Expression des récepteurs muscariniques M2, malaises vagaux et mort subite du nourisson

Maxime Beutelstetter

▶ **To cite this version:**

Maxime Beutelstetter. Expression des récepteurs muscariniques M2, malaises vagaux et mort subite du nourisson. Neurobiologie. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT : 2019STRAJ009 . tel-02328734

HAL Id: tel-02328734
https://theses.hal.science/tel-02328734

Submitted on 23 Oct 2019

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.

Université de Strasbourg

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE (ED414)
Unité de recherche INSERM U1119

_____

Thèse d'université

Soutenue publiquement le 8 mars 2019 par :

Maxime BEUTELSTETTER
Né le 13.03.1987 à Strasbourg (67)

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**
Discipline : **Sciences de la Vie et de la Santé**
Spécialité : **Sciences Médicales**

EXPRESSION DES RECEPTEURS MUSCARINIQUES M_2, MALAISES VAGAUX ET MORT SUBITE DU NOURRISSON

CO-DIRECTEURS :

Monsieur le Professeur Jérôme DE SEZE
Centre d'investigation clinique, unité INSERM 1434, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg ; Unité INSERM U1119, Université de Strasbourg. Strasbourg. France.

Monsieur le Professeur Pascal BOUSQUET
Faculté de Médecine, Université de Strasbourg. Strasbourg. France.

RAPPORTEURS :

Monsieur le Professeur Eloi MARIJON
Département de cardiologie, Hôpital Européen Georges-Pompidou ; Centre d'expertise Mort Subite, unité INSERM U970, PARCC, Université Paris Descartes - Sorbonne Paris Cité. Paris. France

Monsieur le Professeur Jean-Benoît THAMBO
Unité Médico-Chirurgicale des Pathologies Cardiaques Congénitales du Fœtus de l'Enfant et de l'Adulte, Hôpital Cardiologique du Haut Lévêque. Bordeaux. France

EXAMINATEURS :

Madame le Professeur Patricia FRANCO
Unité de sommeil pédiatrique, Hôpital femme-mère-enfant, Hospices civiles de Lyon ; Unité INSERM U1028, CNRS UMR 5292, Université Claude-Bernard Lyon 1. Lyon. France

Monsieur le Professeur Jean-Pierre GIES
Unité CNRS UMR 7021, Laboratoire Biomagerie et Pathologie, Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie. Illkirch. France

| Maxime BEUTELSTETTER ▪ m.beutelstetter@gmail.com |

| Biopathologie de la myéline, neuroprotection et stratégies thérapeutiques |
| INSERM U1119 – Faculté de Médecine – Université de Strasbourg |

| Centre d'Investigation Clinique – INSERM 1434 - CHU de Strasbourg |
| Strasbourg ▪ France |

REMERCIEMENTS

❖ **A mes directeurs de thèse**, **les professeurs Jérôme DE SEZE et Pascal BOUSQUET** pour m'avoir accompagné dans cette belle aventure. Merci pour votre confiance, votre aide et votre disponibilité durant toutes ces années. C'était un véritable honneur pour moi d'avoir été encadré par vous.

❖ **Aux membres du jury, les professeurs Patricia FRANCO, Eloi MARIJON, Benoît THAMBO et Jean-Pierre GIES.** Vous me faites l'honneur de juger mon travail. C'est un privilège de pouvoir bénéficier de votre expertise dans l'évaluation de ce travail. Recevez l'expression de ma sincère reconnaissance pour le temps consacré à ce travail et de mes remerciements les plus sincères.

❖ **Au docteur Angelo LIVOLSI,** pour ton implication sans faille dans ce projet de recherche. Ta motivation a été un véritable moteur pour moi durant toutes ces années.

❖ **Aux professeurs Hélène DOLLFUS, Erik SAULEAU, Gérald ROUL, aux docteurs Hugueux GRENEY, Pauline HELMS, Charlie DE MELO, Chris ADAMOPOULOS, Erwan PENCREACH et leurs équipes,** pour votre aide précieuse et votre temps consacré à ce projet de thèse.

❖ **Au professeur Guy MENSAH-Nyagan et toute l'équipe de l'Unité de recherche INSERM 1119,** pour votre acceuil et votre aide durant ce travail de recherche.

❖ **Aux docteurs Catherine MUTTER et Nicolas COLLONGUES,** pour votre soutien et votre encadrement au quotidien.

❖ **A toute l'équipe du CIC**, pour tout ce que vous m'avez apporté, professionnellement et personnellement, durant toutes ces années. Merci pour tous ces bons moments, vous êtes devenus une véritable famille pour moi.

❖ **A mes amis,** pour leur présence depuis toutes ces années. Vous avez toujours été présents pour moi, dans les bons et surtout dans les mauvais moments. C'est une chance d'être aussi bien entouré, merci.

❖ **A mes sœurs, mes neveux, mes cousins, ma tante, mon parrain**, pour tous ces merveilleux moments que nous avons pu passer ensemble. Nous avons une belle famille et les jours passés parmis vous sont très précieux pour moi.

❖ **A mes grands-parents,** que j'aurais aimé avoir à mes cotés aujourd'hui. Vous êtes partis peu de temps avant ce jour, mais vous serez présents dans nos cœurs.

❖ **A mes parents**, pour tout ce que vous avez fait et que vous faites pour moi. Merci pour cet amour que vous m'apportez chaque jour, pour cette confiance que vous avez toujours eue en moi. Si j'en suis là aujourd'hui, c'est grâce à vous. Merci pour tout. Je vous aime.

RESUME

EXPRESSION DES RECEPTEURS MUSCARINIQUES M_2, MALAISES VAGAUX ET MORT SUBITE DU NOURRISSON

La mort subite du nourrisson (MSN) est un phénomène imprévisible et mal compris. Elle est définie par « le décès d'un nourrisson âgé de moins d'un an dont les causes restent inexpliquées malgré des investigations approfondies, incluant une autopsie et un examen de la scène du décès ». Si l'incidence est en décroissance depuis 1994 et le début des campagnes de prévention, la MSN reste la première cause de décès post-néonatale. La MSN est un phénomène multifactoriel qui survient préférentiellement chez des enfants vulnérables exposés à des facteurs de risques environnementaux. Ainsi, le fait d'identifier ces enfants à risque est un enjeu majeur dans la prévention de cette pathologie. La réponse vagale exacerbée, exprimée biologiquement par une surexpression des récepteurs muscariniques de sous-types M_2 (RM_2), pourrait être un facteur de risque de MSN. Nous avons déjà constaté cette anomalie biologique dans notre modèle animal d'hyperréactivité vagale et dans des cœurs de nourrissons décédés de MSN. Le but de ces travaux est d'analyser l'expression sanguine des RM_2 en tant que paramètre biologique reflétant une hyperactivité vagale chez l'Homme, dans des cas de malaises vagaux et de malaises sévères inexpliqués du nourrisson. L'implication de la génétique a également été étudiée dans une famille présentant plusieurs cas de MSN.

Une surexpression des RM_2 a été observée chez des patients présentant des malaises vagaux. Pour la première fois, des anomalies biologiques ont été identifiées dans cette pathologie. Si l'on parvenait à valider ce paramètre biologique en tant que marqueur de risque, cela pourrait permettre d'aider au diagnostic différentiel et à la prise en charge thérapeutique de ces syncopes vagales.

Les mêmes anomalies ont été observées chez des enfants de moins d'un an présentant des malaises sévères idiopathiques.

Après une première analyse des données du séquençage haut débit d'exomes issus d'une famille présentant plusieurs cas de MSN, nous avons pu identifier 3 gènes pouvant être impliqués dans la MSN. Néanmoins, le scénario et le mode de transmission sont difficiles à définir. Les premières hypothèses s'orientent vers un digénisme ou même un trigénisme. La surexpression des RM_2 chez les 2 parents et chez certains enfants est un premier élément suggérant la transmission du caractère « hyperactivité vagale » chez l'Homme.

Nos travaux ont permis de mettre en évidence une anomalie biologique commune entre les malaises vagaux, les malaises inexpliqués du jeune enfant et la MSN, à savoir la surexpression des RM_2. Ce paramètre, facilement dosable dans le sang, pourrait être un élément complémentaire dans le diagnostic différentiel et la prise en charge de ces pathologies, notamment chez les jeunes enfants pour lesquels ces malaises peuvent être très délétères. L'avancée dans le séquençage du génome permettra peut-être l'identification de facteurs de risque génétiques impliqués dans les malaises inexpliqués ou les MSN.

Mots-clés : *Mort subite du nourrisson (MSN) ; récepteurs muscariniques ; hyperactivité vagale ; malaises vagaux ; acétylcholinestérase.*

ABSTRACT

EXPRESSION OF MUSCARINIC M_2 RECEPTORS, REFLEX SYNCOPE AND SUDDEN INFANT DEATH SYNDROME

Sudden Infant Death Syndrome (SIDS) is an unpredictable and poorly understood phenomenon. It is defined as the "sudden unexpected death of a child younger than one year during sleep that cannot be explained after a postmortem evaluation including autopsy, a thorough history, and scene evaluation". Although the incidence has been decreasing since 1994 and the start of prevention campaigns, SIDS remains the leading cause of post-neonatal death. SIDS is a multifactorial phenomenon that occurs preferentially in vulnerable infants exposed to environmental risk factors. Thus, identifying these children at risk is a major challenge in the prevention of this pathology. The exacerbated vagal response, biologically expressed by overexpression of muscarinic M_2 receptors (M_2R), may be a risk factor for SIDS. We have already observed this biological abnormality in our animal model of vagal hyperreactivity and in hearts of SIDS. The aim of this work is to analyze the blood expression of M_2R as a biological parameter reflecting vagal hyperreactivity in humans, in cases of reflex syncope and idiopathic apparent life-threatening events (iALTE) of infants. The involvement of genetics has also been studied in a family with several cases of SIDS (SIDS family).

Overexpression of M_2R has been observed in patients with reflex syncope. For the first time, biological abnormalities have been identified in this pathology. If this biological parameter could be validated as a risk marker, it could help for differentially diagnosis and treatment of these vagal syncopes.

The same abnormalities were observed in children under one year old with iALTE.

After a first analysis of the data of the “next generation sequencing” of the exomes of our “SIDS family”, we were able to identify 3 genes that could be involved in SIDS. However, the scenario and the mode of transmission are difficult to define. The first hypotheses are oriented towards a digenism or even a trigenism. The overexpression of M_2R in both parents is a first element suggesting the genetic transmission of the character "vagal hyperactivity" in humans.

Our work highlights a biological abnormality which is common to reflex syncope, iALTE and SIDS, namely the overexpression of M_2R. These results confirm the hypothesis of the involvement of the vagal system overactivity in these pathologies. This parameter, easily measurable in the blood, could be a complementary assessment useful in the differential diagnosis and the management of these pathologies, in particular in infants for whom syncope can be very harmful. The development of the sequencing of human genome will probably allow the identification of genetic risk factors involved in iALTE or SIDS.

Keywords: *Sudden infant death syndrome (SIDS); muscarinic receptors; vagal hyperactivity; reflex syncope; acetylcholinesterase;*

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION ..... - 1 -

LA MORT SUBITE DU NOURRISSON ..... - 3 -

Historique ..... - 3 -

Définition ..... - 4 -

Épidémiologie ..... - 4 -

Facteurs de risque de MSN ..... - 8 -

Mécanismes impliqués dans la MSN ..... - 13 -

Études cliniques en cours ..... - 17 -

SYSTEME NERVEUX AUTONOME, SYSTEME CHOLINERGIQUE ET RECEPTEURS MUSCARINIQUES ..... - 19 -

Système nerveux autonome ..... - 19 -

Le système cholinergique ..... - 21 -

Les récepteurs muscariniques ..... - 22 -

Système vagal et cœur ..... - 28 -

TRAVAUX PRECEDENTS ..... - 33 -

2002 : Premier modèle animal d'hyperréactivité vagale ..... - 33 -

2010 : Mise en évidence d'anomalies biologiques du système cholinergique dans les cas d'hyperréactivité vagale ..... - 35 -

2010 : Mise en évidence d'anomalies muscariniques dans le myocarde d'enfants décédés de MSN ..... - 39 -

OBJECTIFS DE LA RECHERCHE CLINIQUE ..... - 45 -

ANOMALIES MUSCARINIQUES ET MALAISES VAGAUX DE L'ADULTE ET DE L'ENFANT ..... - 47 -

ANOMALIES MUSCARINIQUES ET MALAISES IDIOPATHIQUES DU NOURRISSON ..... - 47 -

MSN FAMILIALE : SUREXPRESSION MUSCARINIQUE ET ANALYSE GENETIQUE ..... - 47 -

METHODES ANALYTIQUES ..... - 49 -

Matériel biologique ..... - 51 -

Prélèvement des échantillons ..... - 51 -

Extraction des ARN circulants ..... - 54 -

Dosage des ARN extraits ..... - 58 -

Préparation des ADN complémentaires ..... - 59 -

Conception des amorces ..... - 60 -

Quantification des ARNm par qPCR ..... - 60 -

PARTIE 1 ANOMALIES MUSCARINIQUES ET MALAISES VAGAUX DE L'ADULTE ET DE L'ENFANT ..... - 65 -

Contexte ..... - 67 -
Méthodes ..... - 69 -
Résultats ..... - 77 -
Discussion ..... - 89 -
Perspectives ..... - 92 -

ANOMALIES MUSCARINIQUES ET MALAISES IDIOPATHIQUES DU NOURRISSON ..... - 127 -

Contexte ..... - 129 -
Méthodes ..... - 132 -
Résultats ..... - 133 -
Discussion ..... - 137 -
Perspectives ..... - 138 -
Appel A Projet Jeune Chercheur (AAPJC) – Etude « iALTE » ..... - 139 -
Résumé de l'etude ..... - 142 -

MORT SUBITE DU NOURRISSON FAMILIALE : SUREXPRESSION MUSCARINIQUE ET ANALYSE GENETIQUE ..... - 149 -

Contexte ..... - 151 -
Méthodes ..... - 156 -
Résultats ..... - 160 -
Discussion ..... - 168 -
Perspectives ..... - 170 -

DISCUSSION GENERALE ..... - 175 -

CONCLUSION ET PERSPECTIVES ..... - 181 -

BIBLIOGRAPHIE ..... - 185 -

TRAVAUX PUBLIES ..... - 203 -

CONTRIBUTIONS PERSONNELLES ..... - 207 -

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAPJC : Appel A Projet Jeune Chercheur

Ach : acétylcholine

AchE : acétylcholinestérase

ADN : acide désoxyribonucléique

ALTE : apparent life-threatening event

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de Santé

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messager

CCTIRS : Comité Consultatif sur le Traitement de l'Information en matière de Recherche dans le domaine de la Santé

ChAT : choline acétyltransférase

CHT1 : transporteur de haute affinité de l'acétylcholine

CIC : Centre d'Investigation Clinique

CNIL : Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés

CPP : Comité de Protection des Personnes

ECG : électrocardiogramme

EDTA : ethylènediaminetétraacétique

GABA-A : acide gamma aminobutyrique de type A

GIRCI : Groupement Interrégional de Recherche Clinique et d'Innovation

GMPc : guanosine monophosphate cyclique

HUS : Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

iALTE : idiopathic apparent life-threatening event

IL-2 : interleukine 2

INSERM : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

mAChR : récepteur post-synaptique muscarinique

MFIU : mort fœtale in utérine

MSN : mort subite du nourrisson

nAChR : récepteur post-synaptique nicotinique

NFS : numération de formule sanguine

NGS : Next Generation Sequencing

NHC : Nouvel Hôpital Civil

NICHD : National Institute of Child Health and Human Development

NO : monoxyde d'azote

PNE : phényléphrine

RM_2 : récepteurs muscariniques M_2

ROC : réflexe oculo-cardiaque

RPM : retards psychomoteurs

RT-qPCR : reverse transcriptase – quantitative polymerase chain reaction

SIDS : sudden infant death syndrome

SNA : système nerveux autonome

SNP : système nerveux parasympathique

SNS : système nerveux sympathique

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. PREPARATION DE LA REVERSE TRANSCRIPTASE. .....- 59 -

TABLEAU 2. PREPARATION DES PUITS POUR LA QUANTIFICATION PAR PCR.....- 61 -

TABLEAU 3. CARACTERISTIQUES DES SUJETS INCLUS .....- 71 -

TABLEAU 4. RESUME DES CRITERES DE SELECTION .....- 72 -

TABLEAU 5. RESUME DES VISITES DES SUJETS ADULTES .....- 73 -

TABLEAU 6. RESUME DES VISITES DES SUJETS PEDIATRIQUES .....- 74 -

TABLEAU 7. EXAMENS SYSTEMATIQUES LORS DE L'HOSPITALISATION D'UN NOURRISSON PRESENTANT UN MALAISE SEVERE INEXPLIQUE. .....- 130 -

TABLEAU 8. RESUME DES CARACTERISTIQUES DE BASE A L'INCLUSION DES ENFANTS. .- 133 -

TABLEAU 9. RESUME DES ETAPES DU SEQUENÇAGE HAUT DEBIT DE L'EXOME .....- 152 -

TABLEAU 10. CONTROLE QUALITE DES ECHANTILLONS D'ADN RECEPTIONNES .....- 159 -

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. TAUX (POUR 1000 NAISSANCES) DE MSN DANS LE MONDE. .....- 5 -

FIGURE 2. NOMBRE DE CAS DE MSN EN FRANCE ENTRE 1980 ET 2010 .....- 6 -

FIGURE 3. ÉVOLUTION DU TAUX DE MSN POUR 1000 NAISSANCES ENTRE 1987 ET 2005/2007 DANS PLUSIEURS PAYS AYANT REALISE DES ACTIONS DE PREVENTION .....- 7 -

FIGURE 4. HISTORIQUE DE L'EVOLUTION DES HYPOTHESES SUR L'IMPLICATION MULTIFACTORIELLES DANS LA MSN .....- 8 -

FIGURE 5. MODELE « TRIPLE RISQUE » DE LA MSN .....- 9 -

FIGURE 6. SYSTEME NERVEUX AUTONOME .....- 20 -

FIGURE 7. SYNTHESE ET METABOLISME DE L'ACETYLCHOLINE. .....- 22 -

FIGURE 8. LOCALISATION DES RECEPTEURS MUSCARINIQUES SELON LES SOUS-TYPES...- 24 -

FIGURE 9. SYSTEME CHOLINERGIQUE LYMPHOCYTAIRE. .....- 25 -

FIGURE 10. REFLEXE DE BEZOLD-JARISH. .....- 29 -

FIGURE 11. EXEMPLE D'UN ENREGISTREMENT ECG D'UN LAPIN HYPERREACTIF ET D'UNE MESURE DE LA PRESSION ARTERIELLE (APMMMHG) APRES INJECTION IV DE 100µG/KG DE PHENYLEPHRINE (PNE). .....- 34 -

FIGURE 12. DENSITE DES RECEPTEURS MUSCARINIQUES CARDIAQUES EN FONCTION DE LA BRADYCARDIE (INTERVALLE R-R, MS) .....- 37 -

FIGURE 13. EXPRESSION DES ARN_M DES RECEPTEURS MUSCARINIQUES M_2 DANS LES GLOBULES BLANCS DES LAPINS NORMAUX (N) ET DES LAPINS HYPERREACTIFS (H). .....- 38 -

FIGURE 14. EXPRESSION CARDIAQUE ET ACTIVITE ENZYMATIQUE ERYTHROCYTAIRE DE L'ACHE CHEZ LES LAPINS NORMAUX (N) ET CHEZ LES LAPINS HYPERREACTIFS (H). .....- 38 -

FIGURE 15. DENSITE DES RECEPTEURS MUSCARINIQUES TOTAUX DANS LE CŒUR DES CAS DE MSN (SIDS) ET DE CONTROLES. .....- 40 -

FIGURE 16. ACTIVITE ENZYMATIQUE ERYTHROCYTAIRE DE L'ACHE DANS LES CAS DE MSN (SIDS) ET CHEZ LES CONTROLES. .....- 41 -

FIGURE 17. INSTRUCTIONS DE PRELEVEMENT ET DE STOCKAGE DES TUBES PAXGENE ..- 53 -

FIGURE 18. POSITIONNEMENT DES TUBES PT ET DES COLONNES DE SEPARATION EN FONCTION DU NOMBRE D'ECHANTILLONS .....- 55 -

FIGURE 19. VUE DE L'INTERIEUR DU QIACUBE® .....- 56 -

FIGURE 20. ETAPES DE L'EXTRACTION AUTOMATISEE PAR LE QIACUBE®.....- 57 -

FIGURE 21. EXEMPLE DE DOSAGES DES ARN EXTRAITS PAR LE NANODROP 2000®. .....- 58 -

FIGURE 22. EXEMPLE D'UNE COURBE STANDARD .....- 61 -

FIGURE 23. EXEMPLE DE COURBES D'AMPLIFICATION .....- 62 -

FIGURE 24. EXEMPLE DE COURBES DE FUSION .....- 63 -

FIGURE 25. EXEMPLE DE RAPPORT DE RESULTATS AVEC CALCUL DES CONCENTRATIONS ....- 63 -

FIGURE 26. HISTOGRAMME DE LA DISTRIBUTION DES VALEURS DE L'EXPRESSION DES RM_2 ET DE L'ACHE .....- 76 -

FIGURE 27. EXPRESSION DES ARN_M CIRCULANTS DES RM_2 DANS LA POPULATION TOTALE DE L'ETUDE .....- 77 -

FIGURE 28. EXPRESSION DES ARN_M CIRCULANTS DE L'ACHE DANS LA POPULATION TOTALE DE L'ETUDE.....- 78 -

FIGURE 29. RAPPORT D'EXPRESSION DE ARN_M CIRCULANTS RM_2/ACHE DANS LA POPULATION TOTALE DE L'ETUDE.....- 79 -

FIGURE 30. EXPRESSION DES ARN_M CIRCULANTS DES RM_2 DANS LA POPULATION ADULTE DE L'ETUDE .....- 80 -

FIGURE 31. EXPRESSION DES ARN_M CIRCULANTS DE L'ACHE DANS LA POPULATION TOTALE DE L'ETUDE.....- 81 -

FIGURE 32. RAPPORT D'EXPRESSION DE ARN_M CIRCULANTS RM_2/ACHE DANS LA POPULATION ADULTE DE L'ETUDE.....- 82 -

FIGURE 33. EXPRESSION DES ARN_M CIRCULANTS DES RM_2 DANS LA POPULATION ADULTE DE L'ETUDE EN TENANT COMPTE DES RESULTATS DU TEST DE COMPRESSION CAROTIDIENNE .....- 83 -

FIGURE 34. EXPRESSION DES ARN_M CIRCULANTS DE L'ACHE DANS LA POPULATION ADULTE DE L'ETUDE EN TENANT COMPTE DES RESULTATS DU TEST DE COMPRESSION CAROTIDIENNE .....- 84 -

FIGURE 35. EXPRESSION DES ARN_M CIRCULANTS DES RM_2 DANS LA POPULATION PEDIATRIQUE DE L'ETUDE.....- 86 -

FIGURE 36. EXPRESSION DES ARN_M CIRCULANTS DE L'ACHE DANS LA POPULATION PEDIATRIQUE DE L'ETUDE.....- 87 -

FIGURE 37. RAPPORT D'EXPRESSION DE ARN_M CIRCULANTS RM_2 /ACHE DANS LA POPULATION PEDIATRIQUE DE L'ETUDE.....- 88 -

FIGURE 38. EXPRESSION DES ARN_M CIRCULANTS DANS LES 3 GROUPES D'ENFANTS DE MOINS D'UN AN. ..... - 134 -

FIGURE 39. EXPRESSION DES ARN_M CIRCULANTS DE L'ACHE DANS LES 3 GROUPES D'ENFANTS DE MOINS D'UN AN ..... - 135 -

FIGURE 40. RAPPORT D'EXPRESSION RM_2/ACHE DANS LES 3 GROUPES D'ENFANTS DE MOINS D'UN AN ..... - 136 -

FIGURE 41. POURCENTAGE DE CAS DE MSN AVEC UN VARIANT POTENTIELLEMENT PATHOGENE ..... - 154 -

FIGURE 42. REVUE DES DIFFERENTES MUTATIONS CITEES DANS LA MSN ..... - 155 -

FIGURE 43. ARBRE GENEALOGIQUE COMPLET DE LA FAMILLE « MSN » ..... - 156 -

FIGURE 44. ANALYSE DE LA QUALITE DES ECHANTILLONS D'ADN PAR LA TECHNIQUE D'ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE ..... - 158 -

FIGURE 45. EXPRESSION DES ARN_M CIRCULANTS DES RM_2 DANS LA FAMILLE « MSN » .... - 161 -

FIGURE 46. EXPRESSION DES ARN_M CIRCULANTS DE L'ACHE DANS LA FAMILLE « MSN » .... - 162 -

FIGURE 47. RESUME DES RESULTATS COMBINANT LES VARIANTS IDENTIFIES ET L'EXPRESSION SANGUINE DES ARN_M DES RM_2 ..... - 165 -

FIGURE 48. REPRESENTATION DES INTERACTIONS ENTRE LES GENES ..... - 166 -

FIGURE 49. TEST DE PATHOGENICITE DU SCUB2 C.1448-9G>A ..... - 167 -

FIGURE 50. PRESENTATION DE LA NOUVELLE FAMILLE A L'ETUDE ..... - 171 -

FIGURE 51. EXPRESSION DES ARN_M CIRCULANTS DES RM_2 DANS LA NOUVELLE FAMILLE. .... - 172 -

FIGURE 52. EXPRESSION DES ARN_M CIRCULANTS DE L'ACHE DANS LA NOUVELLE FAMILLE. .. .. - 172 -

FIGURE 53. RECHERCHE DES VARIANTS CAV3 ET CACNA2D2 CHEZ L'ENFANT DE LA NOUVELLE FAMILLE. ..... - 173 -

INTRODUCTION

LA MORT SUBITE DU NOURRISSON

Historique

La notion de « décès soudain d'un jeune enfant de moins d'un an, jusque-là en bonne santé », est très ancienne. Ce phénomène a été cité pour la première fois dans la bible, verset 1 Roi 3 :19 « Le fils de cette femme est mort pendant la nuit, parce qu'elle s'était couchée sur lui ». Cela semble s'apparenter plus à une mort accidentelle par étouffement, mais il s'agit de la première trace écrite d'une mort soudaine d'un nourrisson. Le terme « mort subite du nourrisson ou MSN » a été évoqué pour la première fois en 1969 par Bruce Beckwith, lors de la « 2ème conférence internationale des causes de mort subite chez les nourrissons » à Seattle. Il a été proposé et accepté par l'assemblée des professionnels présente au congrès, afin de donner un nom au sous-groupe d'enfants qui décédaient soudainement en période post-néonatale, dans des circonstances qui présentaient des caractéristiques communes suggérant une cause ou un mécanisme commun. Pour mener des recherches dans cette population, il était important de lui donner un nom et surtout une définition pour en faire un « étiquetage » de décès reconnue. La 1ère définition officielle de la MSN est la suivante : « Une mort soudaine de tout nourrisson ou de jeune enfant, inattendue par rapport à ses antécédents, chez lequel un examen post-mortem approfondi n'a pu identifier une cause cohérente du décès », (Beckwith, 1973). Cette définition a très peu évolué pendant 20 ans, puis au début des années 1990, le « National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) Group » a proposé une nouvelle version de cette définition de la MSN, la limitant aux enfants de moins d'un an, incluant l'examen de la scène du décès et précisant la notion de revue des antécédents (Willinger *et al.*, 1991).

