1G>T, c.939+5G>C et c.1014+1G>A. L'impact de ces variations a été étudié *in silico*.

Au cours de ce travail, les logiciels ont reconnu tous les sites physiologiques de CASQ2 à l'exception du site 5' de l'intron 7 pour la variation c.737+1G>A, ce qui traduit d'une part l'efficacité de ces logiciels pour identifier les sites d'épissage et ce qui a d'autre part permis d'exploiter les analyses réalisées *in silico* pour la grande majorité des mutations étudiées.

Pour les variations c.320-2A>G, c.939+1G>T, c.939+5G>C et c.1014+1G>A, le logiciel Cryp Skip a montré que l'effet probable de l'abolition du site physiologique était un saut de

l'exon correspondant, aboutissant à une protéine tronquée, sauf pour le variant c.1014+1G>A qui n'engendre pas de décalage du cadre de lecture. Le support physiopathologique de 4 des 6 mutations d'épissage est donc une absence de protéine.

Les deux mutations c.781T>G et c.939+5G>C ne modifiaient pas les dinucléotides invariants des sites canoniques d'épissage mais étaient situés à proximité. La variation c.939+5G>C modifiait le cinquième nucléotide de l'intron 9, une position importante du site donneur où se fixent des facteurs d'épissage comme la SnRNP U1 (Cartegni et al. 2002). L'ensemble des logiciels prédisaient une abolition de la reconnaissance de ce site donneur 5', ce qui a été confirmé par une étude sur minigène. L'analyse de cette variation à l'aide de l'algorithme décisionnel a permis de valider son utilisation pour ce variant du gène *CASQ2*, ce qui était intéressant puisqu'il a été élaboré à partir d'analyse des gènes *BRCA1* et *BRCA2* (Houdayer et al. 2012).

Pour la variation c.781T>G (p.W261G), aucun logiciel n'a prédit d'impact sur l'épissage, l'analyse n'a donc pas été poursuivie. Le nucléotide modifié est situé 3 pb en amont du site donneur de l'intron 7, et il n'est pas considéré comme d'importance majeure dans la reconnaissance du site donneur, ce qui est en accord avec les prédictions bioinformatiques (Cartegni et al. 2002). L'effet le plus probable de cette variation apparaît donc être lié à la substitution du tryptophane par une glycine en position 261. Il s'agit de l'un des cinq tryptophanes de la protéine qui participe au « cœur hydrophobe » du domaine III de la protéine avec les tryptophanes 318 et 343 (Kim et al. 2007). La perte de fonction de la protéine associée à la variation p.W261G est très probable, en effet, la substitution de tryptophane en position 261 risque d'entraîner la perte de l'intégrité du cœur hydrophobe du domaine III avec une altération fonctionnelle de la protéine.

Au total, il est intéressant de noter que les prédictions bioinformatiques constituent un élément important complémentaire pour la prise de décision d'explorations complémentaires de l'impact de variants de signification incertaine.

Les recommandations de l'ANPGM offrent une méthode bioinformatique d'étude simple, avec une excellente sensibilité (96%).

### ***B. Variants situés en dehors des sites consensus d'épissage***

J'ai décidé d'étudier les variations suivantes situées en dehors des zones consensus d'épissage : les variations faux-sens c.44C>G, c.115G>A, c.164A>G, c.545T>C, c.572C>T et c.923C>A, la variation synonyme c.381C>T et la variation intronique c.838+88T>G. Je n'ai pas étudié les microdélétions ni la variation non-sens car leur caractère délétère étant admis, l'intérêt de l'étude de leur impact sur l'épissage était moindre.

Pour les variations c.44C>G, c.115G>A, c.164A>G, c.545T>C et c.572C>T, aucun site ne prédisait d'altération de l'épissage.

Pour la mutation c.923C>A, les résultats étaient discordants. Si NetGene2 ne reconnaissait aucune création de site, pour HSF, un site émergeait pour atteindre 94% du score du site naturel. Pour MES, le score de 2.95 n'atteignait que 31% du score du site.

Il était à noter que cette variation affaiblissait 7 ESE, dont 2 étaient complètement abolis.

Le groupe d'étude sur l'épissage de l'ANPGM n'offrant pas de recommandation claire quant à la conduite à tenir en cas de discordance entre les logiciels de prédictions, avec seulement 1 outil bioinformatique sur 3 en faveur d'une altération de l'épissage ce variant n'a pas été retenu. On peut tout de même privilégier l'hypothèse de l'impact de la substitution d'acide aminé comme mécanisme pathogène. La variation p.P308Q concerne un acide aminé très conservé de la protéine. Elle est située dans la courte boucle entre le feuillet  $\beta 3$  et l'hélice  $\alpha 13$

du domaine III de la protéine (Figure 8, p27). Il s'agit probablement d'un résidu fondamental en terme structural pour la protéine (de la Fuente 2008).