Définition

La MSN est donc définie aujourd'hui par le NICHD comme « un décès soudain d'un enfant de moins d'un an, qui demeure inexpliqué après de nombreuses investigations approfondies incluant une autopsie, un interrogatoire poussé sur les circonstances du décès, un examen de la scène de la mort et une revue des antécédents cliniques » (Willinger *et al.*, 1991). Le terme MSN est en général utilisé lors de la découverte d'un nourrisson mort de façon inexpliquée, qui était jusque-là en bonne santé, lors de son sommeil ou au moment du réveil (Byard and Krous, 2003; Krous *et al.*, 2004; Moon *et al.*, 2007; Kinney and Thach, 2009). La MSN est un phénomène imprévisible et mal compris, elle est souvent considérée comme un diagnostic d'exclusion, faute d'un marqueur biologique ou clinique confirmant une étiologie étiquetée (Byard, 1995). La MSN est rare dans les 2 premières semaines de vie, connaît un pic d'incidence entre le 2ème et le 4ème mois. 95% des cas de MSN sont recensés dans les 6 premiers mois (Fleming *et al.*, 2015), puis cette pathologie devient moins fréquente après le 6ème mois (Blair *et al.*, 2006).

Épidémiologie

A la fin des années 1970, on a constaté une forte augmentation des cas de MSN dans le monde et de nombreux travaux ont mis en relation cette hausse de l'incidence avec la position ventrale pour le couchage des enfants (Fleming *et al.*, 1990; Mitchell *et al.*, 1999). Mais depuis le milieu des années 1990, la campagne « Back to sleep », lancée au États-Unis a permis de réduire fortement l'incidence des MSN dans les pays développés, en proscrivant le décubitus ventral, en faveur d'un couchage sur le dos (American Academy of Pediatrics Task Force on Infant Positioning and SIDS. 1992; Willinger *et al.*, 1994). Elle a permis une diminution de 10 à 80% du taux de MSN selon les pays, (figure 1) (Hauck and Tanabe, 2008).

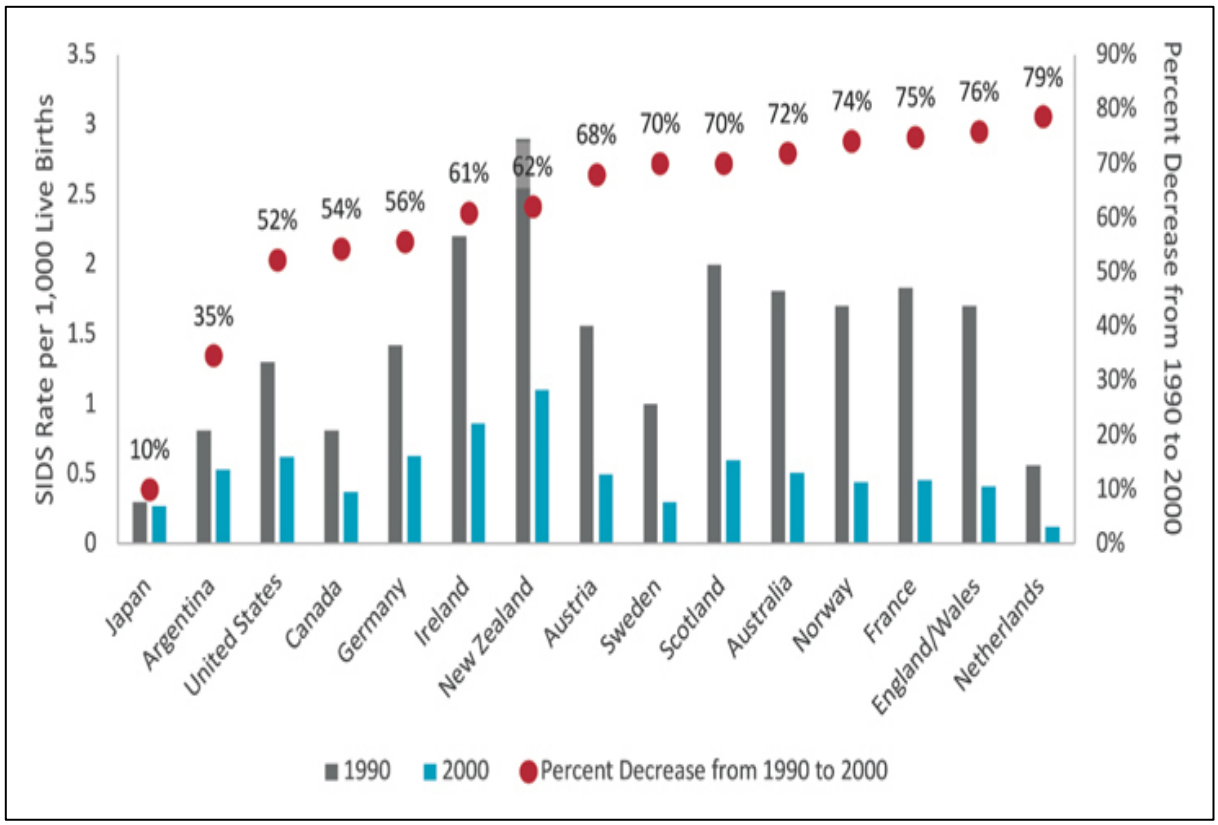


Figure1. Taux (pour 1000 naissances) de MSN dans le monde.

Taux par pays, entre 1990 et 2000 ainsi que le pourcentage de diminution entre 1990 et 2000 pour chaque pays (Shapiro-Mendoza et al., 2018 adaptée de Hauck and Tanabe 2008)

En France, la première campagne de prévention de la MSN, également lancée en 1994, avait pour but de diminuer la mortalité par MSN d'au moins 30% en 1 an. Elle reprenait les mêmes recommandations de couchage sur le dos et a permis de réduire le nombre de cas de MSN par an de 1300 en 1993 à 500 en 1995, (figure 2). Depuis, l'incidence a continué de diminuer plus légèrement mais la MSN reste encore aujourd'hui la 1ère cause de décès en période post-néonatale, du 28ème jour de vie à 12 mois, et est véritablement une angoisse pour les familles (source INSERM, http://www.cepidc.vesinet.inserm.fr).

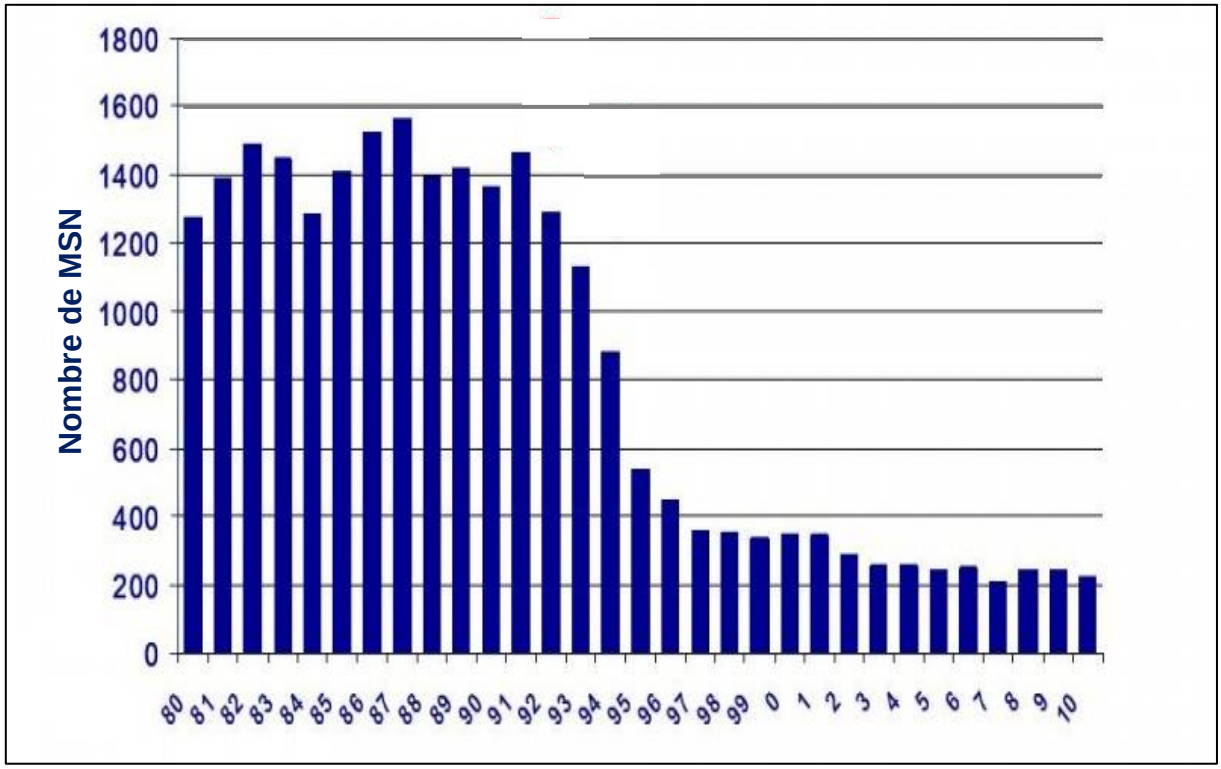


Figure 2. Nombre de cas de MSN en France entre 1980 et 2010

(INSERM, http://www.cepidc.vesinet.inserm.fr)

L'incidence des MSN est actuellement de 0,2 à 0,8 cas pour 1000 naissances viables dans les pays développés (Goldstein *et al.*, 2016). On constate toutefois de grandes différences entre les pays : par exemple, au Japon l'incidence est quasiment 10 fois inférieure à celle de la Nouvelle-Zélande (Moon *et al.*, 2007; Kinney and Thach, 2009), (figure 1). En France, les derniers chiffres de 2010 montrent une incidence de 0,30 cas pour 1000 naissances, légèrement supérieure à la moyenne des pays européens avec 0,25 cas pour 1000 naissances (en 2005) (figure 3). De plus, en 2005 un total de 2769 décès d'enfants de moins d'un an en France métropolitaine a été enregistré. La MSN représentait 1 décès sur 10 dans cette mortalité infantile, c'est-à-dire environ 250 cas en un an (source INSERM, http://www.cepidc.vesinet.inserm.fr).

Les chiffres sur l'incidence globale de la MSN sont à interpréter avec précaution. En effet, le terme de MSN est de plus en plus controversé et il y a eu des changements dans l'étiquetage des décès ces dernières années. Ainsi, plusieurs médecins répertorient les décès dans d'autres catégories de diagnostic, telles que « origine inconnue », « étiologie incertaine » ou « mort mal définie », bien qu'ils répondent aux critères de la MSN (Malloy and MacDorman, 2005).

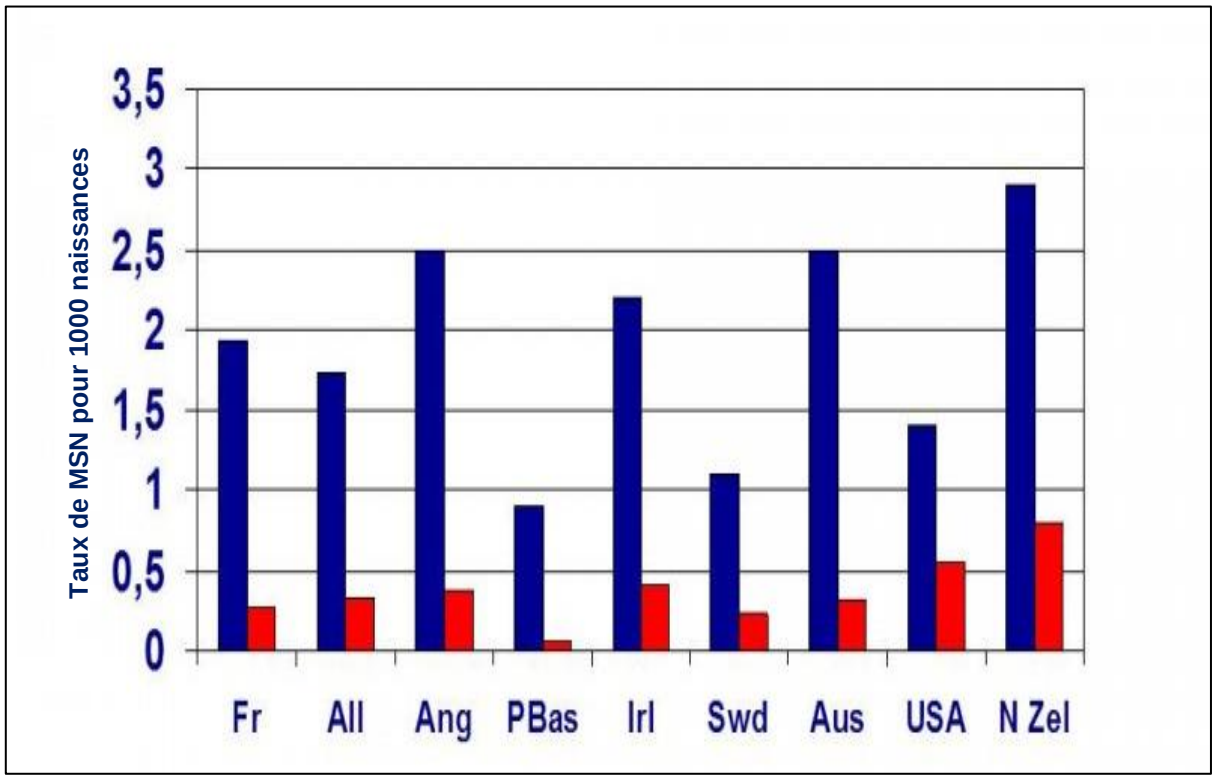


Figure 3. Évolution du taux de MSN pour 1000 naissances entre 1987 et 2005/2007 dans plusieurs pays ayant réalisé des actions de prévention

Colonnes bleues : taux en 1987 ; Colonnes rouges : taux en 2017 ; Fr=France ; All=Allemagne ; Ang=Angleterre ; PBas=Pays-Bas ; Irl=Irlande ; Swd=Suède ; Aus=Australie ; USA=Etats-Unis ; NZel=Nouvelle-Zélande.
(INSERM, http://www.cepidc.vesinet.inserm.fr)

Facteurs de risque de MSN

L'idée d'associer la MSN à un phénomène multifactoriel est évoquée depuis environ 50 ans (Bergman, 1970) et cela a été démontré à travers de nombreuses études, publiées dans la revue de Byard en 1981 notamment (Byard, 1991). L'historique de ces différentes hypothèses sur l'implication de plusieurs facteurs de risque est résumé dans la figure 4 (Spinelli *et al.*, 2017).

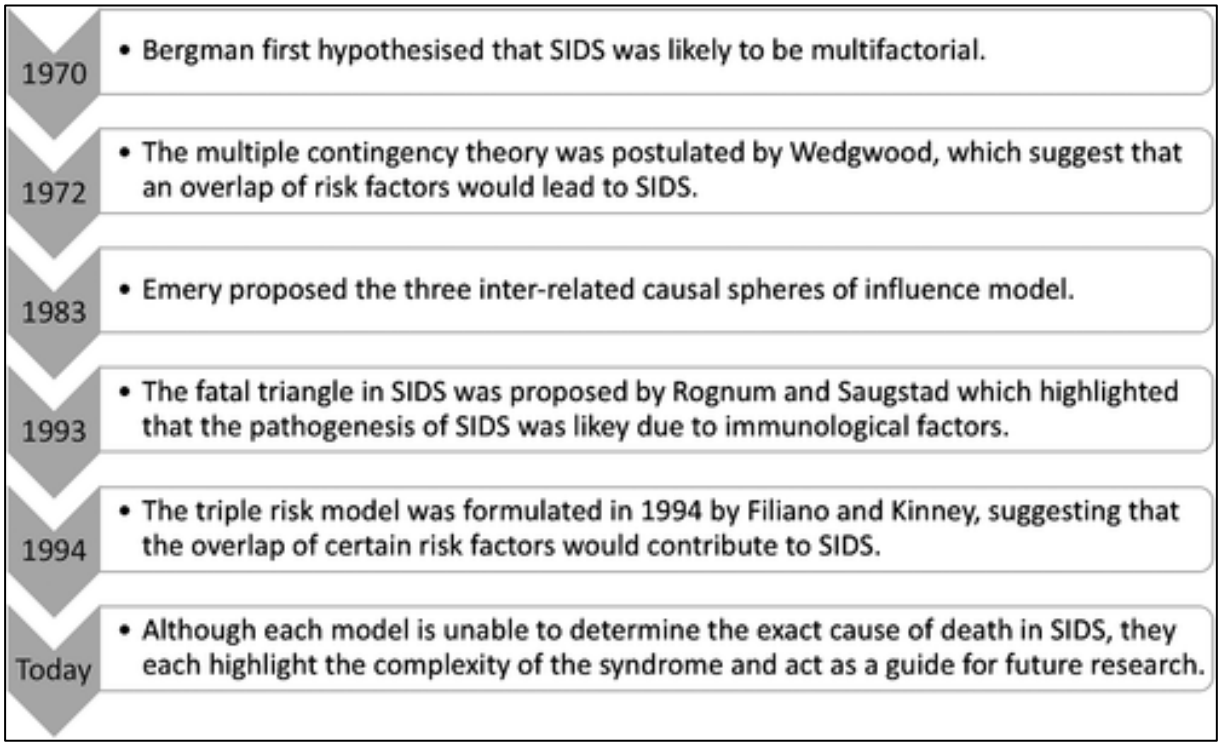


Figure 4. Historique de l'évolution des hypothèses sur une implication multifactorielle dans la MSN

(Spinelli et al., 2017).

Il est admis aujourd'hui que la MSN est un phénomène multifactoriel qui survient préférentiellement chez des enfants vulnérables (facteurs intrinsèques) exposés à des facteurs de risques environnementaux (facteurs extrinsèques) à un moment précis du développement (Malloy, 2004; Spinelli *et al.*, 2017). En 1994, le modèle « triple risque » de la MSN, proposé par Filiano et Kinney, pour schématiser ces facteurs de risques internes et externes à l'enfant potentiellement impliqués dans

la MSN reste la théorie la plus acceptée (Filiano and Kinney, 1994), (figure 5). Dans ce schéma, on constate qu'il y a 3 éléments principaux à risque dans la MSN : un enfant vulnérable ; un moment du développement critique (la 1ère année de vie) ; et enfin un stress extérieur au moment du décès. C'est lorsque ces 3 éléments sont réunis que le risque de MSN est le plus important.

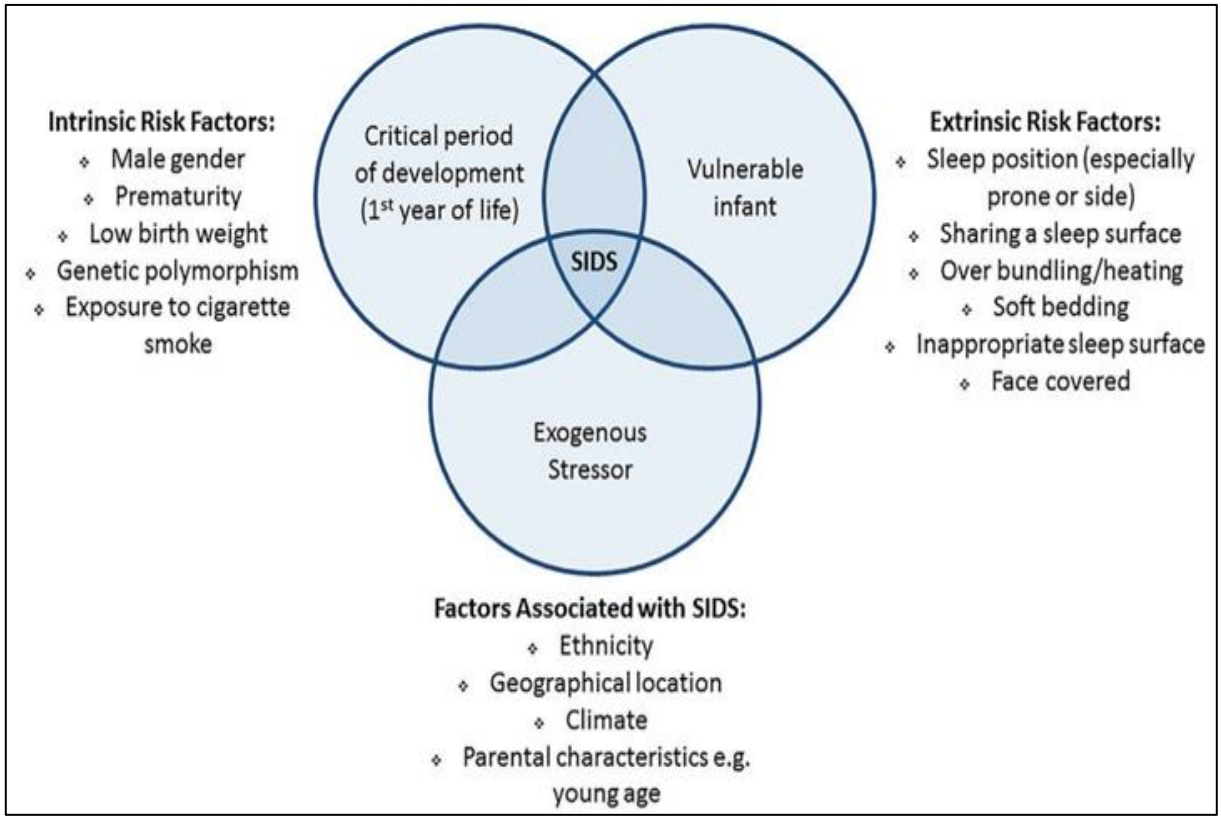


Figure 5. Modèle « triple risque » de la MSN proposé par Trachtenberg et al., 2012, adapté de Filiano et Kinney en 1994

Selon ce modèle, c'est l'association des 3 facteurs qui pourrait entraîner la MSN (SIDS)

Ainsi les facteurs de risque de MSN sont :

- la période du développement : par définition, la MSN concerne les enfants décédés avant leur premier anniversaire mais 90% des cas apparaissent avant le 6ème mois, avec un pic d'incidence entre le 2ème et le 3ème mois. Il s'agit d'une période où il y a de grands changements dans le développement neurologique de l'enfant, notamment pour les systèmes contrôlant l'homéostasie (Fleming *et al.*, 2015).

- les facteurs de risques intrinsèques :
    - enfant de sexe masculin : on constate une incidence des cas de MSN plus importante chez les garçons par rapport aux filles, avec un rapport de 60/40 environ, sans pour l'instant en connaître la raison (Jørgensen *et al.*, 1979; Pongou, 2013)
    - enfant prématuré et/ou de faible poids de naissance pouvant s'expliquer par un développement immature du système autonome (Jonville-Béra *et al.*, 2001; Hakeem *et al.*, 2015).

    - polymorphisme génétique : il n'y a pas aujourd'hui de gènes identifiés et validés en tant que marqueur de MSN mais il n'est pas exclu qu'une mutation et/ou un polymorphisme génétique puissent augmenter les risques de MSN ou favoriser l'effet d'un des autres facteurs de risque. Plusieurs études ont déjà mis en avant l'implication des certaines mutations dans le décès d'enfants de moins d'un an, par exemple dans des cas de cardiopathies, de canalopathies, dans la régulation inflammatoire ou de certains neuromédiateurs (Narita *et al.*, 2001; Weese-Mayer *et al.*, 2003; Hunt, 2005; Ferrante *et al.*, 2016; Neubauer *et al.*, 2017).

    - exposition de la mère pendant la grossesse aux stupéfiants ou à la nicotine : la consommation de cigarette de la mère pendant la grossesse augmente le risque de MSN de 50 à 80% (Mitchell and Milerad, 2006; Fleming and Blair, 2007). L'exposition au tabac est considérée aujourd'hui comme le facteur extérieur modifiable le plus important dans la MSN (Fleming and Blair, 2007). Le tabagisme passif de la mère ou du nourrisson est également considéré comme un facteur de risque (Treyster and Gitterman, 2011). Le mécanisme n'est pas encore totalement élucidé, mais l'hypothèse prédominante est que la nicotine agirait sur les récepteurs nicotiniques centraux du fœtus et entraînerait une stimulation inappropriée de leur fonction respiratoire. Cela aurait pour impact par exemple de modifier l'index apnée/hypopnée (c'est-à-dire le nombre de périodes d'apnée ou d'hypopnée par heure de sommeil) (Sawnani *et al.*,

2004) et d'altérer le contrôle parasympathique du rythme cardiaque (Duncan *et al.*, 2009).

La littérature montre également que la consommation de cocaïne ou d'alcool pendant la grossesse augmente le risque de MSN (Kandall *et al.*, 1993; Strandberg-Larsen, 2014). Les enfants nés de mère ayant une histoire de consommation abusive de stupéfiants, peuvent présenter des altérations du rythme cardiaque (Kopel and Hill, 2013).

- Les risques extrinsèques :

  - position de couchage : la majorité des décès étiquetés MSN se déroulent durant le sommeil de l'enfant (Standfast *et al.*,1983). La position de couchage ventrale est considérée comme la position la plus à risque de MSN, augmentant jusqu'à 14 fois le risque de décès (Mitchell *et al.*, 2012). Le mécanisme incriminé serait le plus souvent une suffocation due à cette position sur le ventre, mais d'autres hypothèses ont été évoquées par exemple une ré-inhalation de dioxyde de carbone entraînant une hypercapnie, un débit sanguin cérébral compromis, une augmentation de la température corporelle ou une compression du diaphragme (Chong *et al.*, 2000; Horne *et al.*, 2001; Galland *et al.*, 2002). Le couchage en position latérale est également un facteur de risque, au moins par le fait que l'enfant peut facilement rouler sur le ventre durant le sommeil (Li *et al.*, 2003).

  - co-couchage : partager son lit avec un nourrisson augmenterait le risque de MSN de 12 à 50% (Blair *et al.*, 2006, 2014), par suffocation ou hyperthermie notamment (Cooper *et al.*, 1995).

  - surface de couchage inappropriée : un couchage trop mou est un facteur de risque de MSN. Cela favoriserait la suffocation, l'asphyxie et la hausse de la température corporelle de l'enfant (Hauck *et al.*, 2003; Combrinck and Byard, 2011).

- température élevée : l'hyperthermie joue un rôle majeur dans la survenue de la MSN, elle serait impliquée dans plus d'un tiers des cas (Kleemann *et al.*, 1996).

D'autres facteurs sont liés à la MSN, sans pour autant constituer à eux seuls des facteurs de risque. Ce sont leur association avec d'autres facteurs qui aurait un impact sur la survenue du décès de l'enfant. Par exemple :

- la situation géographique et le climat : on constate une grande variation de l'incidence des cas de MSN à travers le monde et cela serait lié au climat. En effet, le nombre de MSN est plus important dans les pays au climat plutôt froid, avec un pic d'incidence durant l'hiver (Beal and Porter, 1991; Ponsonby *et al.*, 1993). Il est également suggéré que cette hausse des cas de MSN durant les mois froids, pourrait être due à une incapacité immunitaire de l'enfant à se défendre contre les infections (Trachtenberg *et al.*, 2012).

- L'origine ethnique : l'ethnicité jouerait un rôle dans l'incidence des MSN. On observe, par exemple, un plus faible taux de MSN chez les enfants d'origine asiatique comparativement aux enfants afro-américains qui ont le taux le plus élevé (Grether *et al.*, 1990; Davies and Gantley, 1994).

- la gémellité : la relation entre gémellité et MSN est toujours débattue. Malgré quelques cas répertoriés, ceux-ci ont plutôt été attribués à des facteurs environnementaux qu'à la gémellité des enfants (Beal, 1989).

De nombreux facteurs de risque semblent donc être impliqués dans la MSN, et dans la majorité des cas plusieurs de ces facteurs sont associés au moment du décès. Ceci rend la prévention de la MSN très difficile, notamment à cause de tous les facteurs intrinsèques qui sont non modifiables.

Mécanismes impliqués dans la MSN

Si l'on considère la définition de la MSN, c'est-à-dire « un décès d'un enfant de moins d'un an sans étiologie identifiée », il est difficile d'y associer un mécanisme physiopathologique ou biologique responsable de cette situation dramatique. Néanmoins, de nombreuses études ont été menées dans ce domaine pour tenter d'expliquer la survenue de ce phénomène multifactoriel (Byard, 1991). Les hypothèses évoquées sur les mécanismes potentiellement impliqués dans la MSN sont nombreuses, et citées ci-dessous :

Mécanismes gastro-intestinaux

Le reflux gastrique a souvent été mis en cause dans la MSN, en considérant qu'il pouvait remonter et créer une obstruction des voies respiratoires supérieures (Leape *et al.*, 1977; Jolley *et al.*, 1991). Mais les signes de reflux ne sont pas systématiquement retrouvés et quand cela est le cas, le reflux serait souvent postérieur au décès (Knight, 1975; Byard and Moore, 1993).

Mécanismes métaboliques

Puisque que le métabolisme joue un rôle important dans l'homéostasie, il n'est pas étonnant de considérer qu'un trouble métabolique pourrait être impliqué dans la MSN (Tildon JT *et al.,*1983). Mais il est difficile d'incriminer un trouble métabolique particulier pouvant être responsable de cas de MSN à lui seul.

Mécanismes immunitaires

Le pic d'incidence des MSN durant les saisons froides, tend à faire penser que certains enfants ont une incapacité immunitaire à se défendre contre les agents infectieux présents pendant cette période (Trachtenberg *et al.*, 2012; Goldwater, 2017). Une stimulation excessive du système immunitaire (hypersensibilité/allergie

ou infection) pourrait également être à l'origine de certains cas de MSN (Forsyth *et al.*, 1989 ; Coombs *et al.*, 1983)

Mécanismes respiratoires

La défaillance respiratoire a longtemps été considérée comme le mécanisme majeur dans la MSN, d'autant plus que les décès surviennent le plus souvent lors du sommeil de l'enfant, qui augmente le risques d'apnée (Read, 1978; Guilleminault *et al.*, 1979). La MSN surviendrait après une répétition d'apnées et d'hypoxies durant le sommeil, due à des difficultés de l'enfant à reprendre sa respiration après une apnée (Sridhar *et al.*, 2003).

Mécanismes cardiovasculaires

Des troubles du rythme cardiaque sont souvent évoquées dans des cas de MSN, que ce soit un déséquilibre de la balance sympatho-vagale, une conduction cardiaque anormale, un allongement de l'intervalle QT ou des bradycardies sévères (Bharati *et al.*, 1985; Kelly *et al.*, 1991; Schwartz *et al.*, 1998; Livolsi *et al.*, 2010b). Bien que ces anomalies de la conduction cardiaque soient connues dans la MSN, il est très difficile de prouver l'origine cardiaque du décès car le plus souvent aucune anomalie cardiovasculaire n'est retrouvée à l'autopsie (Southall *et al.*, 1986). Seules les anomalies anatomiques cardiaques peuvent être observées, excluant alors le diagnostic de MSN. De plus, il est également difficile de déterminer quel type de dysfonctionnement, cardiaque ou respiratoire (mentionné ci-dessus), est réellement à l'origine du décès (Southall *et al.*, 1986).

Toutefois, grâce au développement des séquençages des exomes et des génomes, plusieurs études ont montré l'implication de mutations génétiques dans certains cas de MSN. En effet, ces techniques actuelles semblent permettre d'identifier des anomalies génétiques dans 15 à 35% des cas de MSN, telles que des cardiomyopathies, des canalopathies, des désordres métaboliques ou le syndrome du QT long (Ackerman *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2017; Courts and Madea, 2010; Hedley *et al.*, 2013; Motloch *et al.*, 2017; Neubauer *et al.*, 2017; Opdal and Rognum, 2011).

Mécanismes nerveux

Les dysfonctionnements du système nerveux associés à la MSN sont largement évoqués dans la littérature scientifique. Ces anomalies nerveuses sont souvent attribuées à un développement anormal ou à un retard de maturation. Elles joueraient un rôle supposé dans la MSN par leurs actions directes sur l'homéostasie, notamment sur le contrôle cardio-respiratoire ou sur la régulation du sommeil (Duncan and Byard, 2018).

Anomalies anatomiques du système nerveux

Une étude a mis en évidence une augmentation de la taille du cerveau dans les cas de MSN, qui pourrait être le reflet d'un développement anormal (Kadhim *et al.*, 2005). D'autres études ont permis d'observer d'autres anomalies anatomiques cérébrales, telles qu'une hypoplasie du noyau arqué de l'hypothalamus, une altération de la densité de cellules neuronales ou une surexpression de la protéine précurseur de la β-amyloïde cérébrale (Filiano and Kinney, 1992; O'Kusky and Norman, 1992; Jensen *et al.*, 2014).

Anomalies des neurotransmetteurs centraux

Les variations d'expression des neurotransmetteurs ou de leurs récepteurs sont souvent citées dans le domaine de la MSN (Machaalani and Waters, 2014).

De nombreux systèmes ont été explorés :

- les catécholamines, avec notamment une diminution de la synthèse de noradrénaline, altérant le contrôle central de la respiration (Denoroy *et al.*, 1987).
- les récepteurs à l'acide gamma-aminobutyrique de type A (GABA-A), avec une expression plus faible au niveau médullaire dans les cas de MSN (Broadbelt *et al.*, 2011).

- les neuropeptides, en particulier la substance P, qui joue un rôle dans la respiration et dont l'expression est augmentée au niveau médullaire dans des cas de MSN (Bergström *et al.*, 1984).
- les récepteurs nicotiniques $\alpha 7$ et $\beta 2$ à l'acétylcholine (Ach) dont l'expression est augmentée au niveau médullaire chez des enfants décédés de MSN et précédemment exposés à la cigarette, soit durant la grossesse soit après la naissance (Machaalani *et al.*, 2011).
- Le système sérotoninergique : de nombreux marqueurs de ce système ont été évoqués comme élément important dans la MSN, compte tenu du rôle central de cette voie dans le contrôle de tous les processus homéostatiques. Une diminution de l'expression des récepteurs à la sérotonine de type 1A a été observée dans des cas de MSN (Paterson *et al.*, 2006). Une baisse de la synthèse de la tryptophane hydroxylase de type 2, essentielle à la production de sérotonine, a également été démontrée dans certains cas de MSN (Duncan *et al.*, 2010).

Ainsi, de nombreuses anomalies nerveuses ont été constatées dans des cas de MSN, sans qu'aucune n'ait été observée chez tous les nourrissons d'une même étude. Cela confirme l'aspect multifactoriel de cette pathologie. De plus, toutes ces variations neurologiques ont été observées uniquement au niveau central (médullaire la plupart du temps), ce qui rend ces dosages très difficiles en clinique par exemple.

Notre équipe a pu mettre en évidence des anomalies du système cholinergique en périphérie (dans le cœur de cas de MSN), notamment une surexpression des récepteurs muscariniques de type M_2 (RM_2) et de l'acétylcholinestérase (AchE) (Livolsi *et al.*, 2010b). Ces études sont détaillées dans la partie « Études précédentes » de l'introduction.

Études cliniques en cours *(source : clinicaltrials.gov)*

D'après le site de recensement des études cliniques, clinicaltrials.gov, 17 études sont en cours ou se sont récemment terminées (résultats en cours de publication). La majorité de ces études se déroule aux États-Unis (11 études) et les autres sont réparties dans différents pays, dont Israël, le Canada et la France. Il s'agit essentiellement d'études épidémiologiques sur les applications des recommandations de couchage, la consommation de cigarettes ou sur l'allaitement.

Notre équipe a débuté une étude clinique, nommée « iALTE », principalement centrée sur les malaises sévères inexpliqués des enfants de moins d'un an, mais qui tente de démontrer une relation entre les anomalies du système cholinergique (surexpression des RM_2 et de l'AchE), les malaises sévères et la MSN (voir partie 2, « Anomalies muscariniques et malaises idiopathiques du nourrisson »).

SYSTEME NERVEUX AUTONOME, SYSTEME CHOLINERGIQUE ET RECEPTEURS MUSCARINIQUES

Système nerveux autonome

Le système nerveux autonome (SNA), ou système nerveux végétatif, exerce des fonctions de manière « automatique », indépendantes de la volonté ou de la conscience, contrairement au système somatique qui répond à une action dépendante de la volonté. Il comporte 2 parties appartenant au système nerveux central et périphérique et possède des composantes sensorielles (afférentes) et motrices (efférentes). La partie efférente du SNA est divisée en 2 systèmes, le système nerveux sympathique (SNS) et le système nerveux parasympathique (SNP). Le plus souvent, ils agissent sur les mêmes organes avec des effets fonctionnellement opposés et avec une organisation et des neurotransmetteurs différents (figure 6).

La voie motrice du SNA (SNS et SNP) s'organise à partir du système nerveux central où des neurones centraux envoient des signaux aux neurones moteurs périphériques, qui innervent les organes cibles, à savoir les muscles lisses, les muscles cardiaques et les glandes. Cette voie est constituée de 2 neurones : un premier neurone pré-ganglionnaire dont le corps cellulaire est localisé dans la moelle épinière thoracique et lombaire (SNS) ou dans le tronc cérébral et la moelle sacrée (SNP) ; et un neurone ganglionnaire, avec un corps cellulaire ganglionnaire (à l'extérieur du système nerveux) et un axone innervant l'organe cible.

Le SNA met en jeu 2 neurotransmetteurs différents, l'acétylcholine (Ach) au niveau de tous les neurones pré-ganglionnaires et les neurones ganglionnaires du SNP et la noradrénaline pour les neurones ganglionnaires sympathique.

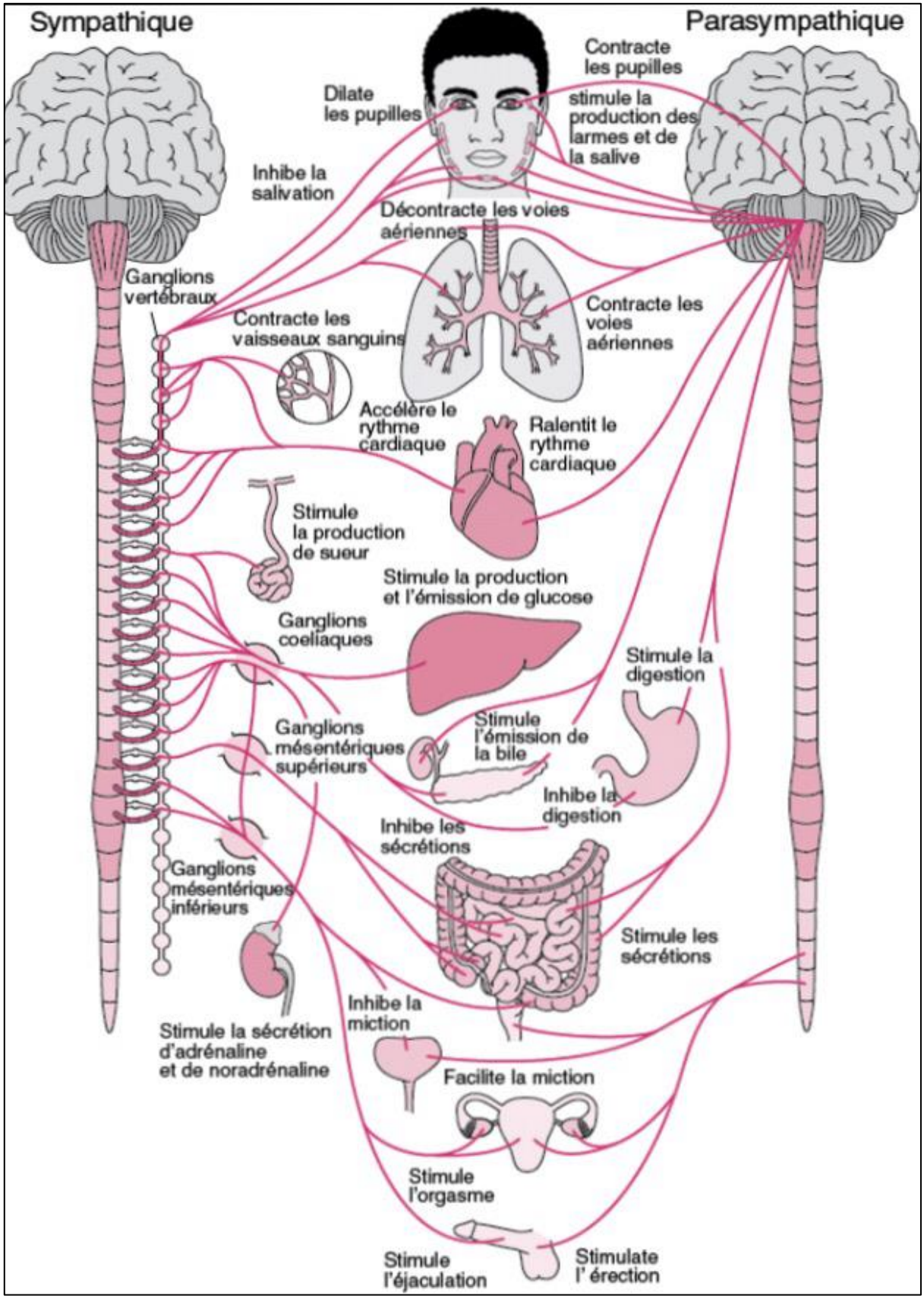


Figure 6. Système nerveux autonome (Carod-Artal, 2018)

Innervations et actions sur les organes par les systèmes sympathique et parasympathique

Le système cholinergique

Le système cholinergique est un réseau de neurotransmission complexe qui tire son nom du neurotransmetteur, l'acétylcholine (Ach), qui agit sur 2 types de récepteurs : les récepteurs nicotiniques et les récepteurs muscariniques.

L'acétylcholine

L'Ach est le neurotransmetteur de tous les neurones pré-ganglionnaires du SNA et des neurones ganglionnaires du SNP. Elle est synthétisée dans les terminaisons synaptiques à partir de la choline et de l'acétylcoenzyme A. Cette synthèse est catalysée par la choline acétyltransférase (ChAT), une enzyme cytoplasmique. L'Ach est ensuite stockée dans des vésicules synaptiques avant d'être libérée dans l'espace synaptique par la dépolarisation des terminaisons nerveuses présynaptiques (Warren *et al.* 2005). L'Ach peut agir sur des récepteurs post-synaptiques muscariniques (mAChR) ou nicotiniques (nAChR), provoquant un effet stimulateur ou inhibiteur. Au niveau cardiaque par exemple, l'Ach a un effet chronotrope, dromotrope et inotrope négatif en agissant sur les récepteurs muscariniques, (figure 7).

L'acétylcholinestérase

L'acétylcholinestérase (AchE) est l'enzyme (hydrolase) qui dégrade et inactive l'Ach dans l'espace synaptique, après son action sur le récepteur. Cette action est nécessaire pour permettre aux neurones de revenir à l'état de repos, après avoir été activés par l'influx nerveux (Massoulié *et al.*, 2008). La choline générée par cette dégradation est recaptée par les terminaisons présynaptiques pour une nouvelle synthèse d'Ach (Massoulié, Pezzementi, *et al.*, 1993 ; Warren *et al.*, 2005 ; Massoulié *et al.*, 2008).

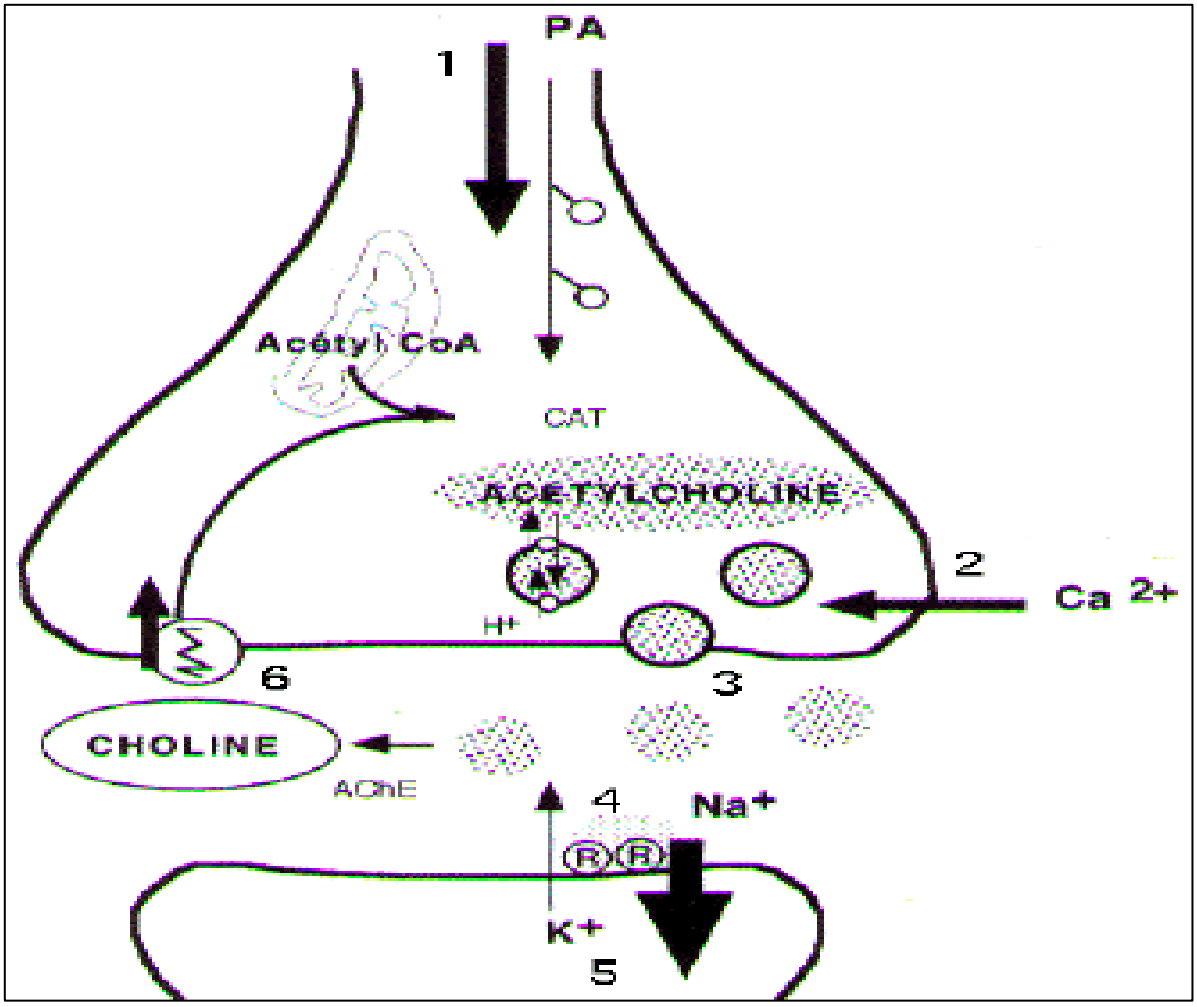


Figure 7. Synthèse et métabolisme de l'acétylcholine

1 = terminaison nerveuse présynaptique ; 2 = influx de calcium (Ca^{2+}), dépolarisation ; 3 = libération de l'acétylcholine ; 4 = récepteurs à l'acétylcholine ; 5 = terminaison post-synaptique ; 6 = transporteur de la choline ; CAT/ChAT = choline acétyltransférase.
(Lechat, 1982)

Les récepteurs muscariniques

Les récepteurs muscariniques sont stimulés par l'Ach, le neuromédiateur du système parasympathique. La classification des différents sous-types de récepteurs muscariniques a été effectuée selon des critères pharmacologiques et moléculaires. Il existe 5 différents sous-types de récepteurs muscariniques clonés et identifiés pharmacologiquement (Kubo *et al.*, 1986 ; Peralta *et al.*, 1987 ; Bonner *et al.*, 1988 ; Buckley *et al.*, 1988). On utilise la nomenclature officielle suivante pour les 5 sous-types : M_1, M_2, M_3, M_4 et M_5 (Caulfield and Birdsall, 1998).

Les récepteurs muscariniques appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Ils sont formés de sept segments transmembranaires reliés par trois boucles cytoplasmiques et trois boucles extracellulaires (Wang *et al.*, 2001 ; Alexander *et al.*, 2009). Selon le sous-type, le couplage est différent :

- Les sous-types M_1, M_3 et M_5 sont couplés à $G_{q/11}$ et induisent la synthèse des phosphoinositides via l'activation de la phospholipase C. Il en résulte une augmentation du calcium intracellulaire qui entraîne, par exemple, la contraction des muscles lisses, la sécrétion d'histamine ou de salive ou l'augmentation du potentiel d'action au niveau central.

- Les sous-types M_2 et M_4 sont couplés à Gi : leur activation inactive l'adénylate cyclase et diminue la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Cela entraîne par exemple une diminution de la fréquence cardiaque, une diminution de la force de contraction myocardique ou une diminution du potentiel d'action au niveau central.

Localisation des récepteurs muscariniques

La figure 8 résume la localisation des différents sous-types des récepteurs muscariniques. On constate que dans le système nerveux central, les cinq sous-types de récepteurs muscariniques ont été mis en évidence. Par contre, dans les tissus périphériques, la répartition des sous-types est différente selon les organes. De plus, nous n'avons pas identifié de sous-type M_5 dans ces tissus périphériques.

Dans le cœur humain par exemple, la forme prédominante est le sous-type M_2. Sa stimulation par l'Ach est responsable d'effets chronotropes et inotropes négatifs (Wang *et al.*, 2001 ; Alexander *et al.*, 2009).

Receptor:	m1 mRNA	m1 Ab	m2 mRNA	m2 Ab	m3 mRNA	m3 Ab	m4 mRNA	m4 Ab	m5 mRNA	m5 Ab
Brain										
Cerebral cortex	XX	XX		X	XX	X	X	X		
Olfactory bulb	XX		XX		X		XX			
Olfactory tubercle	XX	X		X	XX	X	XX	X		
Basal forebrain/septum			XX†	XX	X					
Hippocampus	XX	XX	X	X	XX	X	XX	X	X	X
Dentate gyrus	XX	XX	X		X					
Thalamus		X	X	XX	XX	X	X	X	X	
Habenula			X		X				X	
Striatum	X	XX	X†	X	X	X	XX	XX		X
Substantia nigra									XX	
Amygdala	XX								X	
Pons			XX†	XX	X	X				X
Hypothalamus				XX					X	
Cerebellum	X		X	XX	X	X	X			X
Peripheral tissues										
Exocrine glands	XX	X			XX	XX				
Heart			XX	XX						
Vascular endothelial cells	X		X		X					
Lung				XX	X	XX	XX	XX		
Ileum			XX	X	XX	XX				
Uterus				XX			X			
Vas deferens		XX						X		
Sympathetic ganglion‡	X	X	X	XX	X		X	X		

*Immunoreactivity to m3 receptor antibody detected by Wall *et al.* (1991), not by Levey *et al.* (1991).
†mRNA partially co-localized with immunoreactivity to choline acetyltransferase (Vilarò *et al.*, 1992).
‡Superior cervical ganglion (rabbit and rat).
In the antibody columns (Ab) X or XX refers to 10–49%, or 50–100% (respectively) immunoprecipitation of ^{3}H-QNB labelled solubilized receptors from the indicated tissues.
Data from: Buckley *et al.* (1988); Hulme *et al.* (1990); Vilarò *et al.* (1990, 1991, 1992b); Dörje *et al.* (1991a); Levey *et al.* (1991); Li *et al.* (1991); Wall *et al.* (1991); Fakamauchi *et al.* (1991); Tracey and Peach (1992); Yasuda *et al.* (1993).

Figure 8. Localisation des récepteurs muscariniques selon les sous-types

(Caulfield, 1993)
Expression de leur ARNm mesurée par immunoréactivité

Récepteurs muscariniques et cellules immunitaires mononuclées

Système cholinergique lymphocytaire

L'Ach présente dans le plasma de plusieurs espèces est d'origine lymphocytaire, à raison d'environ 60% (Kawashima *et al.*, 1998). Les lymphocytes possèdent l'ensemble du système de signalisation cholinergique, incluant la choline acétyltransférase (ChAT) catalysant la synthèse d'Ach à partir de choline et d'acétyle CoA, un transporteur de haute affinité de l'Ach (CHT1), l'AchE ainsi que les récepteurs muscariniques. De ce fait, il est probable que l'Ach libérée par les lymphocytes puisse agir de façon autocrine et/ou paracrine (Kawashima and Fujii, 2003).

L'Ach est présente dans les lymphocytes humains périphériques T et B (Tayebati *et al.*, 2002 ; Neumann *et al.*, 2007) et dans les lignées cellulaires T (Fujii *et al.*, 1996 ; Kawashima *et al.*, 1998). Les lymphocytes T semblent produire plus d'Ach que les lymphocytes B, et les cellules CD4+ en produisent plus que les CD8+ (Rinner *et al.*, 1998 ; Fujii *et al.*, 1999).