Pour le variant c.838+88T>G, si le site NetGene2 ne mettait en évidence aucune création de site de novo, les logiciels MES et HSF s'accordaient pour l'activation d'un site cryptique, avec des scores respectivement à 126% et 103% du score du site sauvage.

Avec deux logiciels d'étude en faveur d'un impact sur l'épissage, ce variant était donc à considérer légitimement comme candidat à un test *in vitro* à l'aide d'un minigène. Cette étude fonctionnelle n'a pas mis en évidence d'altération de l'épissage, ce qui est donc en défaveur de son caractère pathogène. Cependant, l'étude par minigène présente des limites et n'est qu'un reflet inexact de l'épissage physiologique. En effet, dans le minigène seules les 200 pb introniques bornant l'exon étudié sont présentes alors qu'il est connu que l'épissage est un mécanisme complexe qui met en jeu des séquences régulatrices quelquefois situées à plusieurs centaines de pb de distance. D'autre part, l'épissage diffère en fonction du type cellulaire, et étudier des transcrits issus d'une lignée de cardiomyocytes pourrait donner des résultats différents. L'étude de minigène reste néanmoins un outil d'étude intéressant et relativement simple à mettre en place.

La transmission autosomique récessive de la pathologie chez le proband porteur de la variation c.838+88T>G n'est donc pas établie, mais il est possible qu'une variation plus profonde n'ait pas été identifiée. Il est également envisageable qu'un autre gène encore inconnu soit responsable de son phénotype.

Enfin, la variation c.381C>T ; p.= était prédite comme altérant l'épissage pour tous les outils bioinformatiques, ce qui confirmait le résultat d'une étude par minigène réalisée dans un travail précédent.

Au cours de ce travail, j'ai également observé que la plupart des variants avaient un impact *in silico* sur les séquences régulatrices (ESE majoritairement) par abolition de site et/ou création

de sites (données non montrées). Cependant, les recommandations de l'ANPGM préconisent de ne pas interpréter ces prédictions car à ce jour, trop peu de données ont été étudiées (Houdayer et al. 2011).

Les recommandations du groupe d'étude sur l'épissage ont été principalement établies à partir de travaux réalisés sur le gène *BRCA1* ce qui pourrait être considéré comme une limite. Néanmoins l'utilisation de ces logiciels a permis de valider a posteriori l'impact de variations étudiées par minigène (c.939+5G>C et c.381C>T ; p.=, Roux-Buisson et al. 2011). Il est également intéressant de constater que les variations pour lesquelles les résultats des différents outils de prédiction n'étaient pas concordant n'ont pas pu être confirmés après étude par minigène (c.838+88T>G).

En conclusion, l'utilisation systématique de l'algorithme décisionnel impliquant des prédictions bioinformatiques pourrait être mise en place en diagnostic de routine, pour envisager par la suite une validation fonctionnelle par minigène de certaines variations. Il sera intéressant de développer au laboratoire l'analyse des transcrits leucocytaires afin de permettre l'étude de transcrits de *CASQ2 in vivo*, car les biopsies cardiaques ne sont jamais obtenues.

## **II. Etude de la mutation faux-sens p.S15C de Casq2**

La deuxième partie du projet avait pour but de réaliser une caractérisation fonctionnelle d'un nouveau variant de *CASQ2* : p.S15C, situé dans le peptide signal de la protéine.

### **A. Clonage de Casq2**

Dans un premier temps, j'ai réalisé le clonage de l'ADNc de *CASQ2* humain. La construction présente une courte partie 5'UTR et inclut une séquence consensus KOSAK optimale pour permettre une meilleure transfection, ainsi qu'une étiquette HA en 3' pour assurer une détection efficace. On notera sur le plan technique que l'utilisation du kit TOPO-TA nécessitant l'utilisation d'une polymérase sans activité 3'exonucléase a été peu efficace lors du clonage puisque 19 colonies sur 20 présentaient des erreurs de séquences. Par la suite, nous n'avons plus utilisé ce kit pour le clonage de produits PCR afin de contourner ce problème. Nous avons décidé d'utiliser le kit TOPO-Blunt, qui permet d'utiliser une polymérase « proof-reading » avec une activité 3' exonucléasique lors de la PCR, ce qui nous a permis d'obtenir une proportion majoritaire de clones sans erreur de séquences (données non montrées).

J'ai donc obtenu un clone de Casq2 sauvage, et muté p.S15C tagué HA. Ce clone a été utilisé dans ce travail pour étudier la variation p.S15C mais pourra servir pour l'étude fonctionnelle d'autres mutations faux-sens identifiées au laboratoire.

## ***B. Etude de la mutation p.S15C***

Dans un deuxième temps, j'ai étudié l'impact de la mutation p.S15C de la protéine Casq2 sur l'expression, la localisation, et la capacité de polymérisation de la protéine à l'aide du clone élaboré.