La ChAT est exprimée dans les lymphocytes humains périphériques (Tayebati *et al.*, 2002) et dans les lignées cellulaires T (Fujii *et al.*, 1996, 1999 ; Kawashima *et al.*, 1998 ; Ogawa *et al.*, 2003). L'AchE a été détectée dans les lymphocytes périphériques humains T par activité enzymatique (Szelényi *et al.*, 1982) et plus récemment dans les lymphocytes T et B par immunohistochimie (Tayebati *et al.*, 2002), (figure 9).

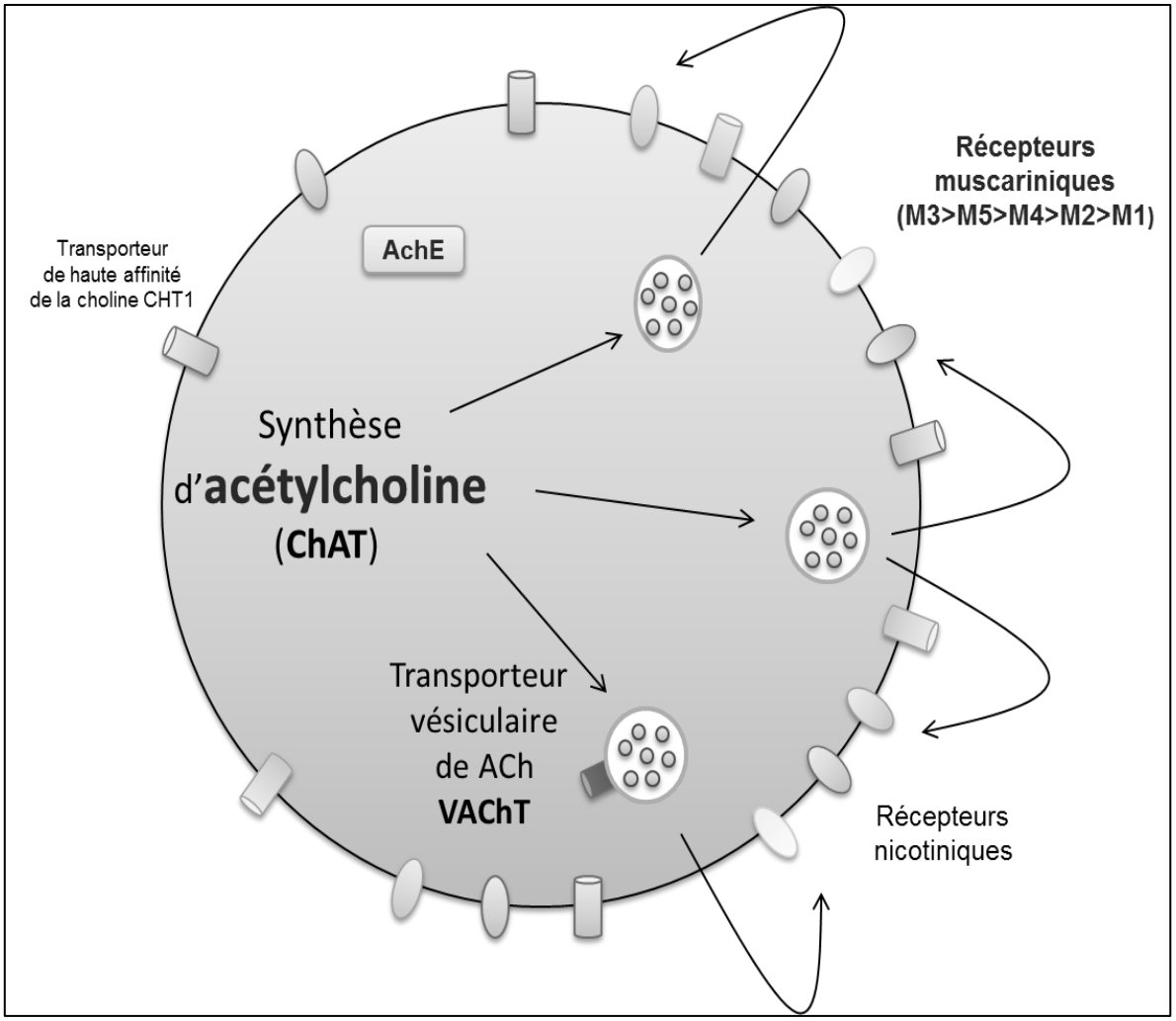


Figure 9. Système cholinergique lymphocytaire.

Réalisé à partir de Fujii et al., 1996, 1999; Kawashima et al., 1998; Ogawa et al., 2003.

Récepteurs muscariniques lymphocytaires

Les récepteurs muscariniques sont exprimés dans les lymphocytes T (Hellström-Lindahl and Nordberg, 1996; Tayebati *et al.*, 1999) et B (Tayebati *et al.*, 2002). Les lymphocytes expriment les récepteurs muscariniques M_2, M_3, M_4 et M_5 (Hellstrom-Lindahl and Nordberg, 1996; Tayebati *et al.*, 1999; Tayebati *et al.*, 2002) et probablement également M_1 (Zimring *et al.*, 2005). Les ARNm codant pour les récepteurs muscariniques ont été détectés dans la majorité des cellules immunitaires mononuclées, avec une variabilité interindividuelle (Sato *et al.*, 1999). L'expression relative des différents sous-types de récepteurs serait la suivante $M_3>M_5>M_4>M_2$ chez le sujet sain (Bany *et al.*, 1999; Tayebati *et al.*, 1999; Ricci *et al.*, 2002). L'expression lymphocytaire des différents sous-types des récepteurs muscariniques est donc différente de celle du cœur. De plus, il a été montré que la densité en récepteurs muscariniques augmentait avec l'âge (Rabey *et al.*, 1986; Eva *et al.*, 1989).

Les récepteurs muscariniques lymphocytaires semblent jouer un rôle modulateur de la réponse immunitaire. Il a été rapporté que l'Ach induisait la prolifération des cellules Jurkat (Fujino *et al.*, 2000) et des lymphocytes T humains (Nomura *et al.*, 2003), et ce, selon différents mécanismes moléculaires.

Un agoniste des récepteurs muscariniques stimule la synthèse d'interleukine-2 (IL-2) ainsi que de son récepteur, suggérant que l'Ach pourrait favoriser la prolifération des lymphocytes T de façon autocrine via les récepteurs muscariniques en potentialisant l'effet de l'IL-2 (Nomura *et al.*, 2003). Cet effet pourrait passer par le récepteur muscarinique M_1 (Okuma and Nomura, 2001). L'étude de souris « Knock-Out », où le gène du récepteur muscarinique M_1 est invalidé, montre une diminution de la capacité de différenciation des lymphocytes T en CD8+ cytotoxiques (Zimring *et al.*, 2005).

Par ailleurs, l'Ach ou un agoniste muscarinique non sélectif augmente rapidement la concentration intracellulaire de Ca^{2+} ainsi que l'expression du facteur de transcription nucléaire c-fos, favorisant l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaires. Des antagonistes M_1, M_2 et M_4 ne

bloquant pas ces effets, il a été suggéré que l'Ach agirait de façon autocrine/paracrine sur les récepteurs muscariniques M_3/M_5 des lymphocytes T et B en augmentant le Ca^{2+} intracellulaire et l'expression de c-fos (Fujii and Kawashima, 2000 ; Fujii *et al.*, 2003).

D'autre part, il a été montré dans les lymphocytes T humains, que la stimulation des récepteurs muscariniques M_1, M_3 et/ou M_5 induit la synthèse de monoxyde d'azote (NO) par l'oxyde nitrique synthase, en accord avec les augmentations de cytotoxicité et de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) observées après stimulation des récepteurs muscariniques dans ces cellules (Kamimura *et al.*, 2003). Le NO dans les lymphocytes T et B participerait également à la régulation de la prolifération, de la différenciation et de l'activité immunitaire (Bogdan, 2011).

L'expression lymphocytaire des récepteurs muscariniques varie en fonction de différentes situations. Une augmentation du récepteur muscarinique M_5 a été observée lors de réponses immunitaires aux phytohémagglutinines (lymphocytes T) ou à Staphylococcus aureus (lymphocytes B) (Fujii *et al.*, 2003). Un stress chronique par immobilisation augmente également la densité en récepteurs muscariniques lymphocytaires chez le rat (Kubera *et al.*, 1992). La densité de récepteurs muscariniques augmente avec l'âge dans les lymphocytes T (Eva *et al.*, 1989) mais diminue dans la maladie d'Alzheimer (Ferrero *et al.*, 1991). Par ailleurs, il a été observé une augmentation de l'expression des récepteurs M_2, et dans une moindre mesure des M_5, dans les lymphocytes périphériques de patients asthmatiques (Ricci *et al.*, 2002) et de patients atteints de rhinite allergique (Ricci *et al.*, 2008) par rapport à des sujets sains, sans changement des récepteurs muscariniques M_4.

Récepteurs muscariniques dans les monocytes

Les récepteurs muscariniques ne semblent pas être présents dans les monocytes. Dans les monocytes, il n'a pas été possible d'amplifier d'ARNm codant pour les 5 sous-types de récepteurs muscariniques (Hellstrom-Lindahl and Nordberg, 1996). De plus, le radioligand muscarinique [3H]N-méthyl-scopolamine ne se lie pas

aux monocytes (Eva *et al.*, 1989) et, quand ils sont stimulés, les monocytes sont insensibles à l'action d'un antagoniste muscarinique, l'atropine (Whaley *et al.*, 1981).

Système vagal et cœur

Contrôle de l'activité cardiaque

Le cœur est innervé par les nerfs sympathiques et parasympathiques. Les fibres parasympathiques se terminent au niveau du nœud sinusal et dans une moindre mesure, au niveau du nœud auriculo-ventriculaire et du myocarde auriculaire. En revanche, ces fibres n'atteignent guère le myocarde ventriculaire qui en est presque totalement dépourvu. Les fibres sympathiques innervent les mêmes régions, mais également la partie ventriculaire, via l'action de la noradrénaline. A l'état normal, le SNP exerce une action modératrice continue sur l'activité cardiaque. On parle de tonus cardio-modérateur ou tonus vagal. La stimulation des fibres parasympathiques entraîne un ralentissement de la fréquence cardiaque par libération d'Ach à leurs terminaisons.

L'Ach a 2 effets principaux sur le cœur : elle diminue la fréquence des potentiels d'action dans le nœud sinusal et elle diminue l'excitabilité des fibres de la jonction auriculo-ventriculaire, ralentissant le passage de l'influx vers les ventricules. Une stimulation très forte du nerf vague peut interrompre complètement mais pas définitivement la contraction rythmique du cœur. Ce phénomène porte le nom « d'échappement cardiaque ».

Les effets de la stimulation sympathique sont globalement opposés à ceux de la stimulation vagale, on parle de tonus cardio-accélérateur. D'une part, la fréquence de décharges du nœud sinusal est accrue ; d'autre part, la vitesse de conduction et l'excitabilité de toutes les régions du myocarde sont augmentées. Le tonus cardio-modérateur vagal l'emporte nettement sur le tonus cardio-accélérateur sympathique.

Physiopathologie de l'hyperréactivité vagale

En cas d'hyperréactivité vagale, une bradycardie survient brutalement, à l'origine d'une asystolie transitoire pouvant entraîner une syncope liée à l'hypoxie cérébrale. Pour l'expliquer, l'une des hypothèses souvent mentionnées dans la littérature est le réflexe de Bezold-Jarisch (Mark, 1983), (figure 10).

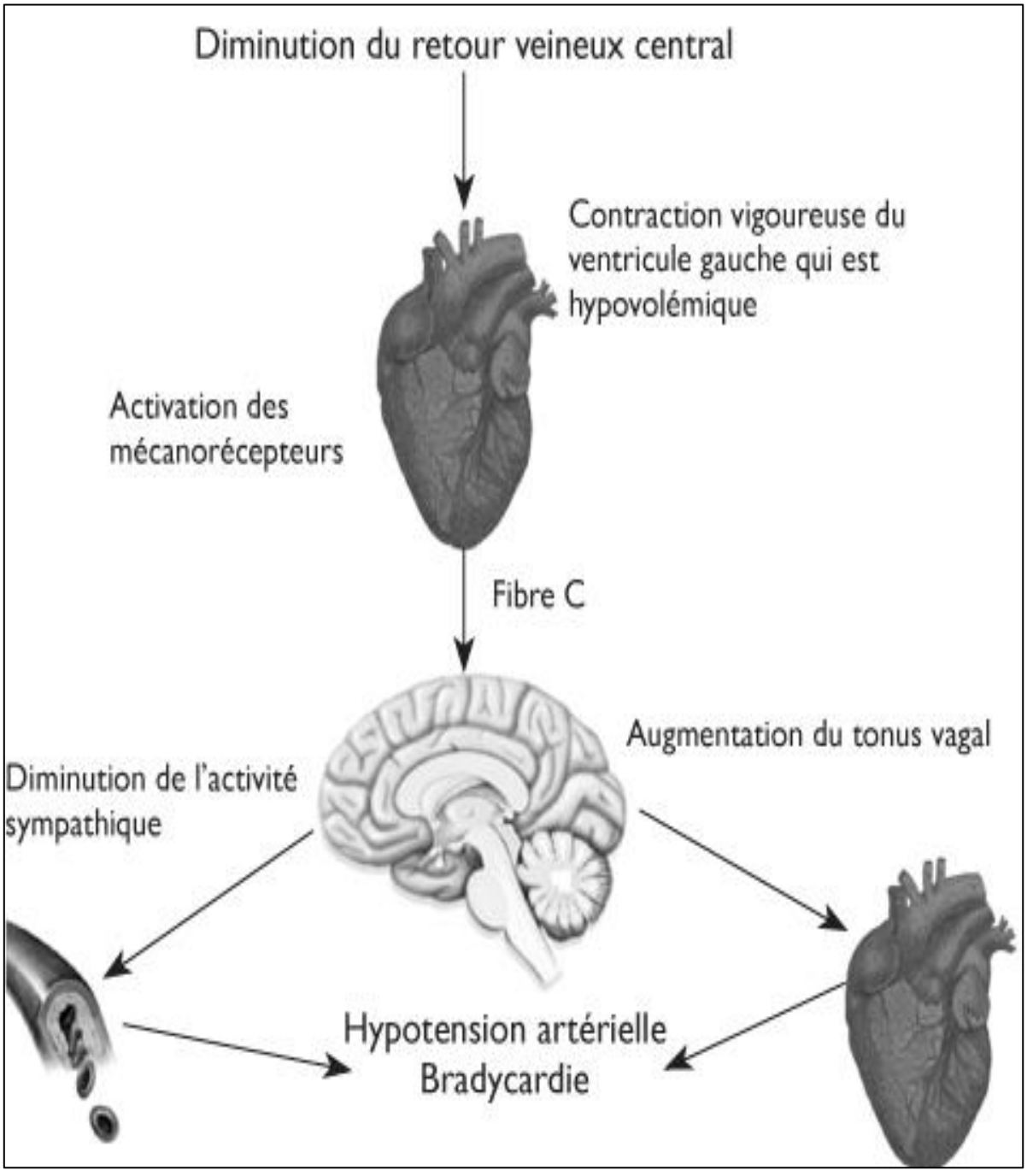


Figure 10. Réflexe de Bezold-Jarish

(Mark, 1983).

Des stimuli variés sont responsables de cette bradycardie réflexe. Différentes circonstances peuvent être à l'origine de ralentissements de la fréquence cardiaque chez le sujet ayant une hyperréactivité vagale (Grimm, 1997) :

- La stimulation œsophagienne peut induire un réflexe vasovagal responsable de bradyarythmies. Cette stimulation peut apparaître dans différentes situations : déglutition, reflux gastro-œsophagien, passage d'une sonde à gavage, spasme œsophagien. Le reflux gastro-œsophagien constitue une des principales causes de malaises vagaux du nourrisson. La dilatation et l'irruption du contenu acide au niveau du bas de l'œsophage stimuleraient les récepteurs vagaux et provoqueraient par voie réflexe des troubles du rythme cardiaque.

- Le réflexe oculo-cardiaque (ROC) : la compression des globes oculaires, par la mise en jeu du ROC s'accompagne d'un ralentissement du rythme cardiaque. L'étude de la réponse cardiaque à la compression oculaire est considérée comme une des explorations permettant de mettre en évidence une hyperréactivité vagale chez l'enfant.

- La stimulation de la région trigéminée et du nasopharynx : différents réflexes vagaux ayant comme point commun la stimulation de la région trigéminée ont été décrits, en particulier le réflexe de plongée. Il provoque une apnée, une bradycardie, une vasoconstriction périphérique, une diminution du débit cardiaque et une augmentation de la pression artérielle. La stimulation nasopharyngée par les liquides peut également provoquer une bradycardie réflexe analogue à celle obtenue par le réflexe de plongée qui peut être provoqué par l'application d'un stimulus mouillé et froid dans la région nasale. Une stimulation nasale lors d'un gavage (par passage d'une sonde) ou lors d'une aspiration peut également être à l'origine d'une bradycardie.

- Le réflexe de la peur : il provoque une diminution du tonus musculaire, une apnée et une bradycardie qui peut être abolie par l'administration de parasympatholytiques. La mise en jeu de ce réflexe serait favorisée par la douleur, un bruit soudain non familier, une situation de stress.

- Les spasmes du sanglot peuvent être à l'origine d'une bradycardie extrême avec arrêt cardiaque.

- Autres : des phénomènes physiologiques, tels que le hoquet, le bâillement, l'éternuement, le sursaut, peuvent provoquer une bradyarythmie réflexe. De même, les mictions, défécations, douleurs coliques, réactions au bain, l'hyperthermie, sont responsables de bradycardies.

TRAVAUX PRECEDENTS

L'ensemble des travaux que notre équipe a été réalisé dans le domaine de l'hyperactivité vagale et la MSN. Un résumé de ces recherches a été présenté au 5ème congrès européen annuel de sciences cliniques et translationnelles à Berlin en octobre 2017 (Poster 1).

2002 : Premier modèle animal d'hyperréactivité vagale (Livolsi et al., 2002)

Contexte

Au début des années 2000, l'équipe du Docteur Livolsi et du Professeur Bousquet a développé le premier modèle animal d'hyperréactivité vagale. Se basant sur l'observation d'histoires familiales de malaises vagaux, le but de la recherche était de définir un modèle animal de cette pathologie ainsi que de déterminer les transmissions génétiques associés à l'hyperréactivité vagale.

Méthodes

113 lapins âgés de 12 semaines ont été étudiés. Une vasoconstriction induite par une injection de 500µg/kg phényléphrine (PNE) provoque une réponse bradycardique, représentée par une augmentation de l'intervalle R-R sur l'électrocardiogramme (ECG), (figure 11). Cette réponse a été utilisée pour sélectionner les lapins hyperréactifs (lapins H). Ces lapins présentaient une augmentation de l'espace R-R supérieur à 4000ms, tandis que les lapins normaux (lapins N) présentaient une augmentation inférieure à 4000ms.

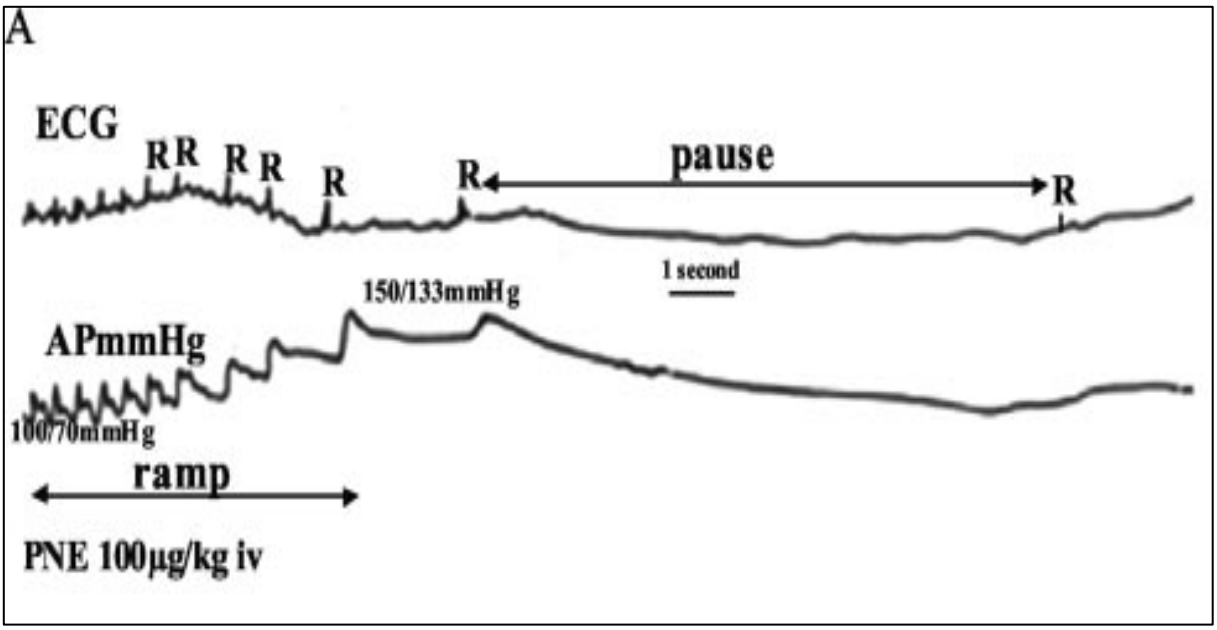


Figure 11. Exemple d'un enregistrement ECG d'un lapin hyperréactif et d'une mesure de la pression artérielle (APmmmHg) après injection IV de 100µg/kg de phényléphrine (PNE).

Des croisements ont été effectués entre les lapins selon 4 groupes :

- groupe 1 : lapin H et lapine H
- groupe 2 : lapin H et lapine N
- groupe 3 : lapin N et lapine H
- groupe 4 : lapin N et lapine N

Ainsi, 622 lapereaux ont été obtenus et leur réponse vagale (intervalle R-R) a été mesurée dans les mêmes conditions que chez leurs ascendants (à l'âge de 12 semaines).

Résultats

Des pauses cardiaques plus importantes ont été observées dans la lignée issue du croisement H x H, avec un intervalle R-R allant de 6000 à 20000ms. Le nombre de lapins H, c'est-à-dire présentant des pauses > 4000ms, était significativement plus important dans le groupe 1 par rapport au groupe 4, respectivement 40% et 9% en moyenne. De plus, chez les lapereaux issus des

groupes 1 et 2 (femelles H), le taux de mortalité était significativement supérieur par rapport aux 2 autres groupes.

Conclusion

Ce groupe 1 (H x H) est considéré comme le premier modèle d'hyperréactivité vagale et a pu être utilisé pour tester les hypothèses d'anomalie(s) biologique(s) possiblement impliquée(s) dans cette réaction exagérée.

De plus, ces résultats suggèrent également l'existence d'une transmission génétique de l'hyperréactivité vagale, ainsi que de sa potentielle implication dans la MSN du fait de la mortalité élevée des lapereaux dans les lignées de lapines H.

2010 : Mise en évidence d'anomalies biologiques du système cholinergique dans les cas d'hyperréactivité vagale *(Livolsi et al., 2010a)*

Contexte

Il y avait 3 hypothèses pouvant potentiellement expliquer l'hyperréactivité vagale d'un point de vue biologique :

- une augmentation de la libération d'Ach dans le SNP stimulant d'avantage les récepteurs muscariniques cardiaques et entraînant une bradycardie importante.
- une diminution de la production d'AchE, enzyme dégradant et inactivant l'Ach, entraînant une augmentation de la quantité d'Ach active et sa durée de vie dans les synapses.
- une augmentation de l'expression des récepteurs muscariniques, notamment des sous-types M_2 cardiaques, qui seront plus nombreux à être stimulés par l'Ach entraînant une augmentation de son activité.

La quantification de l'Ach est très difficile car elle est très vite dégradée. Les recherches d'anomalie(s) biologique(s) associée(s) à l'hyperréactivité vagale se sont donc d'abord portées sur l'expression des récepteurs muscariniques et de l'AchE.

Les expressions cardiaques et sanguines des récepteurs muscariniques et de l'AchE ont été analysées dans le modèle animal de lapins H, comparativement à des lapins normaux N.

Méthodes

Un enregistrement ECG a été effectué chez chaque lapin afin de mesurer l'augmentation de l'intervalle R-R après injection de 500μg/kg de PNE.

De plus, 3mL de sang frais ont été prélevés et l'ARN total a été extrait des globules blancs circulants pour l'analyse de l'expression des RM_2 et de l'AchE par « reverse transcription quantitative polymérase chain reaction ou RT-qPCR » en utilisant des amorces spécifiques pour lapins. Enfin, l'activité enzymatique de l'AchE a été mesurée dans les érythrocytes du sang collecté.

A la fin des expériences in vivo, les lapins ont été euthanasiés et leurs cœurs ont été récupérés pour effectuer les études de liaison spécifiques (« binding »). Ainsi, la densité des récepteurs muscariniques totaux cardiaques a été évaluée à l'aide de radioligands spécifiques.

Résultats

La réponse vagale à la PNE a été 5 fois plus importante pour les lapins H comparativement aux lapins N.

Dans le cœur des lapins H, la densité des récepteurs muscariniques totaux était significativement plus grande par rapport aux lapins N. De plus, cette densité de récepteurs muscariniques cardiaques était corrélée à la bradycardie réactionnelle : plus l'intervalle R-R augmentait, plus la densité de récepteurs était importante. Cette corrélation était la plus marquée avec les sous-types M_2 (figure 12). La réponse

vagale pourrait être la conséquence d'une surexpression des récepteurs muscariniques cardiaques, notamment le sous-type M_2.

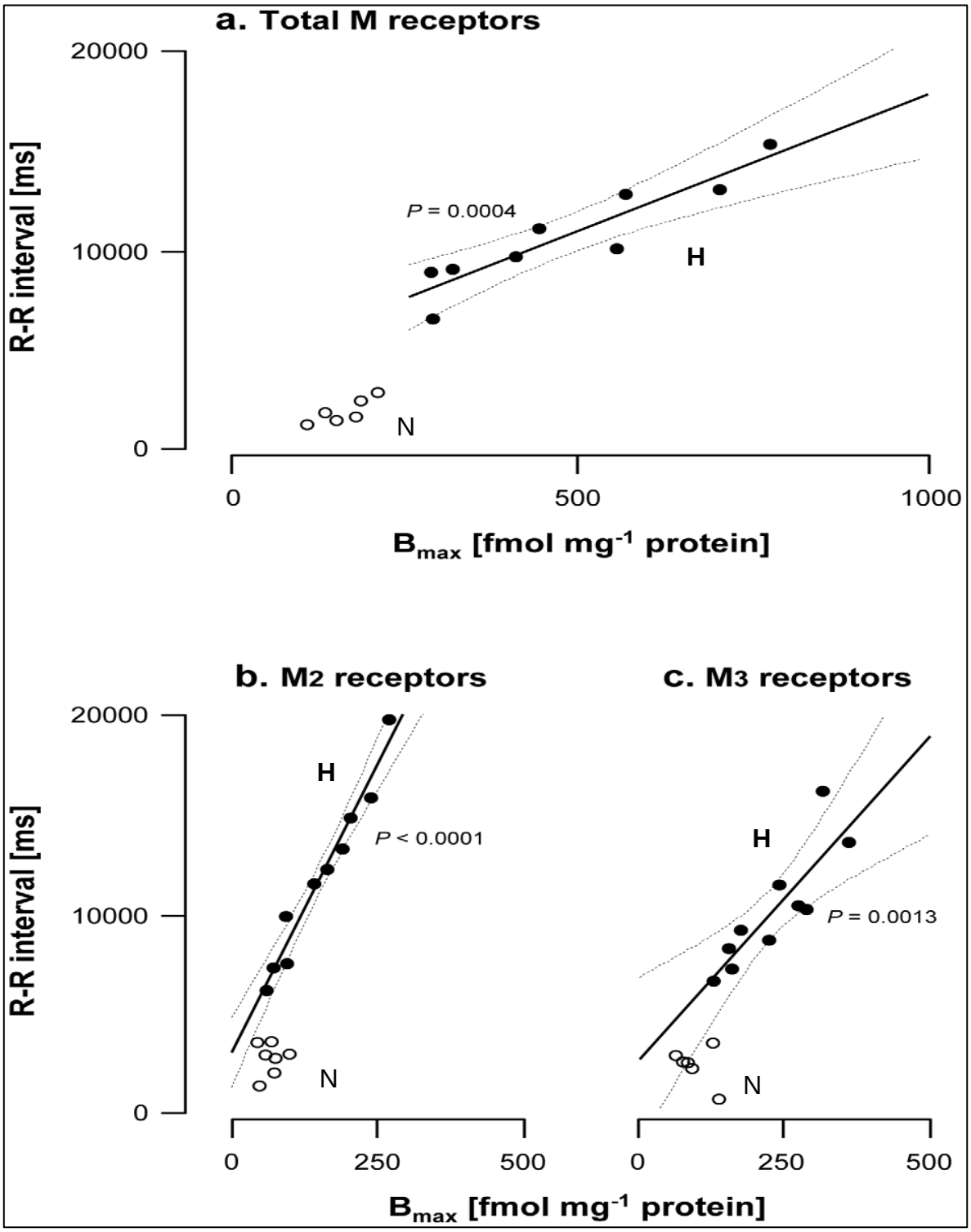


Figure 12. Densité des récepteurs muscariniques cardiaques en fonction de la bradycardie (intervalle R-R, ms)

a : récepteurs muscariniques totaux ; b :sous-types M_2 ; c : sous-types M_3 ; • : lapins hyperréactifs (H) ; o : lapins normaux (N).

Dans les globules blancs, l'expression des ARNm des RM_2 était 10 fois supérieure chez les lapins H par rapport aux lapins N (figure 13).

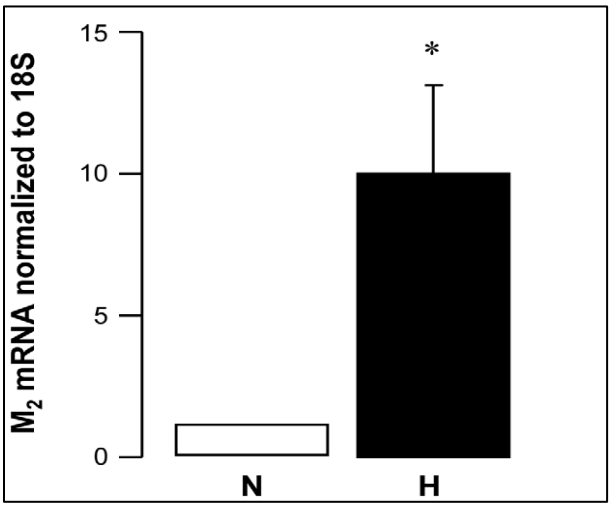


Figure 13. Expression des ARNm des RM_2 dans les globules blancs des lapins normaux (N) et des lapins hyperréactifs (H).

** : P < 0,05*

De même, une surexpression cardiaque de l'ARNm de l'AchE ainsi qu'une augmentation de son activité enzymatique érythrocytaire ont été observées chez les lapins H comparativement aux contrôles (figure 14). Ces anomalies infirment l'hypothèse initiale concernant l'AchE et ont été interprétées comme un mécanisme compensateur de la surexpression des récepteurs muscariniques.

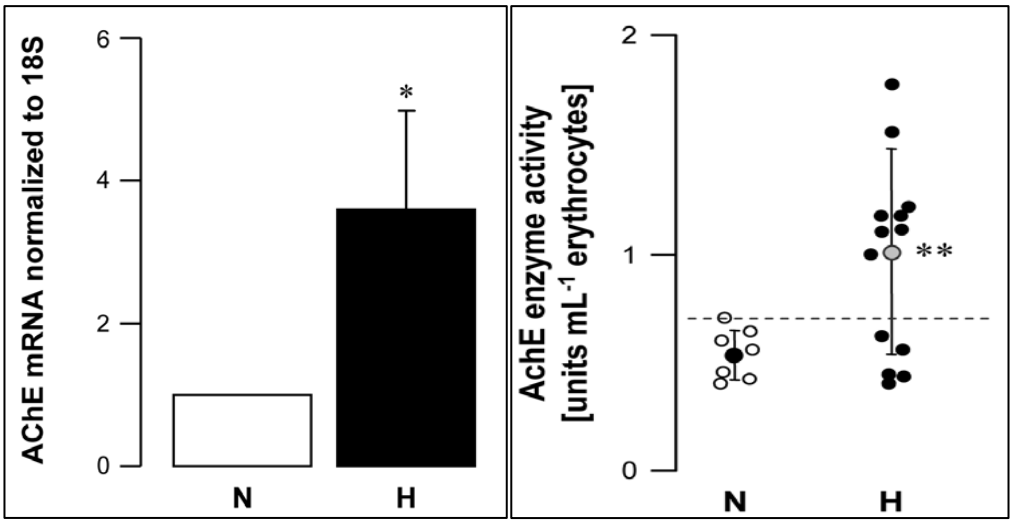


Figure 14. Expression cardiaque et activité enzymatique érythrocytaire de l'AchE chez les lapins normaux (N) et chez les lapins hyperréactifs (H).

** : P < 0,05 ; ** : P < 0,001*

Conclusion

Ces résultats suggèrent que la surexpression muscarinique pourrait jouer un rôle important dans le développement de l'hyperréactivité vagale, tandis que l'AchE agirait comme un mécanisme compensateur.

De plus, cette étude a pu mettre en évidence une corrélation entre l'augmentation de la densité cardiaque des récepteurs muscariniques (notamment des RM_2) et l'expression sanguine des ARNm de ces mêmes récepteurs. Cela a permis d'ouvrir la voie vers la recherche d'un possible marqueur de risque périphérique d'hyperréactivité vagale, qui pourrait être impliqué dans les malaises vagaux, les malaises sévères inexpliqués du jeune enfant et dans la MSN.

2010 : Mise en évidence d'anomalies muscariniques dans le myocarde d'enfants décédés de MSN *(Livolsi et al., 2010b)*

Contexte

Parallèlement aux travaux chez le lapin, l'implication de l'hyperréactivité vagale dans la MSN a également été explorée. L'implication d'une hyperréactivité vagale dans certains cas de MSN est l'hypothèse à l'origine de tous ces travaux.

Le but de cette étude était de rechercher des anomalies biologiques, déjà identifiées chez les lapins hyperréactifs, dans des tissus cardiaques de MSN. Ainsi, l'expression cardiaque des récepteurs muscariniques et l'activité enzymatique de l'AchE ont été étudiées dans des cas de MSN et comparées à un groupe contrôle.

Méthodes

18 cas de MSN et 19 nourrissons contrôles ont été inclus dans cette étude. Des lambeaux de ventricules gauches (9 MSN et 8 contrôles) et des prélèvements

sanguins (9 MSN et 11 contrôles) d'enfants décédés entre l'âge de 1 à 9 mois ont été obtenus. Les échantillons contrôles sont issus de nourrissons décédés d'autres causes que cardiaques, telles que des infections, des asphyxies ou des déshydratations. Les tissus cardiaques provenaient d'une banque de tissus nationale (Service d'Anatomie Pathologique et Médecine Légale, Hôpital Raymond Poincaré, Garches, France).

La densité des récepteurs muscariniques totaux cardiaques a été évaluée par des tests de liaisons spécifiques. L'activité enzymatique de l'AchE a été mesurée dans les érythrocytes du sang total collecté.

Résultats

La densité des récepteurs muscariniques totaux dans les cœurs d'enfants décédés de cas de MSN est 2 fois supérieure à celle dans les cœurs des nourrissons contrôles, (figure 15).

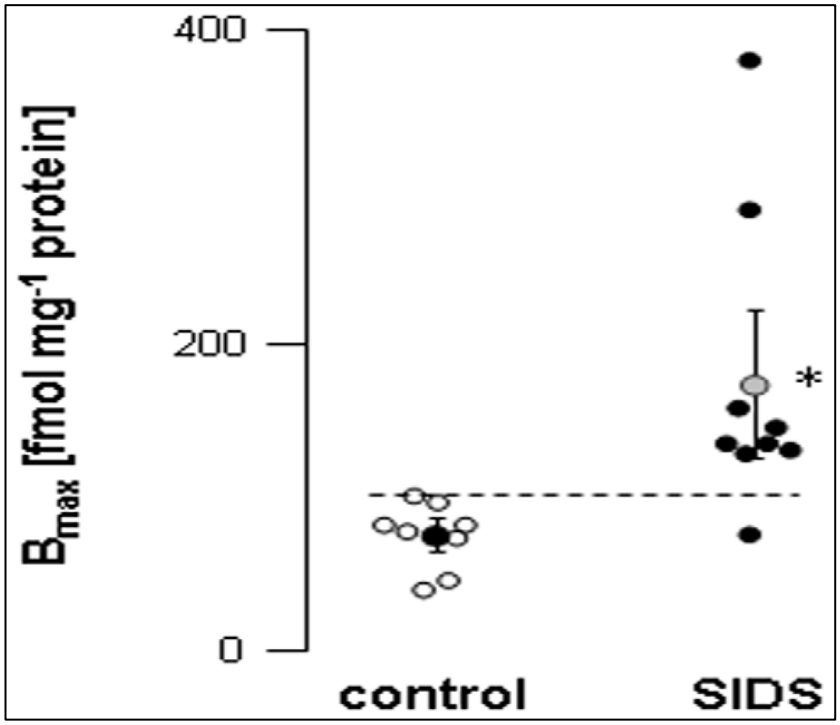


Figure 15. Densité des récepteurs muscariniques totaux dans le cœur des cas de MSN (SIDS) et de contrôles.

*Test de liaisons spécifiques ; * : P < 0,05*

L'activité enzymatique moyenne de l'AchE est significativement augmentée dans les cas de MSN par rapport aux contrôles, (figure 16).

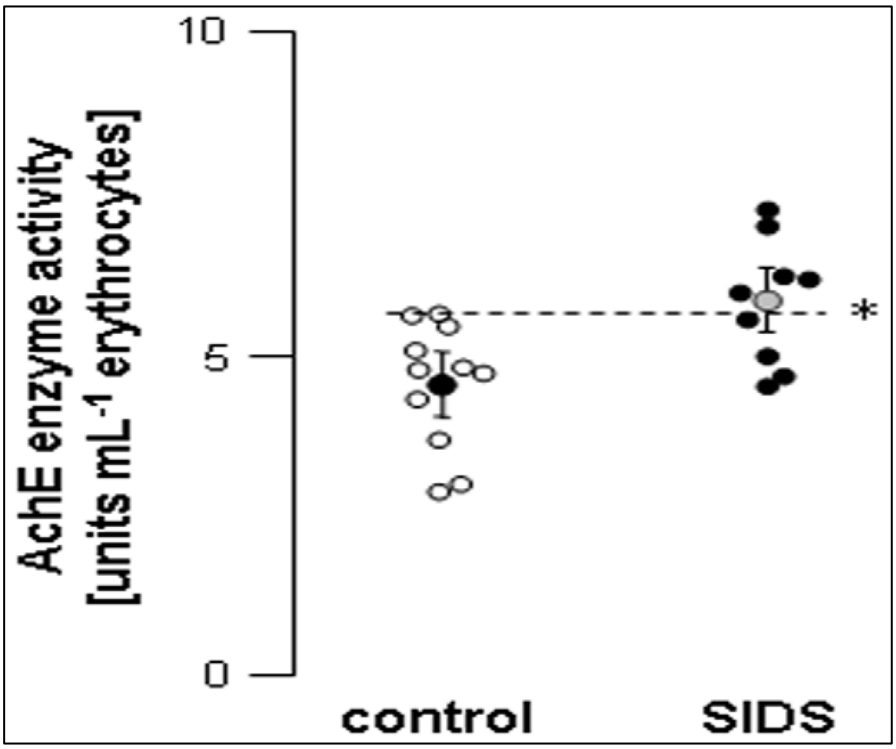


Figure 16. Activité enzymatique érythrocytaire de l'AchE dans les cas de MSN (SIDS) et chez les contrôles.

** : P < 0,05*

Conclusion

Comme chez le lapin H, une augmentation de la densité des récepteurs muscariniques cardiaques a été observée dans le cœur d'enfants décédés de MSN. Cette surexpression muscarinique était également associée à une augmentation compensatrice de l'activité de l'AchE.

Ces résultats suggèrent une relation entre l'hyperréactivité vagale, c'est-à-dire une surexpression des récepteurs muscariniques et une augmentation de l'activité de l'AchE, et la MSN. Si ces anomalies sont également présentes dans le sang humain, et notamment chez les enfants de moins d'un an à risque de MSN, elles pourraient ouvrir la voie à la validation d'un marqueur de risque d'hyperréactivité vagale et des maladies associées, telles que les malaises vagaux, les malaises sévères des jeunes enfants et la MSN.

POSTER 1

Expression of Circulating Muscarinic Receptors in Infants With Idiopathic Apparent Life-Threatening Events: *from rabbits to humans*

Les Hôpitaux Universitaires de STRASBOURG

Inserm
Institut national de la santé et de la recherche médicale

Maxime Beutelstetter, PharmD[1]; Hugues Greney, PhD[2] ; Pauline Helms, MD[3] ; Pascal Bousquet, MD ,PhD[2] ; Angelo Livolsi, MD[3].

[1]Clinical Investigation Center, INSERM 1434, University Hospital of Strasbourg, France ; [2]Laboratory of Neurobiology and Cardiovascular Pharmacology, Federation of Translational Medicine, EA 7296, University of Strasbourg, France ; [3]Unit of Cardiopediatrics, University Hospital of Strasbourg, France.

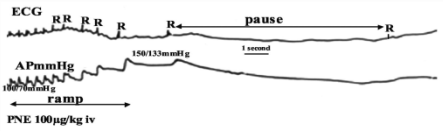
HYPOTHESIS

Is M_2 muscarinic receptor abnormality observed in rabbits with vagal hyperreactivity also found in blood of infants with idiopathic Apparent Life-Threatening Events (ALTEs) which can be complicated by Sudden Infant Death Syndrome (SIDS) ?

RATIONNAL

Development of the first animal model of vagal hyperreactivity

Livolsi A. et al. Circulation. 2002

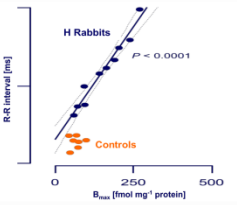


ECG tracing and arterial pressure recording (AP) after injection of phenylephrine (PNE)

Interval R-R = 1000-3800ms: control rabbits (C)
Interval R-R > 4000 ms : vagal hyperreactive rabbits (H)

Muscarinic abnormalities in vagal hyperreactive rabbits

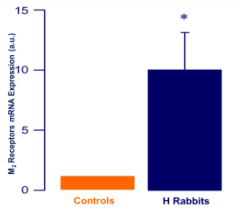
Livolsi A. et al. PLoS One. 2010



In heart of rabbits

Increase of M_2 receptor density in hearts of H rabbits compared to controls. Correlation between M_2 receptor density and heart rate (R-R interval)

Analyzed by binding method



In blood of rabbits

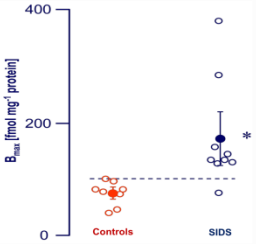
Overexpression of M_2 receptors in blood of H rabbits compared to controls.

Analyzed by RT-qPCR

** : P < 0.05*

Cardiac muscarinic receptor overexpression in SIDS

Livolsi A. et al. PLoS One. 2010



Overexpression of M_2 receptors in myocardial tissue of SIDS compared to controls (infants died of any another cause).

Analyzed by binding method

** : P < 0.05*

CONCLUSION

Significant overexpression of circulating M_2 receptors is observed in infants with severe idiopathic ALTEs. The present data, together with our previous findings, about cardiac muscarinic receptor overexpression in SIDS, suggest that parasympathetic overactivity may be the common vulnerability feature between SIDS and severe idiopathic ALTEs.

METHODS

Main characteristics of the study subject

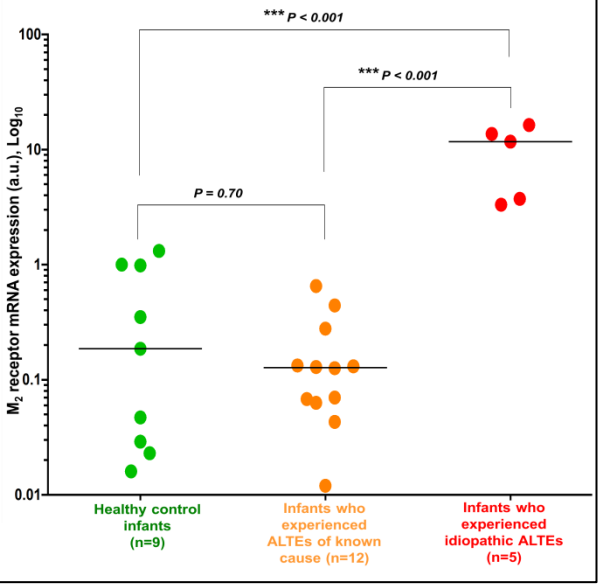
Characteristics *Mean (SD)*	Healthy controls (n=9)	ALTEs of known cause (n=12)	Idiopathic ALTEs (n=5)
Age, months	3.2 (1.2)	3.1 (1.1)	2.8 (1.4)
Male sex, No.	6	7	3
Birth weight, g	3192 (399)	2996 (468)	3542 (424)
Gestational age, wk	38 (0.5)	37 (1.8)	38 (0.4)

We prospectively enrolled 17 infants (age, <1 year) who had a first episode of severe ALTE. Blood samples for M_2 analysis were collected at admission, and the diagnostic workup started after admission. Cases with no specific diagnosis were classified as idiopathic. After the diagnostic procedure was performed, **5 idiopathic ALTEs** and **12 ALTEs of known etiology** were identified. A third group consisted of **9 healthy control infants** who had no family history of ALTE/SIDS.

Blood samples were collected in PaxGene® Blood RNA Tubes (QIAGEN/BD). Total RNA was extracted with the PAXgene® RNA kit (QIAGEN); 200ng of total RNA were reversely transcribed into complementary DNA using the iScript™ cDNA Synthesis kit (BIO-RAD). M_2 gene expression was measured by quantitative real-time polymerase chain reaction using a specific primer for the M_2 receptor gene. The ribosomal18S housekeeping gene was used for normalization, and M_2 levels are expressed as the M_2:18S ratio.

RESULTS

Muscarinic receptor (M2) expression in 3 groups of infants



OBJECTIFS DE LA THESE

ANOMALIES MUSCARINIQUES ET MALAISES VAGAUX DE L'ADULTE ET DE L'ENFANT

L'objectif principal de cette étude était de montrer que le niveau d'expression des RM_2 dans le sang est supérieur chez des patients, adultes et enfants, présentant des malaises vagaux par rapport à une population contrôle.

L'objectif secondaire était de montrer que l'expression de l'AchE était également augmentée dans le sang des patients présentant des malaises vagaux, en tant que mécanisme compensateur.

ANOMALIES MUSCARINIQUES ET MALAISES IDIOPATHIQUES DU NOURRISSON

Dans cette étude, nous avons analysé l'expression des ARNm circulants des RM_2 chez des enfants de moins d'un an présentant un ou des malaise(s) sévère(s) idiopathique(s). Le but était de montrer que chez ces enfants, nous retrouvions une surexpression muscarinique par rapport à des enfants contrôles

De plus, nous avons également analysé l'expression sanguine des ARNm de l'AchE chez ces mêmes enfants.

MSN FAMILIALE : SUREXPRESSION MUSCARINIQUE ET ANALYSE GENETIQUE

Le but de cette étude était de réaliser un séquençage haut débit de l'exome des plusieurs membres d'une famille, dans laquelle nous avons recensé plusieurs cas de MSN, afin d'identifier un ou des variant(s) potentiellement pathogènes(s) associé(s) à la MSN et/ou à l'hyperactivité vagale.

De plus, une analyse de l'expression sanguine des ARNm des RM_2 et de l'AchE est associée à ce séquençage de l'exome.

METHODES ANALYTIQUES

Dans toutes les études présentées ci-dessous, nous avons analysé l'expression sanguine des ARNm des RM_2 et de l'AchE dans différents groupes. La méthode d'analyse de ces paramètres biologiques du système cholinergique a été la même pour les 3 parties de cette thèse et elle sera donc uniquement détaillée dans cette partie « Méthodes analytiques ».

Tous les sujets, ou leurs représentants légaux, ont signé un consentement éclairé spécifique pour ces études après avoir été informés des modalités de ces recherches.

Matériel biologique

Les analyses de ces paramètres biologiques étudiés dans cette thèse ont été réalisées sur du sang total humain, de différents groupes (adultes, enfants et nourrissons). Les ARNm totaux ont été extraits de ces échantillons de sang afin d'évaluer leur expression dans les cellules mononuclées sanguines.

Prélèvement des échantillons

L'instabilité de l'ARNm cellulaire dans les prélèvements sanguins est un problème pour la réalisation de nombreux tests. En effet, l'ARNm se dégrade très rapidement après le prélèvement et des études ont montré que la quantité d'ARNm dans le sang pouvait varier énormément lors du stockage ou du transport de ce prélèvement sanguin (Rainen *et al.*, 2002; Langebrake *et al.*, 2007; Franken *et al.*, 2016). De telles variations rendent très difficile l'obtention de résultats fiables et reproductibles, surtout pour une utilisation dans des études cliniques, dans laquelle les dosages ne se font pas immédiatement après le prélèvement. Il était donc important d'utiliser du matériel adapté à nos études où les analyses ont été réalisées à la fin des inclusions.

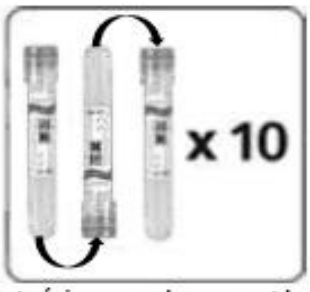
Les prélèvements sanguins spécifiques pour les analyses de l'expression des ARNm circulants des RM_2 et de l'AchE ont été effectués à l'aide de tubes PAXgene Blood RNA Tubes® (PreAnalytix®). Ces tubes PAXgene® contiennent un additif qui stabilise le profil de transcription des gènes in vivo en réduisant la dégradation de l'ARN in vitro et en minimisant l'induction des gènes qui peuvent entraîner une sous-estimation ou une surestimation du nombre de gènes transcrits *in vivo*.

Un recueil de sang de 2,5mL est nécessaire pour un prélèvement total (environ 10 secondes). Le fabricant préconise de réaliser une « purge » en prélevant un premier volume de sang sur tube EDTA. Ce prélèvement permet également une analyse de la numération formule sanguine (NFS). Une fois le volume de sang recueilli dans le tube PAXgene®, il est indispensable de retourner immédiatement le tube 8 à 10 fois doucement pour homogénéiser le prélèvement avec le solvant contenu dans le tube. Le tube PAXgene® est à conserver au moins 2 heures verticalement à température ambiante (18 à 25°C) avant d'être mis en congélation à -20°C (conservation de 24 mois maximum). Après un minimum de 24 heures à -20°C, les tubes peuvent être congelés à -80°C pour une conservation plus longue, si besoin. Les tubes sont ainsi conservés jusqu'à l'extraction. Les modalités de prélèvement sont résumées dans la figure 17, réalisée à partir des instructions du fabricant et utilisées dans notre étude « iALTE », présentée dans la partie 2 de cette thèse « Anomalies muscariniques et malaises idiopathiques du nourrisson ».

Les Hôpitaux Universitaires de STRASBOURG	AAPJC 2015 - HUS 6432 (iALTE) Investigateur coordinateur : Dr Charlie DE MELO INSTRUCTIONS PAXGENE®	Version 1.0 : 16/10/2017 p. 1 sur 1
Rédaction : Maxime Beutelstetter	Validation : Caroline Bouvrais	

Prélever le sang à l'aide du **tube PaxGene®** en utilisant les procédures de prélèvement sanguin standard

Attendre au moins **10 secondes** pour un prélèvement complet (**2,5mL**)



Une fois le prélèvement effectué, inverser doucement le tube PaxGene® **8 à 10 fois**.

Min. 2h, max. 72h verticalement
T° ambiante, à l'abri de la lumière

Congélation à **-20°C** verticalement dans portoir métallique* jusqu'à l'envoi au centre coordinateur

** Si congélation à -80°C, laisser le tube PaxGene® **au moins 24h à -20°C avant le passage à -80°C**. Conservation jusqu'à 24 mois à -20°C. Ne pas congeler dans un support en polystyrène car cela pourrait briser les tubes.*

Figure 17. Instructions de prélèvement et de stockage des tubes PAXgene®.

Document réalisé à partir des instructions du fabricant et utilisé dans l'étude clinique « iALTE ».

Lorsque ce tube PAXgene® est utilisé en combinaison avec le kit d'extraction PAXgene®-Qiagen®, celui-ci permet une extraction et une quantification précise des transcrits de gènes. Il est donc très important de respecter très précisément le protocole de prélèvement sanguin et de stockage avant l'extraction et la quantification.

Extraction des ARN circulants

Afin d'extraire l'ARN circulant, nous avons utilisé le kit d'extraction PAXgene Blood RNA® compatible avec le prélèvement sanguin sur tube PAXgene® et l'extracteur automatique QIAcube®. L'extraction de l'ARN est réalisée après une lyse des cellules dans la solution tampon contenu dans le tube PAXgene®, un lavage et une dissolution du culot, une dénaturation des protéines, une précipitation des acides nucléiques, une digestion de l'ADN et enfin par une élution de l'ARN.