La première hypothèse était que la mutation pouvait empêcher l'adressage correct de la protéine au réticulum ou le clivage du peptide signal par l'endopeptidase dans la lumière du réticulum. Dans ce cas, la protéine mutée resterait à l'état de précurseur en conservant la séquence signal de 19 acides aminés. La protéine mutée présenterait donc une différence de masse moléculaire de 2 kDa avec la protéine sauvage.

L'étude d'expression par immunoblot (Figure 26) n'a pas permis de mettre en évidence de différence de poids moléculaire entre la protéine sauvage et mutée, même si une variation de PM de 2kDa correspondant au 19 AA du PS n'est pas forcément distinguable sur un gel à 8%. D'autres gels ont été réalisés (15%, gradient 5-15% données non montrées) mais n'ont pas mis en évidence de différence de masse moléculaire. Les analyses en spectrométrie de masse pourront mieux répondre à cette question.

Il a été décrit dans la littérature que des mutations situées dans le peptide signal pouvaient provoquer un défaut d'adressage et une dégradation de la protéine (Mencarelli et al. 2012). Malheureusement, il existe peu de données publiées sur des mutations de ce type, la plupart des articles sont des rapports de cas (Hussain et al. 2013, Beck et al. 2011, Shafer et al. 2013). Les études en immunoblot n'ont pas mis en évidence de dégradation de la protéine Casq2 mutée p.S15C. Toutefois, le modèle de surexpression utilisé dans cette étude pourrait masquer une éventuelle dégradation qu'il serait possible d'observer en conditions physiologiques.

Les études de localisation intracellulaire (Figures 27 et 28) ont montré que Casq2 taguée HA était dans le réticulum endoplasmique, en accord avec les données de la littérature (Kim et al. 2007), et avec la localisation physiologique de Casq2 dans la lumière du RS du

cardiomyocyte. Les images d'accumulations périnucléaires observées restent après surexpression encore à documenter. Il n'est pas à exclure qu'une accumulation de la protéine se forment dans le RE, dans des conditions de surexpression mais cela n'a pas été rapporté lors de surexpression de la protéine non taguée. En revanche, il a été décrit des aspects de condensation de la protéine taguée par DsRed (Milstein et al. 2009). Il donc possible que ces images soient le fait de l'étiquette HA de la protéine. Pour étudier l'éventuel impact de l'étiquette HA sur l'existence d'images d'accumulation, un clone sans étiquette HA a été récemment élaboré au laboratoire et il est prévu d'étudier son profil en immunofluorescence après transfection.

L'étude de glycosylation a montré que la protéine mutée ne se transitait pas par l'appareil de Golgi. Ce résultat confirme d'une façon plus quantitative l'expérience de co-marquage en IF de la protéine Casq2 avec la giantine. L'ensemble de ces résultats est donc en défaveur d'une altération de l'adressage ou du trafic de Casq2 portant la mutation p.S15C. Il semble donc peu probable que cette mutation joue un rôle sur la reconnaissance du PS par la SRP.

Au total, il n'y avait pas de différence de localisation ni dans le transit par les études réalisées observable entre la protéine sauvage et la protéine mutée, néanmoins, ce résultat n'exclut pas la possible pathogénicité de la mutation p.S15C. En effet, on peut s'attendre à une localisation normale de la protéine, mais avoir des défauts de polymérisation, ou des défauts fonctionnels.

L'étude de polymérisation semble montrer une différence intéressante, elle suggère que la protéine mutée ne se dimérise pas correctement. (Figure 31). Cette donnée est d'autant plus intéressante que c'est la partie N-terminale de la protéine qui est impliquée dans la dimérisation. Il semblerait donc envisageable que la protéine mutée soit bien adressée au reticulum mais que le peptide signal ne soit ensuite pas clivé à cause de la mutation. En effet,

d'un côté, la protéine mutée est localisée au niveau du reticulum malgré la modification de la séquence du PS (voir études de localisation en immunofluorescence). D'un autre côté, la mutation semble être associée à des anomalies de dimérisation de la protéine alors que la dimérisation de la protéine fait intervenir une interaction entre les 2 parties N-terminales de deux protéines Casq2. Il est à noter également que la partie C-terminale joue un rôle après la dimérisation pour former des tétramères, et que l'étiquette HA en C-terminale peut gêner de façon artificielle cette polymérisation. Une seconde limite de ce résultat est la différence de protéines déposée dans les puits lors du WB. Il est prévu de réextraire en conditions non dénaturantes en plus grande quantités, et de doser les protéines pour pouvoir adapter les dépôts.

Pour documenter l'absence de clivage ou non du peptide signal de la protéine Casq2 mutée p.S15C, il est prévu de réaliser le séquençage de la partie N-terminale de Casq2 sauvage et mutée par spectrométrie de masse. Dans ce sens, j'ai mis au point le protocole d'immunoprécipitation de Casq2, qui permet d'obtenir la protéine purifiée en quantité (Figure 32). Ce projet est prévu en collaboration avec la plateforme de protéomique EDyP du CEA de Grenoble.

Au terme de cette deuxième partie de ce projet, j'ai donc pu réaliser différentes études à l'aide de deux constructions plasmidiques l'une contenant la séquence sauvage et l'autre mutée p.S15C de Casq2. Il semble que cette mutation pourrait affecter la dimérisation de Casq2. Toutefois, les approches réalisées ne permettent pas de démontrer avec certitude un impact de la mutation au niveau protéique. Le résultat du séquençage N-terminal pourra conclure à un clivage normal ou anormal du peptide signal pour la protéine mutée. Dans le cas d'un clivage normal, cela n'exclurait pas l'impact pathogène de la mutation p.S15C. En effet, même si l'hypothèse d'une altération de l'épissage reste peu probable comme l'ont montrées les

analyses *in silico*, on peut imaginer qu'une partie de la protéine n'est pas reconnue par la SRP, reste dans le cytosol, puis est dégradée. Seule la fraction correctement adressée pénétrerait dans le RE et serait détectable en spectrométrie.

Ce travail a donc permis de valider des outils bioinformatiques qui seront utilisable de manière systématique au laboratoire de Biochimie Génétique Moléculaire de Grenoble, pour le gène *CASQ2* dans un premier temps, et pourra éventuellement être étendu à d'autres gènes. L'étude des transcrits leucocytaires permettra, en conjonction avec l'étude par minigène, une validation fonctionnelle des altérations d'épissage mises en évidence *in silico*. Enfin, le clone de *CASQ2* sera utilisé pour étudier d'autres mutations faux-sens, des amorces de mutagenèse dirigée ont déjà été dessinées pour étudier les variations c.115G>A, c.164A>G, c.545T>C.

## CONCLUSION

THESE SOUTENUE PAR : Sarrabay Guillaume

TITRE : Etudes de variants du gène de la calséquestrine de type 2 (*CASQ2*).

La tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique est une pathologie rythmique cardiaque héréditaire d'un pronostic sévère avec une mortalité à 50 % avant 40 ans. Le diagnostic présymptomatique des apparentés de sujets atteints permet la mise en place d'un traitement préventif et donne donc toute sa place à l'étude génétique pour cette pathologie. Le gène *CASQ2* auquel je me suis intéressé dans cette étude fait partie des principaux gènes impliqués dans cette maladie. Il code une protéine localisée dans le reticulum sarcoplasmique des cardiomyocytes et qui est impliquée dans le stockage et la libération du calcium. Les mutations associées au gène *CASQ2* sont de nature hétérogène, des mutations faux-sens, non-sens, des microdélétions et des mutations d'épissage étant décrites. La caractérisation et l'interprétation des variations identifiées en diagnostic peuvent être délicates lorsqu'il s'agit de nouvelles variations non répertoriées dans la littérature. Certains outils bioinformatiques vont aider à leur interprétation, mais en définitive seule une étude fonctionnelle permettra de déterminer le caractère pathogène ou non d'une variation.

Une première partie de mon travail a consisté à recenser les mutations du gène *CASQ2* mises en évidence au laboratoire de Biochimie Génétique et Moléculaire de Grenoble, des années 2007 à 2013. Je me suis particulièrement intéressé aux conséquences sur l'épissage des variants identifiés. J'ai utilisé des outils bioinformatiques pour déterminer leur impact de manière prédictive, en utilisant des recommandations récentes issues du groupe de travail sur l'épissage de l'Association Nationale des Praticiens de Génétique Moléculaire (ANPGM). Il apparaît que près de la moitié des variations qui ont été identifiées au laboratoire altèrent

l'épissage de l'ARNm de *CASQ2*. J'ai validé l'utilisation de l'algorithme proposé par l'ANPGM pour les mutations identifiées au laboratoire et j'ai en particulier étudié une variation intronique profonde de signification inconnue, c.838+88T>G, grâce à l'utilisation d'un minigène, ce qui a permis d'écarter le rôle pathogène de ce variant.

Dans un second temps, je me suis intéressé à la variation faux-sens c.44C>G (p.S15C) située dans le peptide signal de Casq2. Après avoir réalisé un clonage de l'ADNc de *CASQ2*, j'ai réalisé différentes études cellulaires dans un modèle de surexpression, qui n'ont pas permis de montrer un impact de la mutation p.S15C sur l'expression, la localisation, ou le trafic de la protéine. Néanmoins, il semblerait que la mutation p.S15C altère la capacité de polymérisation de la protéine Casq2. Les investigations sont encore en cours, avec en perspective la caractérisation de l'extrémité N-terminale de la protéine, en collaboration avec la plateforme d'Etude de la Dynamique des Protéomes (EDyP, CEA), afin de d'étudier la persistance du peptide signal de la protéine mutée.