Le kit d'extraction PAXgene Blood RNA® contient :

- un tampon de resuspension « BR1 »
- un tampon de fixation « BR2 »
- un tampon de lavage 1 « BR3 »
- un tampon de lavage 2 « BR4 »
- un tampon d'élution « BR5 »
- de l'eau sans RNase « RNFW »
- de la protéinase K « PK »
- des colonnes PAXgene RNA Spin « PRC »
- des colonnes PAXgene Shredder « PSC »
- des tubes de traitement « PT »
- des tubes de micro centrifugation « MCT »
- des bouchons secondaires
- de la DNase I « RNFD »

Avant l'extraction, il faut décongeler les tubes PAXgene® pendant au moins 2 heures à température ambiante, pour s'assurer de la lyse complète des cellules. Les tubes sont ensuite centrifugés entre 3000 et 5000g pendant 10min. Après avoir

éliminé le surnageant, le culot est remis en suspension avec 4mL d'eau RNFW et le tube est refermé à l'aide du bouchon secondaire fourni dans le kit. Après une deuxième centrifugation dans les mêmes conditions, le culot asséché est mis en suspension dans 350µL de solution tampon BR1 puis cette solution est transférée dans un tube de traitement PT annoté. Ces tubes sont placés dans l'agitateur de l'extracteur QIAcube® aux positions recommandées par le protocole QIAcube® en fonction du nombre d'échantillons (figure 18). En parallèle, les colonnes de séparations (PSC, PRC) et le tube de microcentrifugation (MCT) sont placés dans la centrifugeuse, comme indiqué ci-dessous.

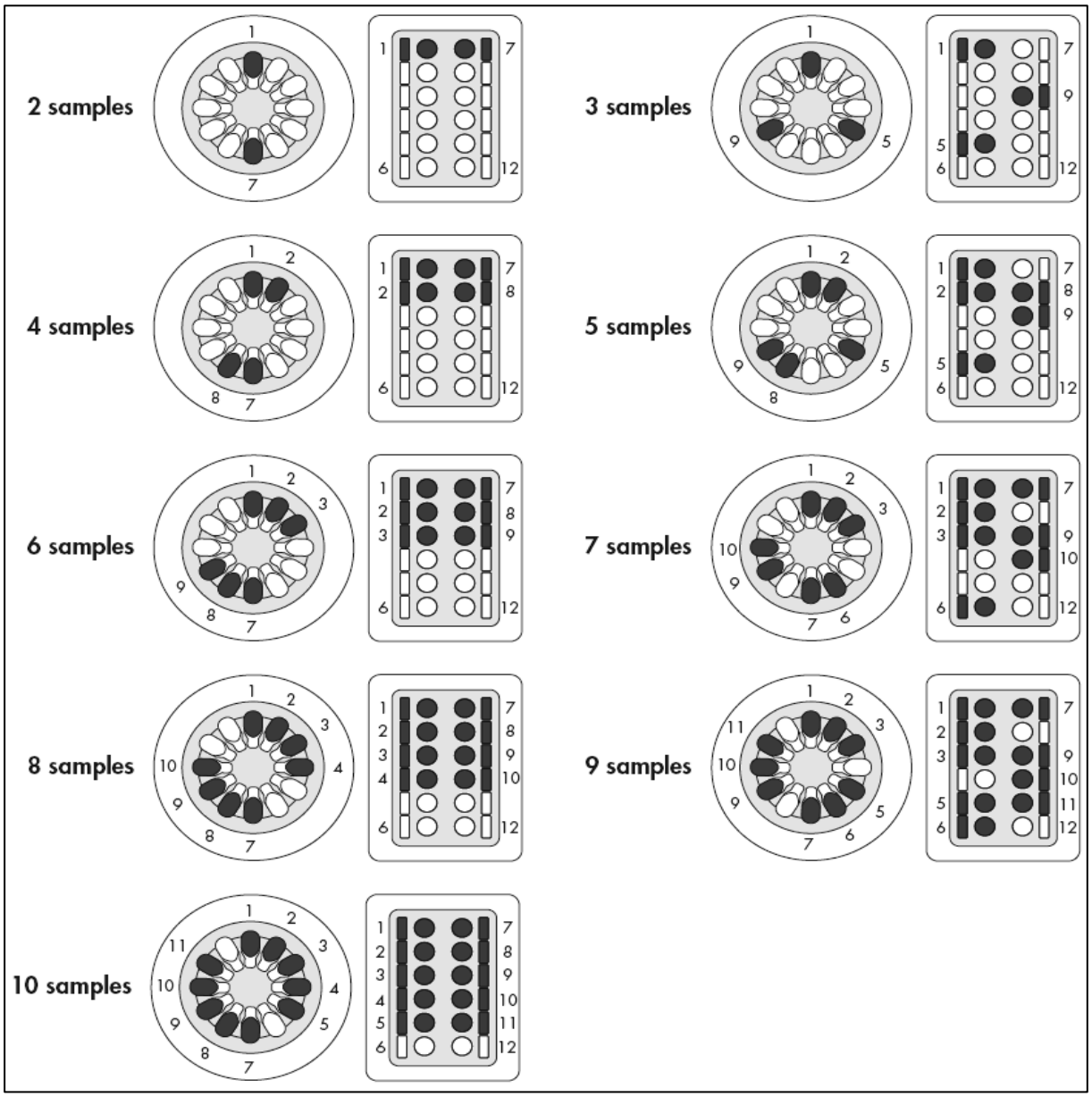


Figure 18. Positionnement des tubes PT et des colonnes de séparation en fonction du nombre d'échantillons (PAXgene Blood RNA® Kit Handbook, 2008).

Après avoir placé tous les éléments dans le QIAcube® (figure 19), les colonnes de séparation PSC et PRC, les différentes solutions tampons (BR2, BR3, BR4 et BR5), la PK, la DNAse I et les cônes de prélèvement, l'extraction automatique peut débuter en suivant les protocoles « PAXgene Blood RNA part A et B ». Une fois l'extraction terminée, nous récupérons les tubes MCT annotés contenant les ARN purifiés (environ 40µL). Ces tubes sont directement placés dans la glace avant le dosage de l'ARN au Nanodrop et la congélation à -80°C jusqu'à la suite de l'analyse (RT-qPCR).

Figure 19. Vue de l'intérieur du QIAcube®

(PAXgene Blood RNA® Kit Handbook, 2008)

1 : Couvercle de la centrifugeuse ; 2 : Centrifugeuse ; 3 : Agitateur ; 4 : Portoir pour les flacons de réactifs (BR2, BR3, BR4 et éthanol 100%) ; 5 : Capteur de cônes ; 6 : Espace pour les tubes de réactifs de microcentrifugation (BR5, DNase I et PK) ; 7 : portoirs pour les cônes ; 8 : Espace d'élimination pour les cônes et les colonnes ; 9 : Bras robotisé.

Les étapes de l'extraction automatisée sont résumées dans la figure 20.

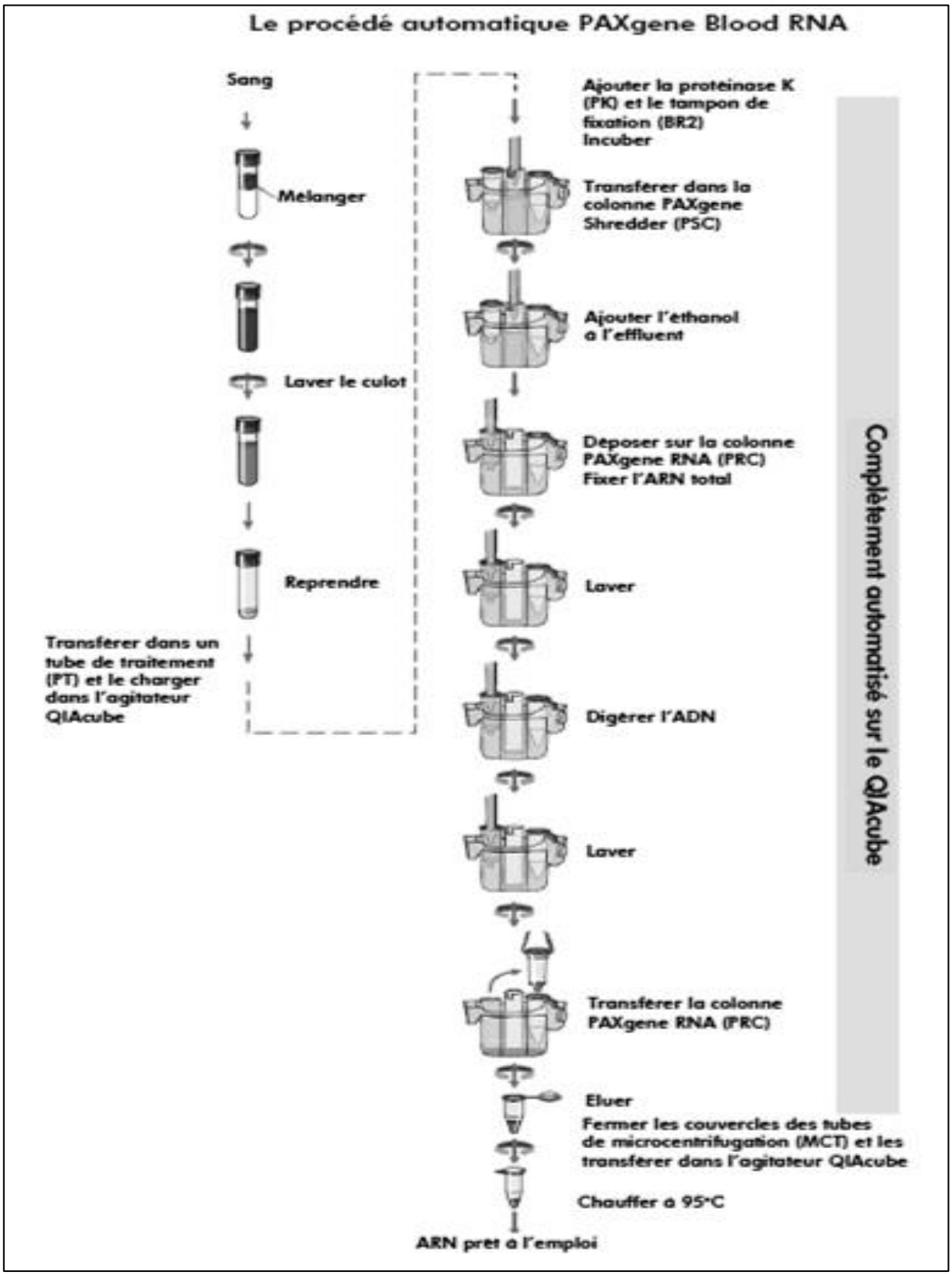


Figure 20. Étapes de l'extraction automatisée par le QIAcube

(PAXgene Blood RNA® Kit Handbook, 2008).

Dosage des ARN extraits

Après l'extraction des ARN totaux, leur concentration est mesurée à l'aide du Nanodrop 2000®. 1,8µL d'ARN purifiés de chaque échantillon est placé sur la cellule de lecture pour la mesure. Nous obtenons ainsi un dosage précis de l'ARN (en ng/µL) et l'analyse de la pureté, ratio d'absorption entre 280nm et 260nm (A280/260), et de la contamination, ratio d'absorption entre 280nm et 230nm (A280/230) (figure 21). La concentration d'ARN extraits est utilisée pour le calcul du volume nécessaire pour la réalisation de la prochaine étape (reverse transcriptase)

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230
1	2001	gsk	18/10/2016 15:23:33	112,4	ng/µl	2,810	1,353	2,08	0,64
2	2002	gsk	18/10/2016 15:24:19	101,9	ng/µl	2,547	1,226	2,08	0,67
3	2003	gsk	18/10/2016 15:24:46	65,1	ng/µl	1,628	0,780	2,09	0,52
4	2004	gsk	18/10/2016 15:25:15	99,8	ng/µl	2,495	1,190	2,10	0,59
5	2005	gsk	18/10/2016 15:25:41	134,1	ng/µl	3,352	1,650	2,03	0,76
6	1001	gsk	18/10/2016 15:26:15	64,3	ng/µl	1,608	0,733	2,19	0,40
7	1002	gsk	18/10/2016 15:26:39	147,1	ng/µl	3,678	1,833	2,01	0,93
8	1003	gsk	18/10/2016 15:27:03	90,3	ng/µl	2,258	1,067	2,12	0,28
9	1004	gsk	18/10/2016 15:27:32	139,6	ng/µl	3,490	1,703	2,05	0,87
10	1005	gsk	18/10/2016 15:27:56	193,2	ng/µl	4,830	2,347	2,06	0,90
11	2014	gsk	18/10/2016 15:28:24	51,6	ng/µl	1,290	0,575	2,24	0,37
12	2015	gsk	18/10/2016 15:28:52	43,3	ng/µl	1,083	0,466	2,32	0,29
13	2016	gsk	18/10/2016 15:29:20	27,0	ng/µl	0,675	0,272	2,48	0,17
14	2017	gsk	18/10/2016 15:29:45	23,5	ng/µl	0,587	0,235	2,50	0,19
15	2018	gsk	18/10/2016 15:30:09	128,6	ng/µl	3,216	1,485	2,17	0,68

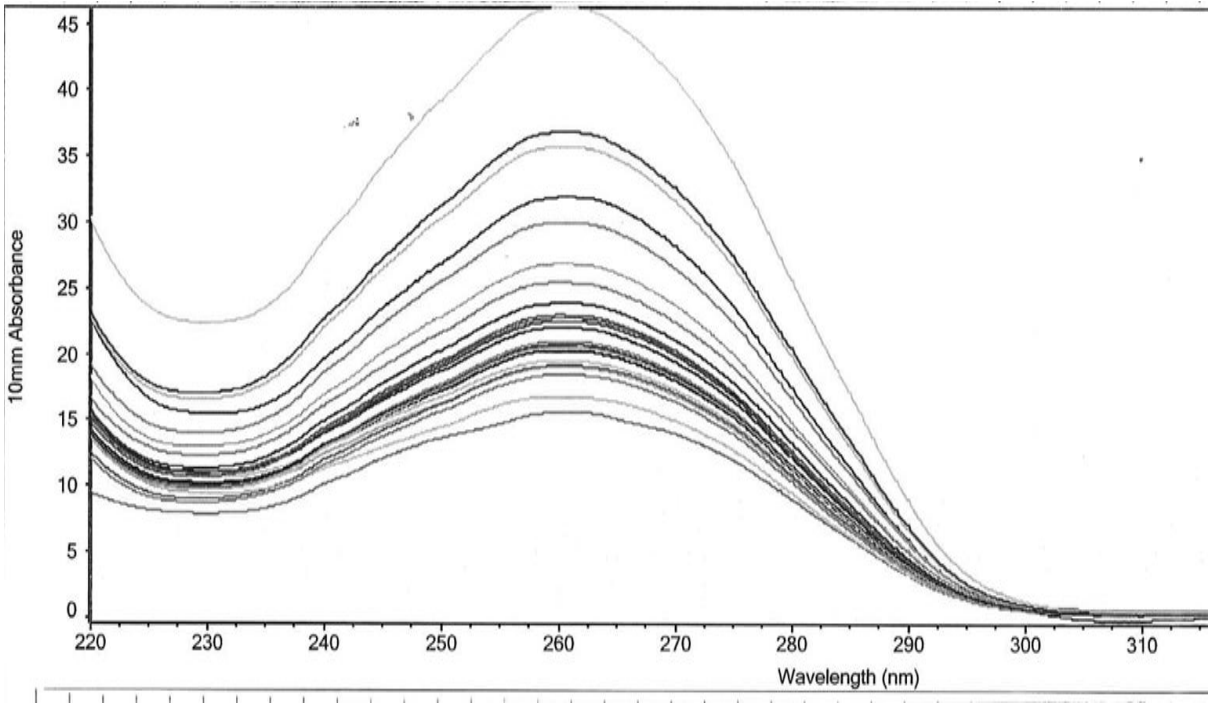


Figure 21. Exemple de dosages des ARN extraits par le Nanodrop 2000®.

Préparation des ADN complémentaires

La reverse transcriptase (RT) permet la synthèse d'ADN complémentaires (ADNc) à partir des ARN extraits. 200ng d'ARN de chaque sujet ont été utilisés pour la transcription en ADNc. Le volume (x µl) d'ARN à prélever de la chaque solution extraite est calculé en fonction de la concentration d'ARN mesurée au Nanodrop 2000. Pour effectuer cette transcription, nous utilisons un kit iScript cDNA Synthesis kit (Biorad®), contenant le 5x i-script et le i-script Reverse Transcriptase®. La préparation des tubes pour la RT est détaillée dans le tableau 1.

Réactifs	**Pour 1 tube**
5x i-script réaction mix®	4 µl
i-script Reverse Transcriptase®	1 µl
Eau "RNase free"	15 – x µl
ARN (200ng)	x µl

Tableau 1. Préparation de la reverse transcriptase.

Le mix (pour n+1 individu) de 5x i-script® et de i-script Réverse Transcriptase® doit être préparé au dernier moment. Ensuite, 5µL de ce mix sont ajoutés dans chaque tube contenant l'eau et l'ARN.

Les tubes sont ensuite placés en incubation selon le protocole suivant :

- 5min à 25°C
- 30min à 42°C
- 5min à 85°C

2 RT ont été effectuées pour chaque sujet et les ADNc ont été mélangés dans un seul tube puis stockés au congélateur -20°C jusqu'à la réalisation de la qPCR.

Conception des amorces

Les amorces utilisées pour la quantification PCR ont été conçues par SIGMA®. Voici les séquences des gènes envoyés pour la préparation des amorces :

- Gène ARN ribosomal 18S (gène de ménage):
  F: CCTGCGGCTTAATTTGACTC – R: ATGCCAGAGTCTCGTTCGTT)

- Gène CHRM2 (pour les RM_2) :
  F: AAGACCCCGTTTCTCCAAGT - R: GAGGCAACAGCACTGACTGA

- Gène ACHE (pour l'AchE) :
  F: TGGAACCCCAACCGTGAG - R: GTAGAAGCCACCCCCATAGA

Les amorces ont été fournies à une concentration mère ($C_{mère}$) de 50µM. Pour l'analyse, les amorces ont été utilisées à une concentration fille (C_{fille}) de 5µM. Ainsi, nous avons préparé des aliquots de 100µL d'amorce à la concentration de 5µM en mélangeant 10µL d'amorce sens (F) et 10µL d'amorce anti-sens (R) dans 80µL d'eau « PCR Grade ».

Quantification des ARNm par qPCR

La quantification des ARNm circulants est réalisée par qPCR sur LightCycler 480®. Nous avons utilisé une gamme d'échantillons constituée d'ADNc issus de 70 individus. 2µL d'ADNc de chaque sujet sont mélangés afin de constituer la solution mère D1 de la gamme à une « concentration relative » de 1. Nous avons ensuite dilué ce mélange D1 au $1/5^{ème}$ en cascade pour obtenir une gamme de concentration décroissantes D2 (0,2), D3 (0,04), D4 (0,008), D5 (0,0016) et D6 (0,00032). Cette gamme standard permet de donner les concentrations relatives des échantillons à doser à l'aide de la courbe standard (figure 22).

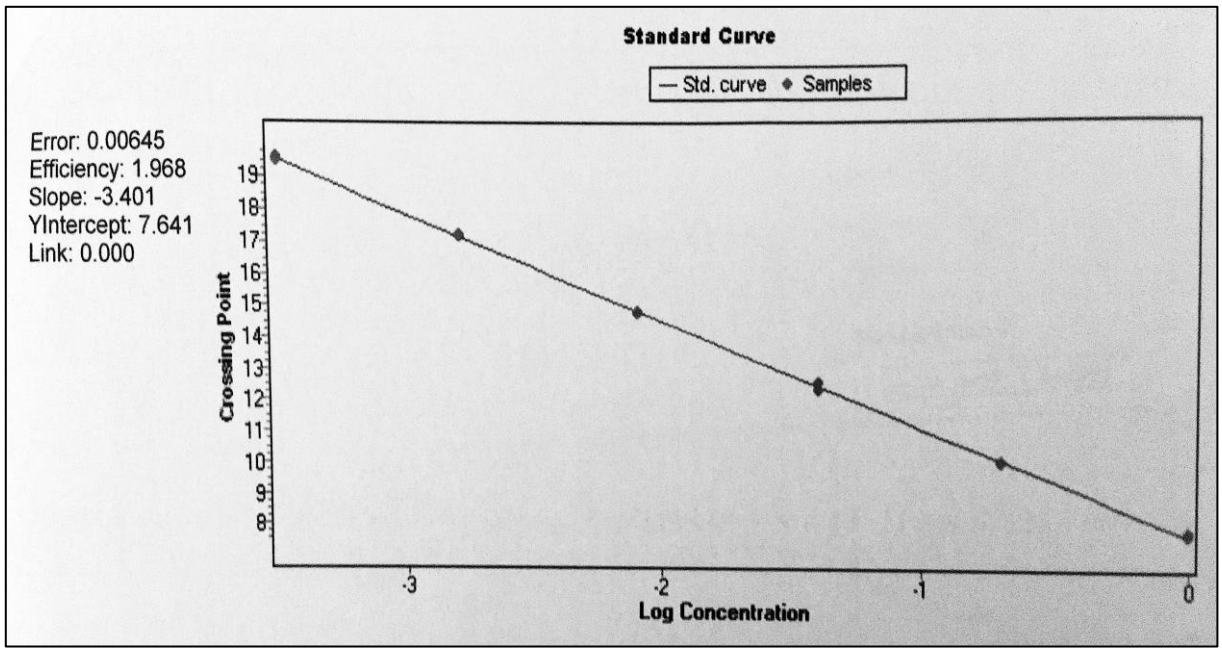


Figure 22. Exemple d'une courbe standard.

Chaque point correspond à un point de dosage de chaque dilution, de D1 (en bas à droite) à D6 (en haut à gauche) ; l'efficacité (efficiency) et la pente (slope) sont indiquées à gauche

La quantification est effectuée à l'aide d'un LightCycler® 480 utilisant des plaques 96 puits. Le SYBR Green mix 2x Roche® est utilisé comme agent fluorescent. Le protocole de préparation des puits est détaillé dans le tableau 2. Les ADNc transcrits ont été utilisés à une dilution au 1/4ème afin de les faire entrer dans la gamme de dilution.

Réactifs	Pour 1 puit
Eau PCR Grade	6 µl
Mix amorces F + R (5 µM)	2 µl
SYBR Green mix 2X	10 µl
ADNc (1/4)	2 µl

Tableau 2. Préparation des puits pour la quantification par PCR.

La plaque 96 puits est ensuite placée dans le LightCycler® 480 pour la quantification suivant le protocole suivant :

- Pré-incubation : 10 minutes à 95°C
- PCR 3 étapes :
    - Dénaturation : 15 secondes à 95°C
    - Hybridation : 10 secondes à 65°C
    - Extension : 20 secondes à 72°C

  ⇨ Nombre de cycles : 40 pour les 18S et 50 pour CHRM2 et ACHE
- Courbe de fusion : 15 secondes à 65°C
- Refroidissement : 30 secondes à 40°C

Les courbes d'amplification (figure 23) et les courbes de fusion (figure 24) obtenues sont analysées. La quantification des gènes cibles (CHRM2 et ACHE) s'effectue à l'aide de la gamme de dilutions (D1-D6) (figure 25). Les dosages de ces gènes cibles sont ensuite pondérés par l'expression du gène de ménage 18S, afin de s'abstenir des variations de la quantité totale d'ARN extrait des prélèvements (Livak and Schmittgen, 2001; Azarpeykan and Dittmer, 2016).