Au total, ce travail a permis de valider l'utilisation d'outils permettant des prédictions bioinformatiques sur l'impact que peuvent avoir des variants du gène *CASQ2* sur l'épissage. Un clone de l'ADNc de *CASQ2* a également été développé, permettant l'étude ultérieure de mutations faux-sens identifiées au laboratoire de Biochimie Génétique et Moléculaire de Grenoble.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 9/10/2013



LE PRESIDENT DE LA THESE

PROFESSEUR

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Ackerman, M. J., et al. (2011). "HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA)." Heart Rhythm **8**(8): 1308-1339.
- Beard, N. A., et al. (2004). "Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle." Prog Biophys Mol Biol **85**(1): 33-69.
- Beck, B. B., et al. (2011). "Autosomal dominant mutation in the signal peptide of renin in a kindred with anemia, hyperuricemia, and CKD." Am J Kidney Dis **58**(5): 821-825.
- Bers, D. M. (2002). "Cardiac excitation-contraction coupling." Nature **415**(6868): 198-205.
- Bezprozvanny, I., et al. (1991). "Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum." Nature **351**(6329): 751-754.
- Cartegni, L., et al. (2002). "Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing." Nat Rev Genet **3**(4): 285-298.
- Chen, S. R. and D. H. MacLennan (1994). "Identification of calmodulin-, Ca<sup>2+</sup>-, and ruthenium red-binding domains in the Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor) of rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum." J Biol Chem **269**(36): 22698-22704.
- de la Fuente, S., et al. (2008). "A case of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia caused by two calsequestrin 2 mutations." Pacing Clin Electrophysiol **31**(7): 916-919.
- di Barletta, M. R., et al. (2006). "Clinical phenotype and functional characterization of CASQ2 mutations associated with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia." Circulation **114**(10): 1012-1019.
- Doktor, T. K., et al. (2011). "SMN2 exon 7 splicing is inhibited by binding of hnRNP A1 to a common ESS motif that spans the 3' splice site." Hum Mutat **32**(2): 220-230.
- Faggioni, M., et al. (2012). "Calsequestrin mutations and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia." Pediatr Cardiol **33**(6): 959-967.
- Faggioni, M. and B. C. Knollmann (2012). "Calsequestrin 2 and arrhythmias." Am J Physiol Heart Circ Physiol **302**(6): H1250-1260.
- Green, R. E., et al. (2003). "Widespread predicted nonsense-mediated mRNA decay of alternatively-spliced transcripts of human normal and disease genes." Bioinformatics **19 Suppl 1**: i118-121.
- Guo, W. and K. P. Campbell (1995). "Association of triadin with the ryanodine receptor and calsequestrin in the lumen of the sarcoplasmic reticulum." J Biol Chem **270**(16): 9027-9030.
- Gyorke, I., et al. (2004). "The role of calsequestrin, triadin, and junctin in conferring cardiac ryanodine receptor responsiveness to luminal calcium." Biophys J **86**(4): 2121-2128.
- Hayashi, M., et al. (2009). "Incidence and risk factors of arrhythmic events in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia." Circulation **119**(18): 2426-2434.
- Houle, T. D., et al. (2006). "Different endoplasmic reticulum trafficking and processing pathways for calsequestrin (CSQ) and epitope-tagged CSQ." Exp Cell Res **312**(20): 4150-4161.
- Houdayer, C., et al. (2012). "Guidelines for splicing analysis in molecular diagnosis derived from a set of 327 combined in silico/in vitro studies on BRCA1 and BRCA2 variants." Hum Mutat **33**(8): 1228-1238.
- Huke, S. and D. M. Bers (2008). "Ryanodine receptor phosphorylation at Serine 2030, 2808 and 2814 in rat cardiomyocytes." Biochem Biophys Res Commun **376**(1): 80-85.