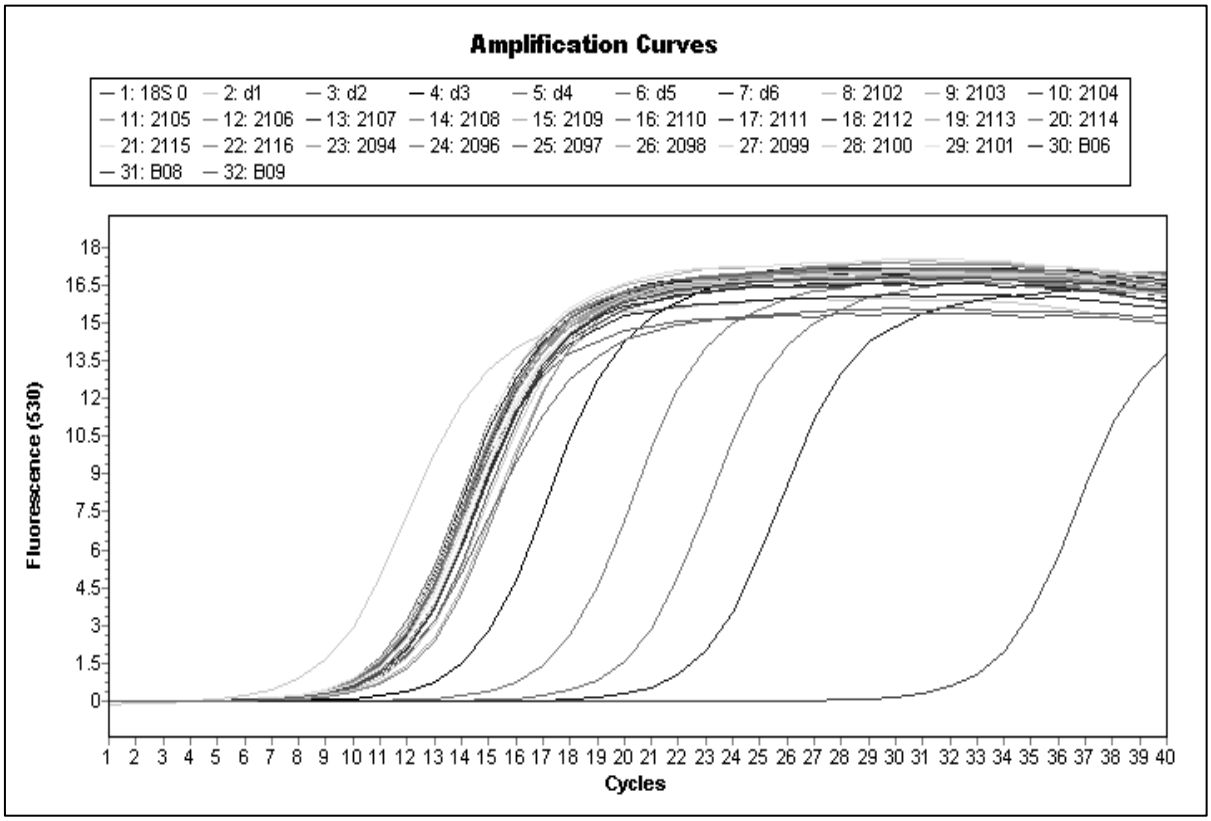


Figure 23. Exemple de courbes d'amplification (18S)

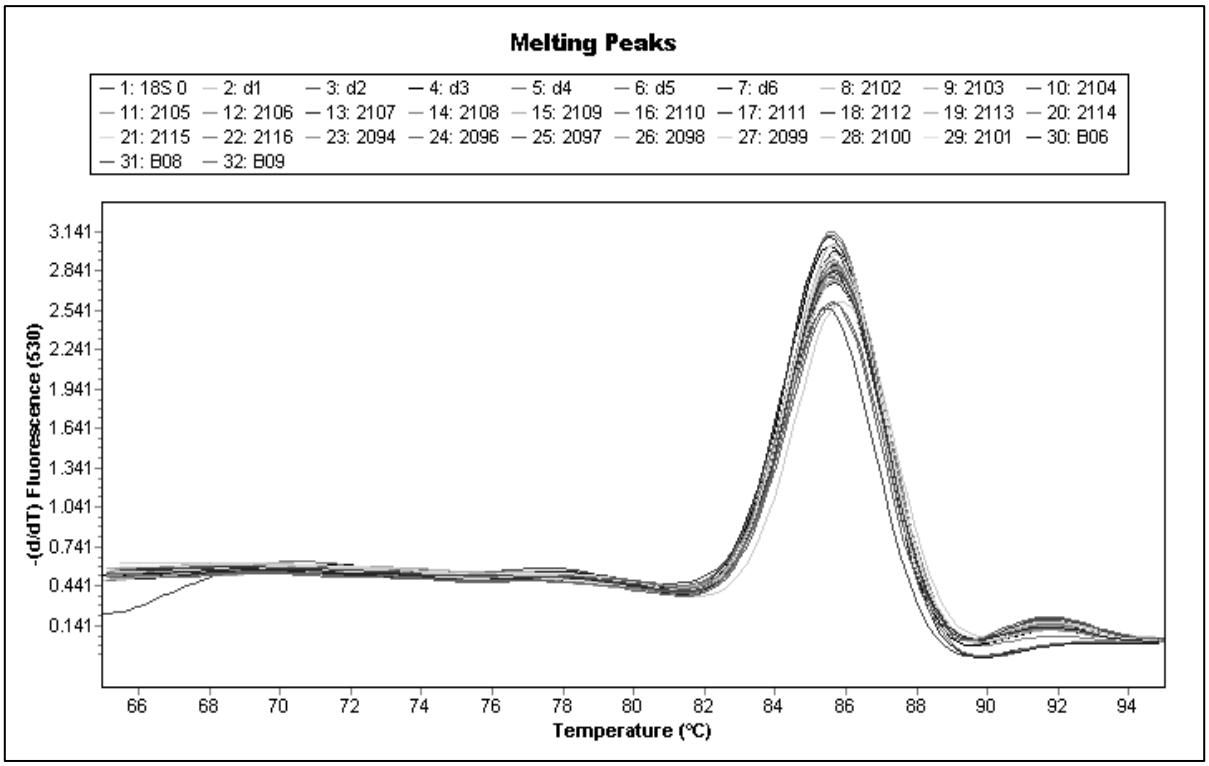


Figure 24. Exemple de courbes de fusion

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentratio	Standard
☑	1	18S 0	Unknown	32.38	[1.45E-5]	
☑	2	d1	Standard	7.77	1.07E0	1.00E0
☑	3	d2	Standard	10.75	1.71E-1	2.00E-1
☑	4	d3	Standard	12.96	4.38E-2	4.00E-2
☑	5	d4	Standard	16.04	7.23E-3	8.00E-3
☑	6	d5	Standard	18.88	1.64E-3	1.60E-3
☐	7	d6	Standard			3.20E-4
☑	8	2102	Unknown	10.05	2.63E-1	
☑	9	2103	Unknown	11.08	1.40E-1	
☑	10	2104	Unknown	10.42	2.09E-1	
☑	11	2105	Unknown	9.95	2.79E-1	
☑	12	2106	Unknown	10.03	2.66E-1	
☑	13	2107	Unknown	10.10	2.55E-1	
☑	14	2108	Unknown	9.88	2.91E-1	
☑	15	2109	Unknown	10.05	2.63E-1	
☑	16	2110	Unknown	9.84	2.99E-1	
☑	17	2111	Unknown	9.81	3.04E-1	
☑	18	2112	Unknown	10.23	2.35E-1	
☑	19	2113	Unknown	9.95	2.79E-1	
☑	20	2114	Unknown	9.75	3.17E-1	

Figure 25. Exemple de rapport de résultats avec calcul des concentrations (18S).

CP : « crossing points » ; Concentration : concentrations calculées ; Standard : concentrations théoriques de la gamme standard D1-D6 ; Chaque individu est identifié par un numéro anonyme (21XX).

PARTIE 1

ANOMALIES MUSCARINIQUES ET MALAISES VAGAUX DE L'ADULTE ET DE L'ENFANT

Contexte

Les syncopes ou malaises vagaux sont définis par la Société Européenne de Cardiologie comme « une perte de connaissance brutale et transitoire, secondaire à une hypoperfusion cérébrale » (Brignole *et al.*, 2018). La survenue de ces malaises est relativement soudaine avec dans la plupart des cas, un retour à la normale spontané, complet et rapide (Arthur and Kaye, 2000). Néanmoins, la survenue fréquente de malaises vagaux peut nuire à la qualité de vie des patients (Grimaldi Capitello *et al.*, 2016). De plus, malgré la nature brève et le plus souvent bégnine de ces syncopes, elles sont source d'inquiétude pour les patients, et notamment pour les parents des enfants présentant des malaises (Iyer and Appleton, 2013).

Il s'agit d'une pathologie commune, représentant environ 5% des hospitalisations et 1 à 3% des admissions aux urgences adultes et pédiatriques (Kapoor, 1992; Colman *et al.*, 2004; Moore and Watemberg, 2016). La syncope vasovagale est de survenue fréquente, notamment chez les enfants et les jeunes athlètes (Vaddadi *et al.*, 2007; Wilde and Wieling, 2007). L'incidence cumulative au cours d'une vie atteindrait environ 40%, avec un pic d'incidence vers l'âge de 15 ans et une survenue plus fréquente chez les femmes (Ganzeboom *et al.*, 2006). Sa fréquence observée dans une population d'étudiants atteindrait même 50% (Ganzeboom *et al.*, 2003).

La physiopathologie est encore mal connue et la notion de maladie vagale est actuellement mal définie. Le système vagal est considéré chez l'adulte comme plutôt protecteur pour le cœur (Alboni *et al.*, 2008), contrebalançant l'influence du système sympathique sur le rythme cardiaque notamment (Béchir *et al.*, 2003; Veltmann *et al.*, 2010). Une réponse reflexe exagérée du système vagal, ou hyperactivité vagale, semble être impliquée dans les malaises vagaux (Béchir *et al.*, 2003). En cas d'hyperactivité vagale, une bradycardie survient brutalement, à l'origine d'une asystolie transitoire pouvant entraîner une syncope liée à l'hypoxie cérébrale. Des stimuli variés sont responsables de cette bradycardie réflexe, tels qu'une stimulation œsophagienne, un réflexe oculo-cardiaque, une stimulation de la région trigéminée et du nasopharynx, une peur, des spasmes de sanglot, etc... (Berntson *et*

al., 1997; Arthur and Kaye, 2000; Brignole *et al.*, 2018). Des facteurs physiologiques et extérieurs peuvent favoriser la survenue des malaises vagaux, tels qu'une hypotension (saignement, déshydratation, vomissement, ...), une température élevée, un espace confiné, fièvre, ... (Sutton *et al.*, 2014)

Le diagnostic et la prise en charge clinique sont parfois difficiles. Ces malaises peuvent aller du simple vertige jusqu'à la syncope grave, entraînant une perte de connaissance. Les prodromes sont souvent typiques : pâleur, nausées, sensation de chaleur et sueurs. Même si sa survenue est rapide, le patient peut anticiper l'arrivée du malaise. En cas de perte de connaissance durant la syncope, la récupération est en général rapide et totale avec d'abord un retour de l'audition puis celui du tonus postural. Certaines circonstances sont des indications pour une hospitalisation consécutive à un malaise vagal : maladie cardiaque connue ou suspectée, malaise durant un effort, malaise ayant entraîné une blessure, antécédents familiaux de mort subite avant l'âge de 40 ans, palpitations avant le malaise, récurrence des malaises, ... (Brignole *et al.*, 2018). Au moment de l'admission, le patient peut soit être mis en observation avec monitoring pouvant aller jusqu'à 24h (Shen *et al.*, 2004) ou il peut être directement dirigé vers un service spécialisé pour des examens complémentaires plus spécifiques (Kenny *et al.*, 2015). Pour déterminer l'origine vagale des malaises, plusieurs examens et tests peuvent être utilisés :

- l'ECG avec stimulation vagale,
- le tilt test utilisé chez le grand enfant et l'adulte,
- le Holter ECG,
- le test de compression carotidienne.`

Les examens complémentaires spécifiques sont peu nombreux et manquent de sensibilité et de spécificité. Ils sont souvent négatifs malgré une histoire clinique évocatrice (Puggioni *et al.*, 2002; Brignole *et al.*, 2018). Aujourd'hui l'association du test de compression carotidienne et du tilt-test semble être la meilleure méthode pour le diagnostic des malaises vagaux (Grubb *et al.*, 1992; Puggioni *et al.*, 2002; Mereu *et al.*, 2016). Le Holter ECG avec détection de la variabilité sinusale sur 24h peut également être utilisé comme examen complémentaire (Fuster *et al.*, 2001; Brignole *et al.*, 2018).

Les recommandations de prise en charge souvent nombreuses et variées : manœuvre de contre-pression, pacemaker, β-bloquants, blocage de l'innervation autonome de l'oreillette gauche, ... (Mahanonda *et al.*, 1995; Madrid *et al.*, 2001; van Dijk *et al.*, 2006; Yao *et al.*, 2012). Malheureusement, aucune de ces prises en charge ne semble montrer une véritable efficacité pour le traitement des malaises vagaux récurrents.

Ainsi, beaucoup d'évaluations cliniques sont disponibles pour déterminer l'origine vagale des malaises, mais jusqu'à maintenant il n'existe pas d'examens biologiques dans cette recherche étiologique des syncopes. Parmi les 3 hypothèses biologiques évoquées dans l'introduction (page -30-), nous n'avons pu tester que celles concernant les RM_2 et l'AchE.

L'objectif principal de l'étude était d'ouvrir une piste biologique en tentant d'identifier une ou plusieurs anomalies qui pourraient conduire à une recherche de marqueur(s) biologique(s). En pratique, il s'agissait de montrer que le niveau d'expression des RM_2 dans le sang est supérieur chez des patients présentant des malaises vagaux répétés (pour les adultes) ou des malaises inexpliqués (pour les enfants) par rapport à une population contrôle. L'objectif secondaire était de montrer que l'expression de l'AchE était également augmentée dans le sang des patients présentant des malaises vagaux.

Méthodes

Pour tester cette hypothèse, nous avons conçu une étude clinique physiopathologique comparative monocentrique (Strasbourg). Nous avons inclus au total 240 sujets, 120 adultes de plus de 18 ans et 120 enfants âgés de 1 mois à 17 ans. Dans chacun des groupes, 60 patients présentant des malaises vagaux et 60 sujets contrôles ont été inclus. Tous les sujets ont été clairement informés des objectifs et des modalités de l'étude. Tous les sujets, ou leurs représentants légaux pour les mineurs ont signé un consentement éclairé avant tout acte relatif à l'étude.

Le critère d'évaluation principal était la mesure par RT-qPCR de l'expression de l'ARNm des RM_2, reflet d'une augmentation de la transcription, dans les cellules sanguines mononuclées des adultes et des enfants présentant des malaises vagaux documentés par rapport aux sujets témoins. Le critère d'évaluation secondaire était la mesure par RT-qPCR de l'expression de l'ARNm de l'AchE, chez les mêmes sujets.

Finalement, 136 sujets âgés de 1 à 50 ans ont été analysés dans cette étude après vérification des tous les critères de sélection et des paramètres analytiques. Ainsi 83 patients présentant des malaises vagaux ont été comparés à 53 sujets contrôles sans antécédents de pathologies vagales ou cardiaques. Les critères de sélection sont résumés dans le tableau 4.

Les 38 patients pédiatriques (de 1 à moins de 18 ans) malades ont été sélectionnés et inclus dans le service de pédiatrie des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS). Ils ont été vus en consultation médicale après avoir présenté un ou plusieurs malaise(s) inexpliqué(s) d'origine vagale probable (c'est-à-dire un malaise ayant les caractéristiques citées ci-dessus). Les 38 sujets contrôles pédiatriques étaient des enfants vus en consultation médicale dans le service de pédiatrie pour une raison médicale sans rapport avec une pathologie vagale ou cardiaque (consultation préopératoire, infection, troubles neurologiques, ...). Les 45 malades adultes ont été recrutés et inclus dans le service de cardiologie adulte des HUS. Il s'agissait de patients suivis pour syncopes vagales qui ont été informés de l'étude au cours d'une consultation médicale de suivi. Les sujets contrôles adultes étaient des volontaires sains, recrutés au Centre d'Investigation Clinique (CIC) du Nouvel Hôpital Civil (NHC) de Strasbourg. Ces personnes ont été sélectionnées sur une liste de volontaires sains ou après leur demande de participation spontanée suite à la diffusion d'une information sur l'étude dans différents médias (internet et affiches).

Description des sujets

Les caractéristiques des sujets inclus sont résumées dans le tableau 3.

		Patients		Contrôles	
		Adultes	**Enfants**	**Adultes**	**Enfants**
Nombre de sujets *Total*		45 *83*	38	32 *53*	21
Nombre de sujets par genre	**Femmes**	38	20	12	8
	Total	*58*		*20*	
	Hommes	7	18	20	13
	Total	*25*		*33*	
Age à l'inclusion (moyenne ± SEM âges) *Total (moyenne ± SEM âges)*		27,3 ± 8,6 *18,9 ± 11,7*	8,8 ± 4,8	24,8 ± 5,4 *18,0 ± 9,7*	7,7 ± 3,6
Test de compression carotidienne	**Positif**	34	NA	8	NA
	Négatif	10		24	
Holter ECG	**Positif**	16	NA	6	NA
	Négatif	28		26	

Tableau 3. Caractéristiques des sujets inclus

	Critères d'inclusion	Critères d'exclusion
Patients adultes	femme ou homme âgé(e) de 18 à 50 ans présentant des signes cliniques de malaises vagaux répétés (au moins 3) ECG normal NFS normale sans contre-indication au test de massage carotidien non-fumeur ou fumeur occasionnel (moins de 3 cigarettes par jour)	maladies cardiovasculaires, neurologiques, psychiatriques, immunologiques, infectieuses ou métaboliques dysautomie antécédents de traitement ou traitement en cours interférent avec le système nerveux autonome consommation de produits dopants ou addiction (cocaïne, cannabis, amphétamines, alcool, ...) consommation de tabac ou de café dans les 24h avant les investigations biologiques ou cliniques grossesse ou allaitement
Contrôles adultes	femme ou homme âgé(e) de 18 à 50 ans sans antécédents personnels ou familiaux de maladies vagales ou cardiaques ECG normal NFS normale sans contre-indication au test de massage carotidien non-fumeur ou fumeur occasionnel (moins de 3 cigarettes par jour)	
Patients pédiatriques	fille ou garçon âgé(e) de 1 mois à 17 ans présentant ou ayant présenté au moins un malaise nécessitant une hospitalisation ou une admission aux urgences pédiatriques ECG normal NFS normale non-fumeur ou fumeur occasionnel (moins de 3 cigarettes par jour)	
Contrôles pédiatriques	fille ou garçon âgé(e) de 1 mois à 17 ans sans antécédents personnels ou familiaux de maladies vagales ou cardiaques ECG normal NFS normale non-fumeur ou fumeur occasionnel (moins de 3 cigarettes par jour)	

Tableau 4. Résumé des critères de sélection

Description des visites

Les visites de l'étude sont résumées dans le tableau 5 pour les adultes et dans le tableau 6 pour les enfants.

Pour chaque groupe, la prise en charge a été la même. Les visites d'inclusion ont été pratiquées dans le service de cardiologie adulte pour les patients adultes, au CIC pour les volontaires sains adultes et dans le service de pédiatrie pour les enfants malades et les témoins. Elles comportaient une consultation médicale afin de réaliser un examen clinique complet et de vérifier l'ensemble des critères de sélection. De plus, un électrocardiogramme a été réalisé pour chaque sujet (celui-ci devait être normal pour pouvoir poursuivre la participation à l'étude). Chez les adultes, la pose d'un Holter ECG (pour 24h) était également prévue lors de cette visite, ainsi qu'une écho-Doppler des vaisseaux du cou pour les sujets de plus de 40 ans (demande de l'ANSM pour des raisons de sécurité du patient). 24 heures après, une 2ème visite était programmée au CIC pour les adultes ou dans le service de pédiatrie pour les enfants. Cette visite a permis de récupérer les données de l'enregistrement du Holter ECG de 24 heures, de réaliser le test de compression carotidienne et de prélever le volume sanguin spécifique sur tube PAXgene®.

VISITES	Pré-sélection	Inclusion J0	Visite 1 J1
Lieu	CIC Service de cardiologie	CIC	CIC
Information du sujet	X		
Consentement éclairé signé		X	
Examen clinique avec ECG		X	
Holter ECG		Pose	Dépose
Echo-doppler des vaisseaux du cou (Sujets > 40 ans)		X	
Test de compression carotidienne			X
Prélèvement sanguin			X

Tableau 5. Résumé des visites des sujets adultes

VISITES	Pré-sélection	Inclusion J0	Visite 1 J1
Lieu	Service de pédiatrie		
Information du sujet	X		
Consentement éclairé signé		X	
Examen clinique comprenant un ECG		X	
Holter ECG		Pose	Dépose
Prélèvement sanguin			X

Tableau 6. Résumé des visites des sujets pédiatriques

Description des tests cardiologiques

Test de compression carotidienne

Ce test a été réalisé chez tous les sujets n'ayant pas de contre-indication à sa réalisation (existence d'un souffle au niveau d'une artère carotide). Ce critère a été vérifié par un examen écho-doppler des vaisseaux du cou effectué lors de la visite de sélection ou datant de moins de 3 mois. Le test de compression carotidienne ou plus précisément du sinus carotidien est effectué en massant manuellement de façon ferme, pendant 5 – 10 secondes le bord antérieur du muscle sternocléidomastoïdien, au niveau du cartilage cricoïde, où le pouls carotidien est le mieux perçu. En pratique, cette manœuvre a été réalisée sur une table d'inclinaison motorisée munie d'un repose-pied (Genin®, France), avec un suivi continu de la pression artérielle (selon la méthode FinapressTM®) et la fréquence cardiaque, obtenues en continu (Task Force Monitor® ; CNSystems® ; Graz. Autriche). Le massage a été réalisé d'abord en décubitus dorsal en débutant du côté droit puis du côté gauche en cas d'absence de réponse lors du massage du côté droit. En cas d'échec du massage en décubitus dorsal, le massage sinocarotidien a été réitéré dans les mêmes conditions, en positions « debout » après bascule à 70°. Pour notre étude, en fonction des données de la littérature, nous avons considéré comme réponse suggestive d'une sensibilité parasympathique exagérée, une réduction de la

fréquence cardiaque supérieure à 10% de la valeur de base et/ou une baisse de la pression artérielle moyenne supérieure à 20% de la valeur de base (Almquist *et al.*, 1985; Benchimol and Oliveira-Souza, 2008; Bevegård and Shepherd, 1966; Brignole *et al.*, 2018; Kenny *et al.*, 2001; Puggioni *et al.*, 2002).

Le Holter ECG

La variabilité sinusale représente les variations physiologiques des intervalles RR (entre 2 QRS), traduisant l'influence de la balance vago-sympathique sur le nœud sinusal. Les données de la variabilité sinusale sont étudiées selon les recommandations de la Société européenne de cardiologie et la Société nord-américaine de stimulation et d'électrophysiologie (Taylor and Lipsitz, 1997; Brignole *et al.*, 2018). Les données calculées sont la fréquence cardiaque, l'intervalle NN moyen, la déviation standard des intervalles NN (SDNN), la déviation standard de la moyenne des intervalles NN calculée sur une durée de cinq minutes (SDANN /5), le pourcentage de NN variant de plus de 50 ms (PNN50) ou 100 ms (PNN100) ou 200 ms (PNN200), la racine carrée de la différence des intervalles NN successifs élevée au carré (rMSSD), la moyenne des déviations standard calculée par intervalles de cinq minutes (SDNNidx). Les indices qui reflètent l'activité vagale dans le domaine temporel, incluent pour l'essentiel, la racine carrée de la différence des intervalles RR normaux consécutifs (rMSSD) et le pourcentage des intervalles RR consécutifs normaux qui diffèrent de plus de 50 ms chez l'homme. La rMSSD est exprimé en millisecondes (ms) et le PNN50 en pourcentage (%). Globalement, rMSSD est de l'ordre de 35 ± 3 ms et PNN50 de 13 %. Ces 2 paramètres sont reproductibles et il existe une différence en fonction du sexe : les valeurs sont en général plus faibles chez l'homme que chez la femme (Sztajzel *et al.*, 2008; Chapleau and Sabharwal, 2011). En conséquence, nous considérerons comme témoins d'une activité vagale, et donc un résultat « positif », les valeurs suivantes :

- rMSSD > 56 ms chez l'homme et 62 ms chez la femme.

- PNN50 > 28% chez l'homme et 29% chez la femme.

Méthode statistique

La distribution des valeurs étant asymétrique dans les deux groupes (figure 26) et très orientée vers les valeurs faibles, des modèles linéaires de distribution Gamma ont été utilisés pour comparer les valeurs entre les groupes. Cette méthode était la plus adaptée dans ce cas car cette régression Gamma tient compte de l'asymétrie des valeurs et donne moins de poids aux valeurs extrêmes. Les interférences statistiques et les estimations des risques ont été calculées à l'aide de techniques Bayésiennes. Cette technique permet d'estimer une probabilité de supériorité entre les 2 groupes, patients *versus* contrôles, Pr(patients>contrôles). Il s'agit d'une probabilité d'observer une différence positive, c'est-à-dire supérieure, dans le groupe des patients. Vu le contexte de l'étude, on a considéré une probabilité de supériorité > 90% (soit 0,90) comme une différence positive statistiquement significative. Ces analyses très spécifiques ont été effectuées avec l'aide et les conseils des méthodologistes des HUS et les résultats bruts nous ont été transmis pour les interprétations.

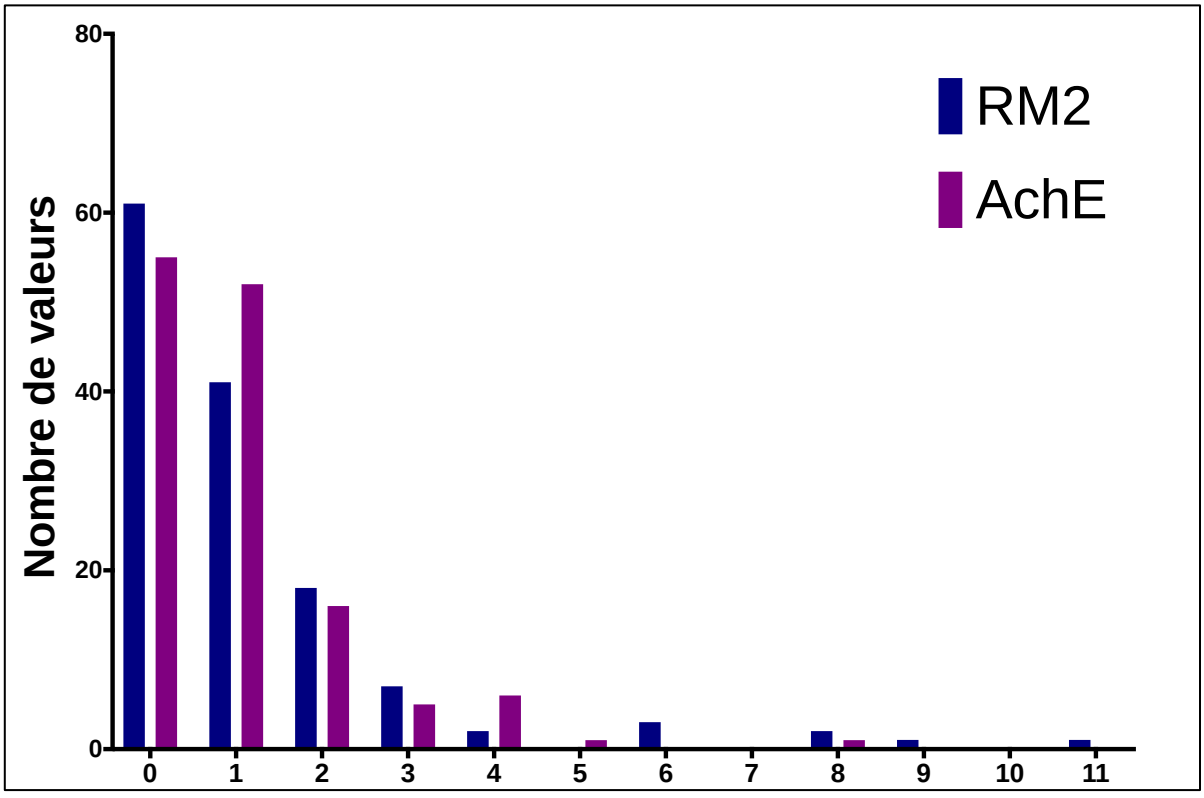


Figure 26. Histogramme de la distribution des valeurs de l'expression des RM_2 et de l'AchE

Résultats

Expression des ARNm circulants des RM_2 dans la population totale de l'étude

Dans la population totale de l'étude, la médiane [intervalle q1 ; q3] d'expression de ARNm circulants des RM_2 est très significativement supérieure chez les 83 patients présentant des malaises vagaux 0,9 [0,3 ; 1,9] par rapport aux 53 sujets témoins 0,2 [0,1 ; 1,0]. La probabilité pour que le niveau d'expression des RM_2 soit plus élevé chez les patients par rapport aux contrôles, Pr(patients>contrôles), est estimée à 0,99 (figure 27).