- Hussain, S., et al. (2013). "Permanent neonatal diabetes due to a novel insulin signal peptide mutation." *Pediatr Diabetes* **14**(4): 299-303.
- Jabbari, J., et al. (2013). "New Exome Data Question the Pathogenicity of Genetic Variants Previously Associated With Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia." *Circ Cardiovasc Genet* **6**(5): 481-489.
- Jarjanazi, H., et al. (2008). "Biological implications of SNPs in signal peptide domains of human proteins." *Proteins* **70**(2): 394-403.
- Jiang, D., et al. (2004). "RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death reduce the threshold for store-overload-induced Ca<sup>2+</sup> release (SOICR)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(35): 13062-13067.
- Kalyanasundaram, A., et al. (2012). "Functional consequences of stably expressing a mutant calsequestrin (CASQ2D307H) in the CASQ2 null background." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **302**(1): H253-261.
- Kim, E., et al. (2007). "Characterization of human cardiac calsequestrin and its deleterious mutants." *J Mol Biol* **373**(4): 1047-1057.
- Kirchhefer, U., et al. (2010). "The human CASQ2 mutation K206N is associated with hyperglycosylation and altered cellular calcium handling." *J Mol Cell Cardiol* **49**(1): 95-105.
- Kobayashi, Y. M., et al. (2000). "Localization and characterization of the calsequestrin-binding domain of triadin 1. Evidence for a charged beta-strand in mediating the protein-protein interaction." *J Biol Chem* **275**(23): 17639-17646.
- Kuwajima, G., et al. (1992). "Two types of ryanodine receptors in mouse brain: skeletal muscle type exclusively in Purkinje cells and cardiac muscle type in various neurons." *Neuron* **9**(6): 1133-1142.
- Lacampagne, A., et al. (2008). "[Ryanodine receptor and heart disease]." *Med Sci (Paris)* **24**(4): 399-405.
- Lahat, H., Pras, E., Olender, T., Avidan, N., Ben-Asher, E., Man, O., Levy-Nissenbaum, E., Khoury, A., Lorber, A., Goldman, B., et al. (2001). "A missense mutation in a highly conserved region of CASQ2 is associated with autosomal recessive catecholamine-induced polymorphic ventricular tachycardia in Bedouin families from Israel." *Am J Hum Genet* **69**, 1378-1384.
- Lanner, J. T., et al. (2010). "Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(11): a003996.
- Leenhardt, A., Lucet, V., Denjoy, I., Grau, F., Dongoc, D., and Coumel, P. (1995). "Catecholaminergic Polymorphic Ventricular-Tachycardia in Children - a 7-Year Follow-up of 21 Patients." *Circulation* **91**, 1512-1519
- Liu, N., Ruan, Y., and Priori, S.G. (2008a). "Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia." *Prog Cardiovasc Dis* **51**, 23-30.
- Liu, Q.Q., Oberti, C., Zhang, X.Q., Ke, T., Zhang, T., Scheinman, M., Hu, D.Y., and Wang, Q.K. (2008b). [A Novel mutation of F189L in CASQ2 in families with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* **25**, 334-337.
- Lopez-Bigas, N., et al. (2005). "Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease?" *FEBS Lett* **579**(9): 1900-1903.
- Mencarelli, M., et al. (2012). "A novel missense mutation in the signal peptide of the human POMC gene: a possible additional link between early-onset type 2 diabetes and obesity." *Eur J Hum Genet* **20**(12): 1290-1294.
- Milstein, M. L., et al. (2009). "Calsequestrin isoforms localize to different ER subcompartments: evidence for polymer and heteropolymer-dependent localization." *Exp Cell Res* **315**(3): 523-534.

- Murphy, R. M., et al. (2011). "Quantification of calsequestrin 2 (CSQ2) in sheep cardiac muscle and Ca<sup>2+</sup>-binding protein changes in CSQ2 knockout mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **300**(2): H595-604.
- Nakai, J., et al. (1990). "Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel." FEBS Lett **271**(1-2): 169-177.
- Neylon, C.B., Richards, S.M., Larsen, M.A., Agrotis, A., and Bobik, A. (1995). "Multiple types of ryanodine receptor/Ca<sup>2+</sup> release channels are expressed in vascular smooth muscle." Biochem Biophys Res Commun **215**, 814-821.
- Nyegaard, M., et al. (2012). "Mutations in calmodulin cause ventricular tachycardia and sudden cardiac death." Am J Hum Genet **91**(4): 703-712.
- Park, H., Wu, S., Dunker, A.K., and Kang, C. (2003). "Polymerization of calsequestrin. Implications for Ca<sup>2+</sup> regulation." J Biol Chem **278**, 16176-16182.
- Postma, A.V., Denjoy, I., Hoorntje, T.M., Lupoglazoff, J.M., Da Costa, A., Sebillon, P., Mannens, M.M., Wilde, A.A., and Guicheney, P. (2002). "Absence of calsequestrin 2 causes severe forms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia." Circ Res **91**, e21-26.
- Priori, S.G., Napolitano, C., Memmi, M., Colombi, B., Drago, F., Gasparini, M., DeSimone, L., Coltorti, F., Bloise, R., Keegan, R., et al. (2002). "Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia." Circulation **106**, 69-74.
- Roux-Buisson, N., Rendu, J., Denjoy, I., Guicheney, P., Goldenberg, A., David, N., Faivre, L., Barthez, O., Danieli, G.A., Marty, I., et al. (2011b). "Functional analysis reveals splicing mutations of the CASQ2 gene in patients with CPVT: implication for genetic counselling and clinical management." Hum Mutat.
- Roux-Buisson, N., et al. (2012). "Absence of triadin, a protein of the calcium release complex, is responsible for cardiac arrhythmia with sudden death in human." Hum Mol Genet **21**(12): 2759-2767.
- Sanchez, E.J., Munske, G.R., Criswell, A., Milting, H., Dunker, A.K., and Kang, C. (2011). "Phosphorylation of human calsequestrin: implications for calcium regulation." Mol Cell Biochem **353**, 195-204.
- Schafer, A. L., et al. (2013). "Panostotic expansile bone disease with massive jaw tumor formation and a novel mutation in the signal peptide of RANK." J Bone Miner Res.
- Schweingruber, C., et al. (2013). "Nonsense-mediated mRNA decay - mechanisms of substrate mRNA recognition and degradation in mammalian cells." Biochim Biophys Acta **1829**(6-7): 612-623.
- Shen, X., Franzini-Armstrong, C., Lopez, J.R., Jones, L.R., Kobayashi, Y.M., Wang, Y., Kerrick, W.G., Caswell, A.H., Potter, J.D., Miller, T., et al. (2007). "Triadins modulate intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis but are not essential for excitation-contraction coupling in skeletal muscle." J Biol Chem **282**, 37864-37874.
- Shin, D.W., Ma, J., and Kim, D.H. (2000). "The asp-rich region at the carboxyl-terminus of calsequestrin binds to Ca<sup>2+</sup> and interacts with triadin." FEBS Lett **486**, 178-182.
- Terentyev, D., Cala, S.E., Houle, T.D., Viatchenko-Karpinski, S., Gyorke, I., Terentyeva, R., Williams, S.C., and Gyorke, S. (2005). "Triadin overexpression stimulates excitation-contraction coupling and increases predisposition to cellular arrhythmia in cardiac myocytes." Circ Res **96**, 651-658
- Tester, D. J., et al. (2006). "Genotypic heterogeneity and phenotypic mimicry among unrelated patients referred for catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia genetic testing." Heart Rhythm **3**(7): 800-805.
- Towbin, J. A. (1995). "New revelations about the long-QT syndrome." N Engl J Med **333**(6): 384-385.
- Vukcevic, M., et al. (2010). "Functional properties of RYR1 mutations identified in Swedish patients with malignant hyperthermia and central core disease." Anesth Analg **111**(1): 185-190.

Watanabe, H., Chopra, N., Laver, D., Hwang, H.S., Davies, S.S., Roach, D.E., Duff, H.J., Roden, D.M., Wilde, A.A., and Knollmann, B.C. (2009). "Flecainide prevents catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in mice and humans." Nat Med **15**, 380-383.

Wilde, A.A., Bhuiyan, Z.A., Crotti, L., Facchini, M., De Ferrari, G.M., Paul, T., Ferrandi, C., Koolbergen, D.R., Odero, A., and Schwartz, P.J. (2008). "Left cardiac sympathetic denervation for catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia." N Engl J Med **358**, 2024-2029.

Wilton, S. D. and S. Fletcher (2005). "RNA splicing manipulation: strategies to modify gene expression for a variety of therapeutic outcomes." Curr Gene Ther **5**(5): 467-483.

## **ANNEXES**

### Annexe 1 : Séquences des amorces de PCR et séquençage utilisées

Exon 01F	TGTAAGGTATCTGGGGCTTG
Exon 01R	TGGCCAAAGGCATTCCCTCGG
CASQ_2eF	CTGAATCATCCTTCCCCTGA
Exon 02Rb	TTTTCTTTTGCAAGACACATTC
CASQ_3eF	AATCCTGACCCCACTGTCAC
CASQ_3eR	CAGGTTCTCCAGCTTGTCT
Exon 04F	TACAACCTCCCTCCAATGCACTCT
Exon 04R	AGAGGTGCTGAAGACCCATC
CASQ_5eF	GGGGGAACCTATGGGCTTAAA
CASQ_5eR	GGGTCATCACTTTTCCTTGG
CASQ_6eF	GCTCTTGGCAGGTCTGAAAT
Exon 06R	GTTCTGTAAGTCTGGGGTACT
Exon 7bF	GAGCAGGTCTGTTTCCTTAG
Exon 7bR	TGAGCCGTCGTACCCAATCTGTC
Exon 08F	CATTCCAGCTTCTGAGTCCCTGTC
Exon 08R	CCAATATCTTGCAGTTGCATTG
exon 09Fe	CAAGAGATCGCACAGGATCA
exon 09Re	ACGCAATCATGAGGTTGTGA
Exon 10F	CCAAGTCTTCAATTTGCTAAGT
Exon 10R	CTGGCAAGTTTCCTTGAGCAG
Exon 11F	GGGCACTCAGCATAGCTATTC
Exon 11R	GCTAAGTGGGATTGCTGCAT

**Annexe 2: Amorces du plasmide pCIneo**

pCINEO F : 5' - GTT CAA TTA CAG CTC TTA AG – 3'

T3R : 5' - ATT AAC CCT CAC TAA AGG G – 3'

**Annexe 3: Amorces de clonage de CASQ2**

Ca2rnaF : 5' - CAG CCT GTC TGC TCT CTC CT – 3'

Ca2rnaR : 5' - AAG TTT GCT TCC AAG GCT GA – 3'

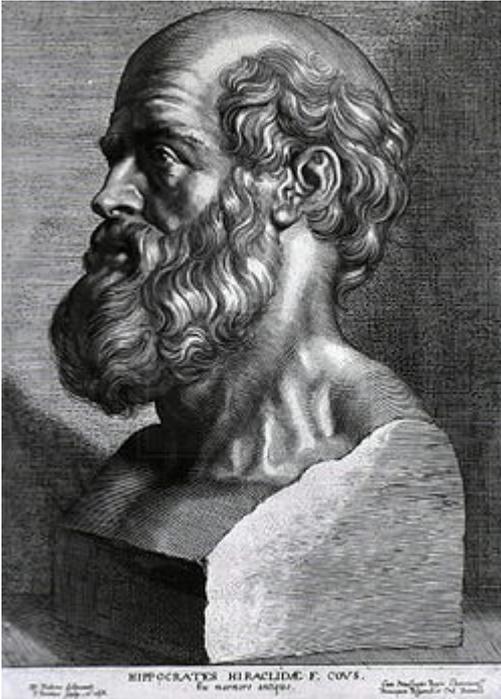
**Annexe 4 : Séquences des amorces sens Ca2HA F et anti-sens Ca2HA R:**

Ca2HA F : 5' - AAAAGCGGCCCGCCCACCATGAAGAGAACTCAC – 3'

Ca2HA\_R :

5'GATGACGATGATGATGAATACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTTAACTCGAG

TTTT – 3'



## **SERMENT D'HIPPOCRATE**

*En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'HIPPOCRATE,*

*Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.*

*Je donnerais mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.*

*Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.*

*Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.*

*Je garderai le respect absolu de la vie humaine.*

*Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.*

*Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.*

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.*

*Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.*

## Résumé :

La calséquestrine de type 2 (Casq2) est la protéine majeure de chélation du calcium dans le reticulum sarcoplasmique dans le muscle cardiaque. Elle est impliquée dans une sévère pathologie rythmique héréditaire : la tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique. Les mutations de *CASQ2* identifiées à Grenoble au laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire de 2007 à 2013 ont été recensées et l'impact sur l'épissage des mutations introniques et faux-sens a été évalué en utilisant des logiciels de prédiction. Deux mutations de *CASQ2* ont fait l'objet d'une étude fonctionnelle: c.44C>G ; p.S15C localisée dans le peptide signal, et c.838+88T>G, une mutation intronique pouvant affecter l'épissage. Les prédictions *in silico* n'ont pas mis en évidence d'altération de l'épissage pour les variations faux-sens testées mais il apparaît que la moitié des mutations identifiées au laboratoire ont un impact sur l'épissage. L'utilisation d'un minigène sauvage et muté en 838+88T>G a permis l'étude des transcrits *in vitro* et n'a montré aucun impact sur l'épissage. La mutation p.S15C a été étudiée *in vitro* par expression ectopique. Cette mutation ne semble pas affecter la localisation de Casq2 dans le reticulum. En revanche, l'étude de polymérisation suggérait un défaut de dimérisation de la protéine mutée, bien que ce résultat soit à confirmer. En conclusion, ces résultats n'ont pas pu prouver la pathogénicité des mutations p.S15C et 838+88T>G mais ont permis de valider de nouveaux outils pour l'étude fonctionnelle des variations qui seront identifiées au laboratoire.

## Abstract :

Cardiac calsequestrin (Casq2) is the major calcium storage protein in the sarcoplasmic reticulum of cardiomyocytes. It is involved in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, a severe inherited arrhythmogenic disorder. *CASQ2* mutations identified from 2007 to 2013 in the Molecular Genetic Laboratory of Grenoble were gathered and splicing effects of intronic and missense mutations were evaluated with prediction softwares. Functional analysis of two *CASQ2* mutations was performed: p.S15C, a missense mutation in the signal peptide, and c.838+88T>G, a deep intronic mutation possibly involved in splicing defect. *In silico* predictions did not detect any splicing effect for the missense mutations but half of the mutations identified in the laboratory were shown to affect *CASQ2* splicing. Wild-type and mutant c.838+88T>G minigene *in vitro* analysis showed no splicing defect. Wild-type and p.S15C mutant were analyzed after cell line transfections. Immunofluorescence studies, immunoblots, and glycosylation studies showed no effect of the p.S15C mutation. Polymerization studies suggested a dimerization defect for the mutant protein, although this results needs to be confirmed. In conclusion, these results could not prove the pathogenicity of the p.S15C and c.838+88T>G mutations but allowed the validation of new tools for further functional analysis in the laboratory.