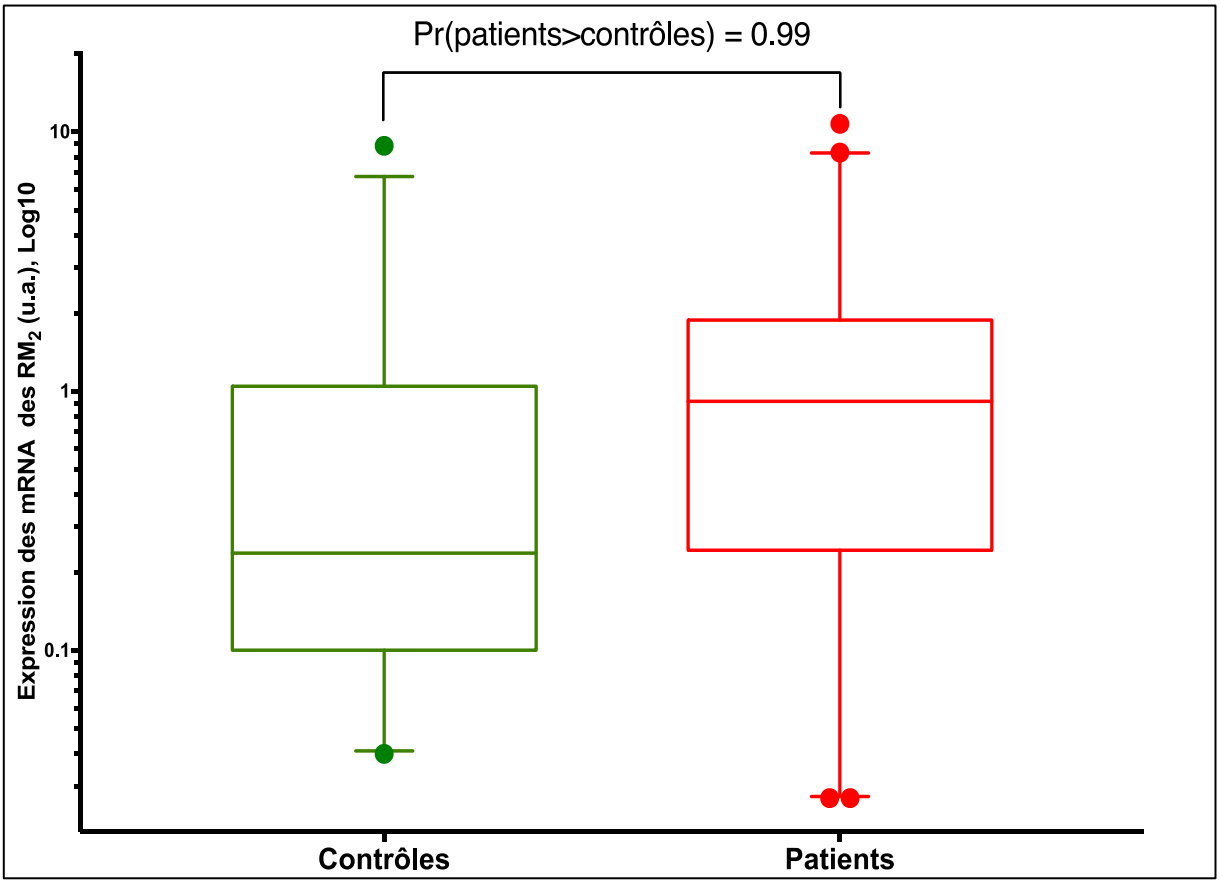


Figure 27. Expression des ARNm circulants des RM_2 dans la population totale de l'étude

Expression des ARNm circulants de l'AchE dans la population totale de l'étude

La médiane d'expression de l'AchE est également significativement plus élevée chez les 83 malades 0,7 [0,4 ; 1,6] comparativement aux 53 sujets sains 0,4 [0,2 ; 1,1] avec une probabilité de supériorité Pr(patients>contrôles) estimée à 0,97 (figure 28).

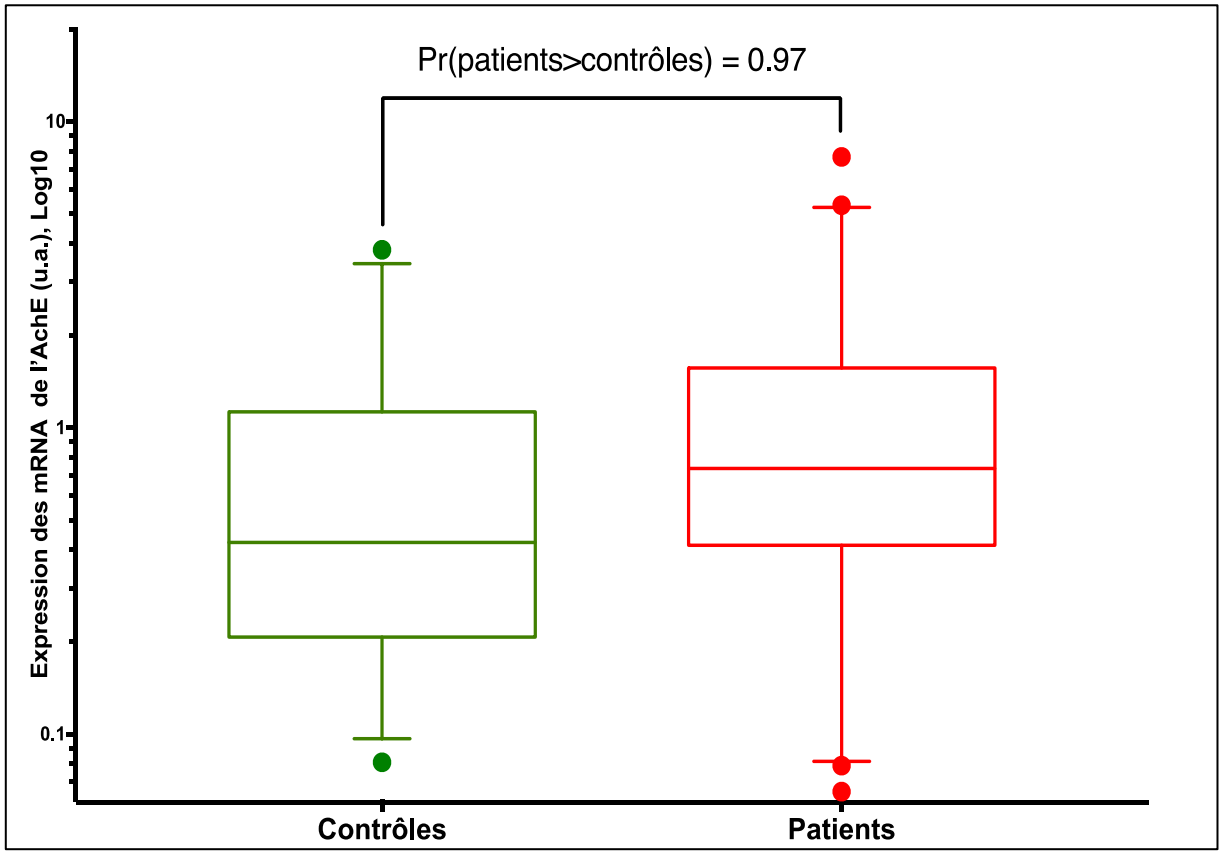


Figure 28. Expression des ARNm circulants de l'AchE dans la population totale de l'étude

Ratio d'expression des ARNm circulants RM_2/AchE dans la population totale de l'étude

Le rapport d'expression RM_2/AchE est nettement plus élevé dans le groupe des 83 patients par rapport au groupe contrôle (53 sujets). Les médianes sont respectivement de 1,1 [0,8 ; 1,3] et de 0,8 [0,5 ; 1,1] pour les patients et le contrôles, Pr(patients>contrôles) = 1,00 (figure 29).

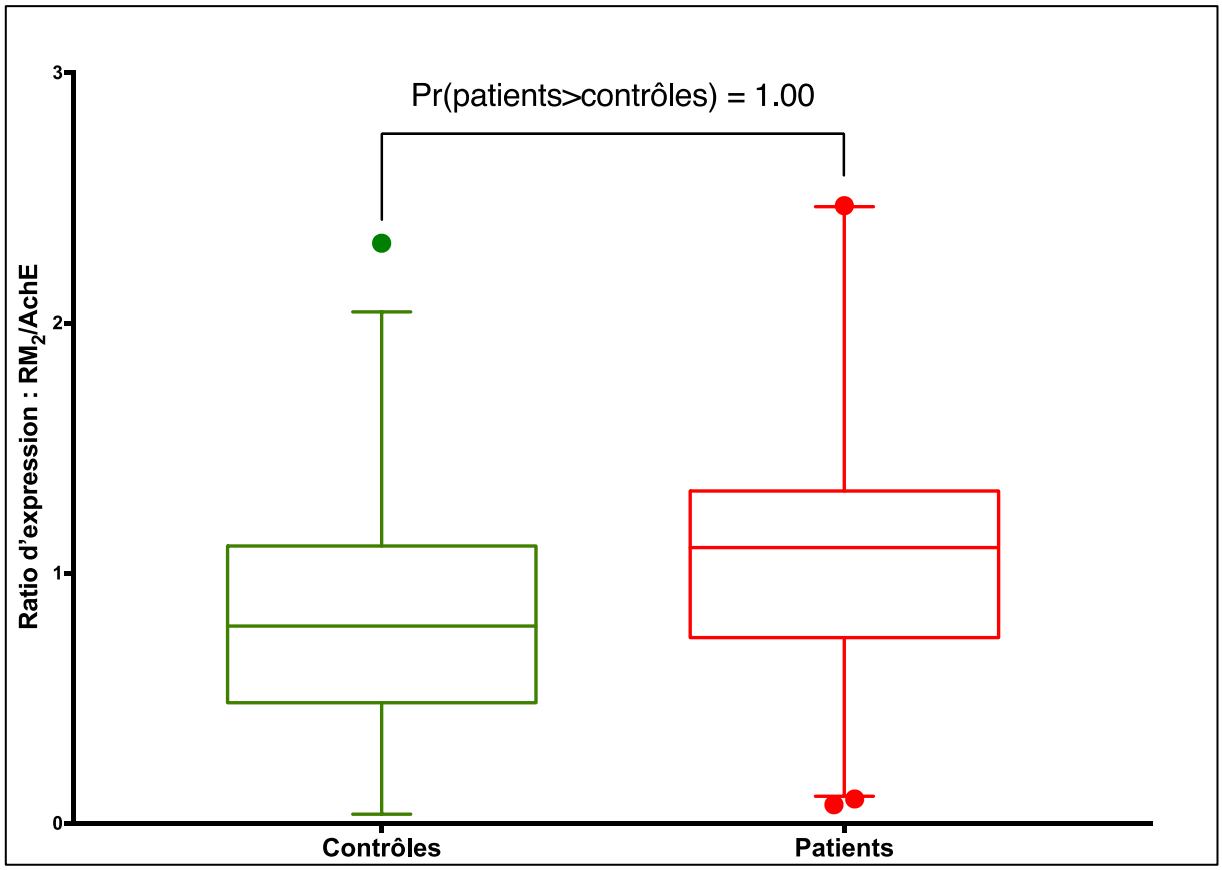


Figure 29. Rapport d'expression des ARNm circulants RM_2/AchE dans la population totale de l'étude

Corrélations et différence femmes/hommes

Dans cette étude nous n'avons pas trouvé de corrélations entre les niveaux d'expression des RM_2 ou de l'AchE avec l'âge des sujets ou le nombre de syncopes (indiqué par les patients lors de la consultation médicale d'inclusion). De plus, il n'y a pas de différence significative des taux d'expression des marqueurs entre les genres.

Expression des ARNm circulants des RM_2 dans la population adulte de l'étude

Lorsque les adultes sont analysés séparément nous observons des résultats similaires à ceux dans la population totale de l'étude. Le niveau d'expression moyen des RM_2 circulants est significativement supérieur chez les 45 patients 1,1 [0,7 ; 1,3] par rapport aux 32 volontaires sains 0,8 [0,5 ; 0,9]. La probabilité de supériorité Pr(patients>contrôles) est estimée à 0,98 (figure 30).

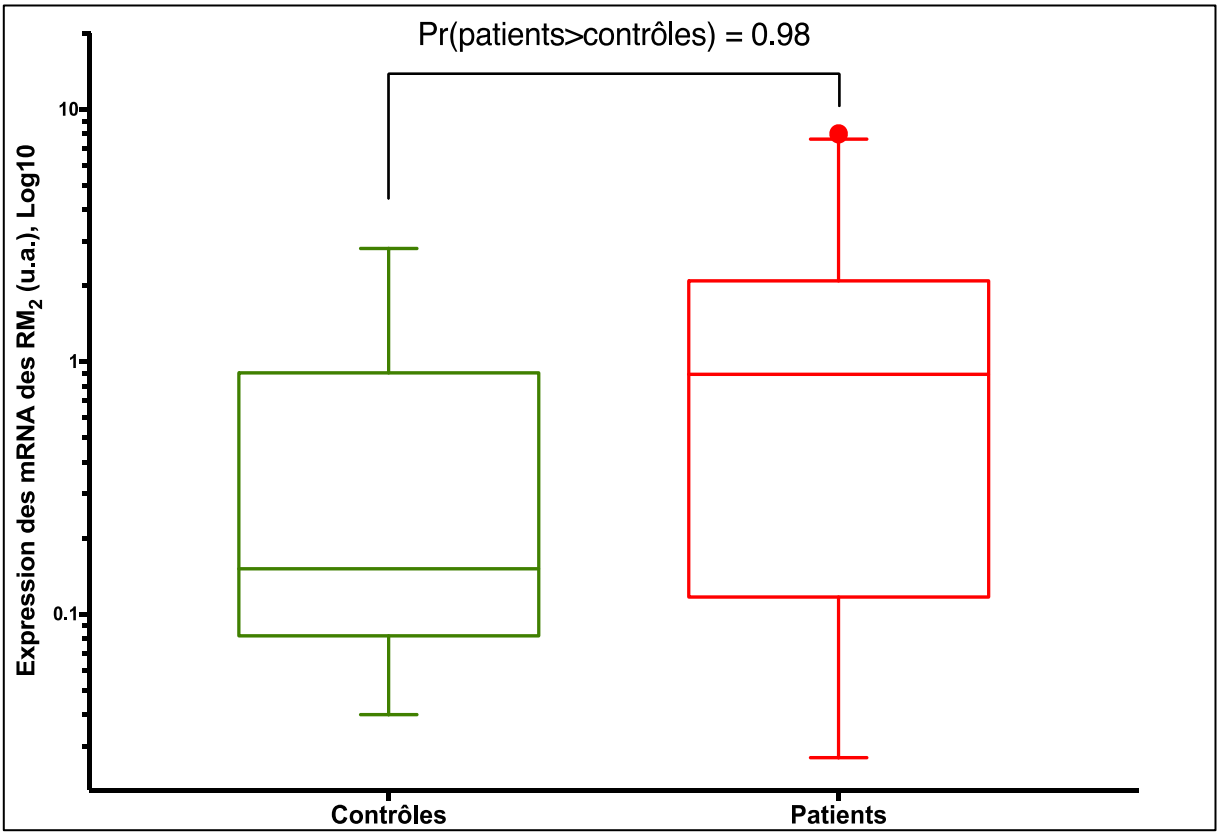


Figure 30. Expression des ARNm circulants des RM_2 dans la population adulte de l'étude

Expression des ARNm circulants de l'AchE dans la population adulte de l'étude

Dans cette sous population, l'expression médiane de l'AchE chez les 45 malades est significativement augmentée comparativement au groupe contrôle (n=32). Les médianes sont de 0,8 [0,4 ; 2,1] pour les patients et de 0,4 [0,2 ; 1,1] pour les contrôles. La probabilité de supériorité est estimée à Pr(patients>contrôles) = 0,97 (figure 31).

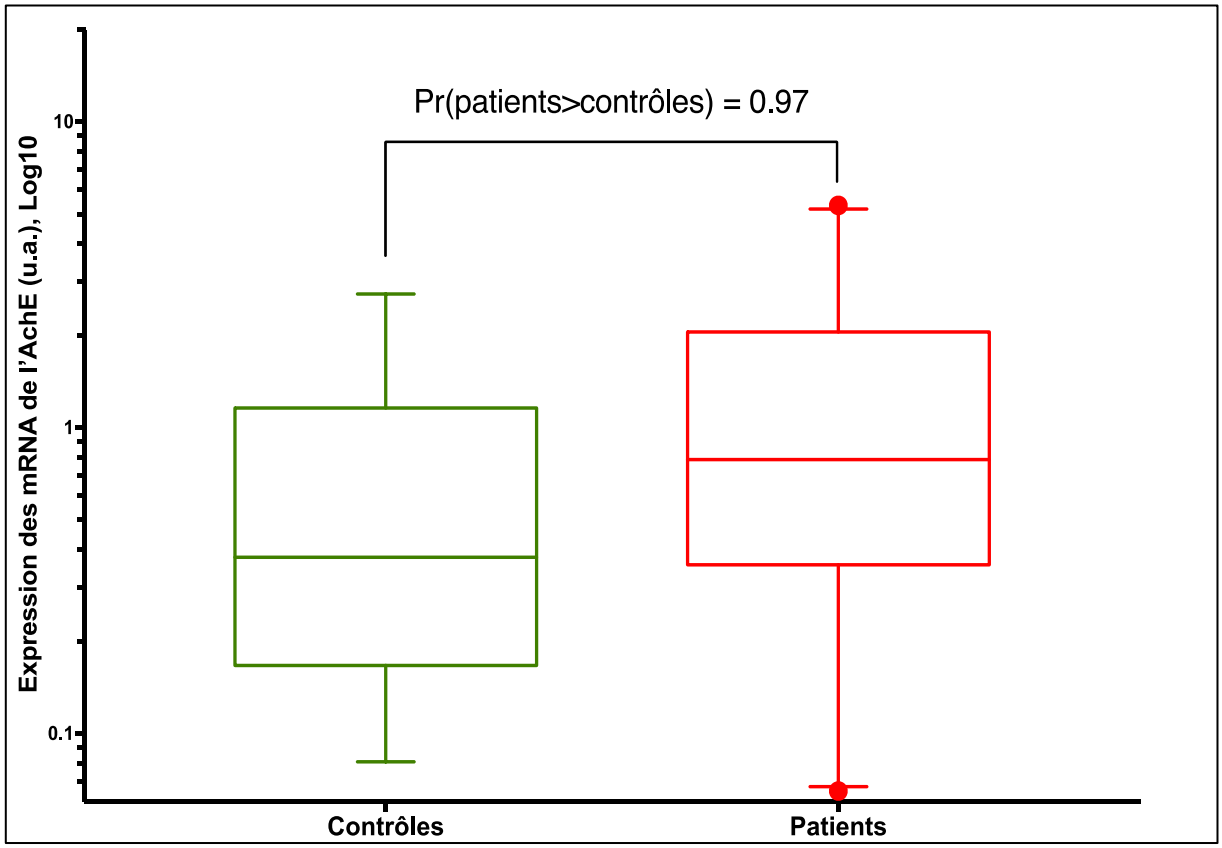


Figure 31. Expression des ARNm circulants de l'AchE dans la population adulte de l'étude

Rapport d'expression des ARNm circulants RM_2/AchE dans la population adulte de l'étude

La probabilité que le rapport d'expression RM_2/AchE soit supérieur chez les 45 patients par rapport aux 32 contrôles est estimée à Pr(patients>contrôles) = 0,98. Les médianes d'expression sont respectivement de 1,1 [0,7 ; 1,3] et de 0,8 [0,5 ; 0,9] pour les malades et les sujets sains (figure 32).

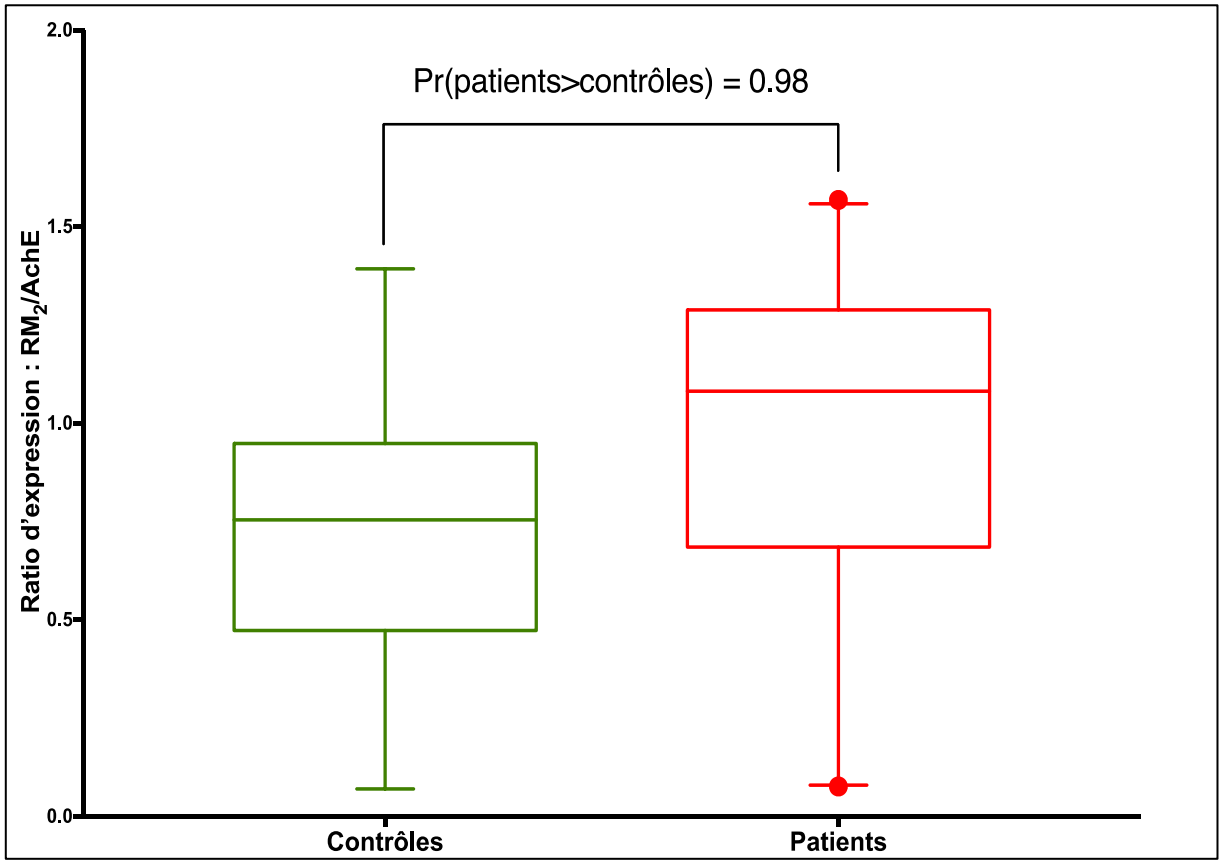


Figure 32. Rapport d'expression des ARNm circulants RM_2/AchE dans la population adulte de l'étude

Expression des ARNm circulants des RM_2 dans la population adulte de l'étude en tenant compte des résultats du test de compression carotidienne

Lorsque l'on prend en compte les résultats du test de compression carotidienne, réalisé chez tous les adultes lors de la visite d'inclusion, les différences entre les 2 groupes sont encore plus marquées. Tout d'abord, l'expression moyenne des RM_2 est très nettement augmentée chez les 34 patients avec test positif 1,0 [0,4 ; 2,1] comparativement aux 24 contrôles avec test négatif 0,1 [0,1 ; 1,1] avec une probabilité de supériorité Pr(patients>contrôles) estimée à 0,99 (figure 33).

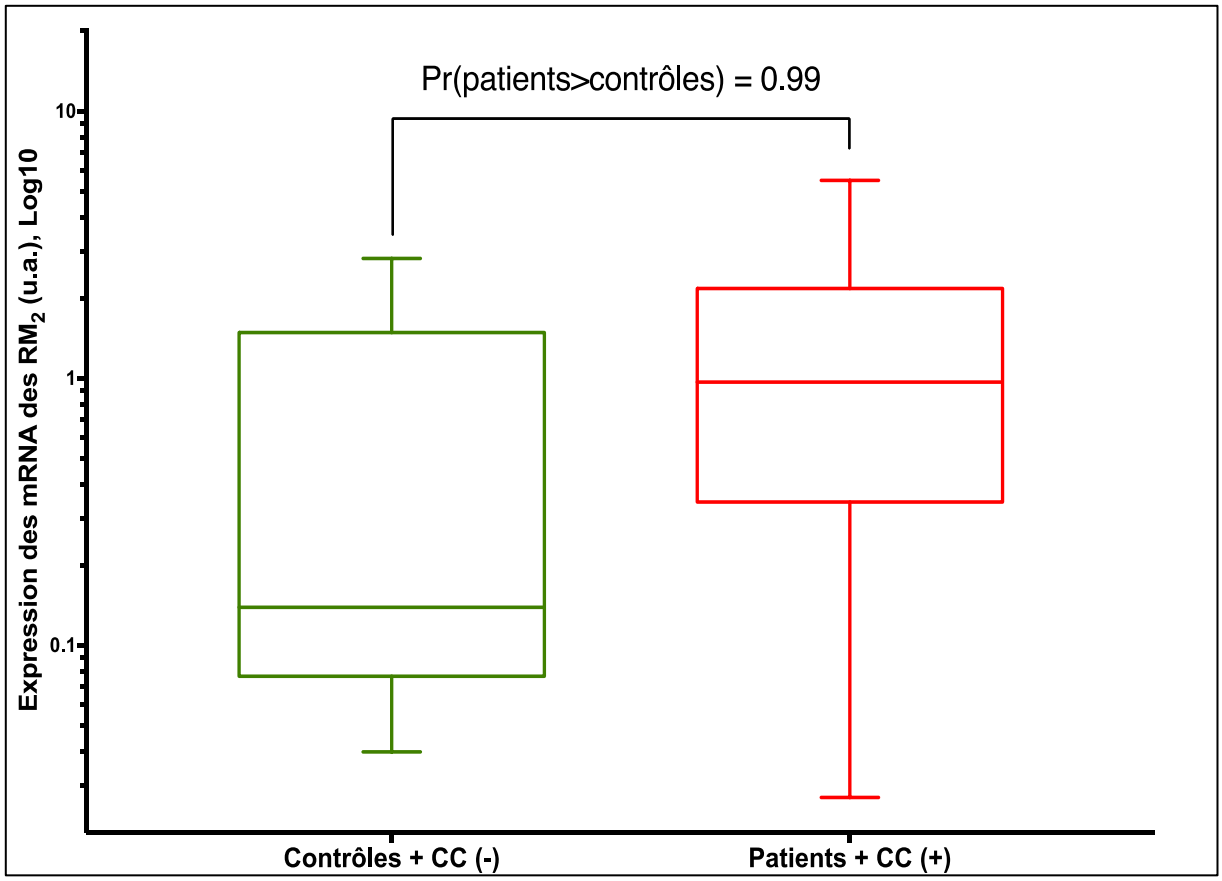


Figure 33. Expression des ARNm circulants des RM_2 dans la population adulte de l'étude en tenant compte des résultats du test de compression carotidienne

Expression des ARNm circulants de l'AchE dans la population adulte de l'étude en tenant compte des résultats du test de compression carotidienne

Comme pour les RM_2, l'augmentation de l'expression de l'AchE chez les patients par rapport aux contrôles est plus marquée en considérant les résultats du test de compression carotidienne. En effet, la probabilité de supériorité est ici de Pr(patients>contrôles) = 0,98 ; avec des médianes respectives de 1,0 [0,5 ; 1,9] et de 0,3 [0,2 ; 1,2] pour les 34 malades avec test positif et les 24 sujets sains avec test négatif (figure 34).

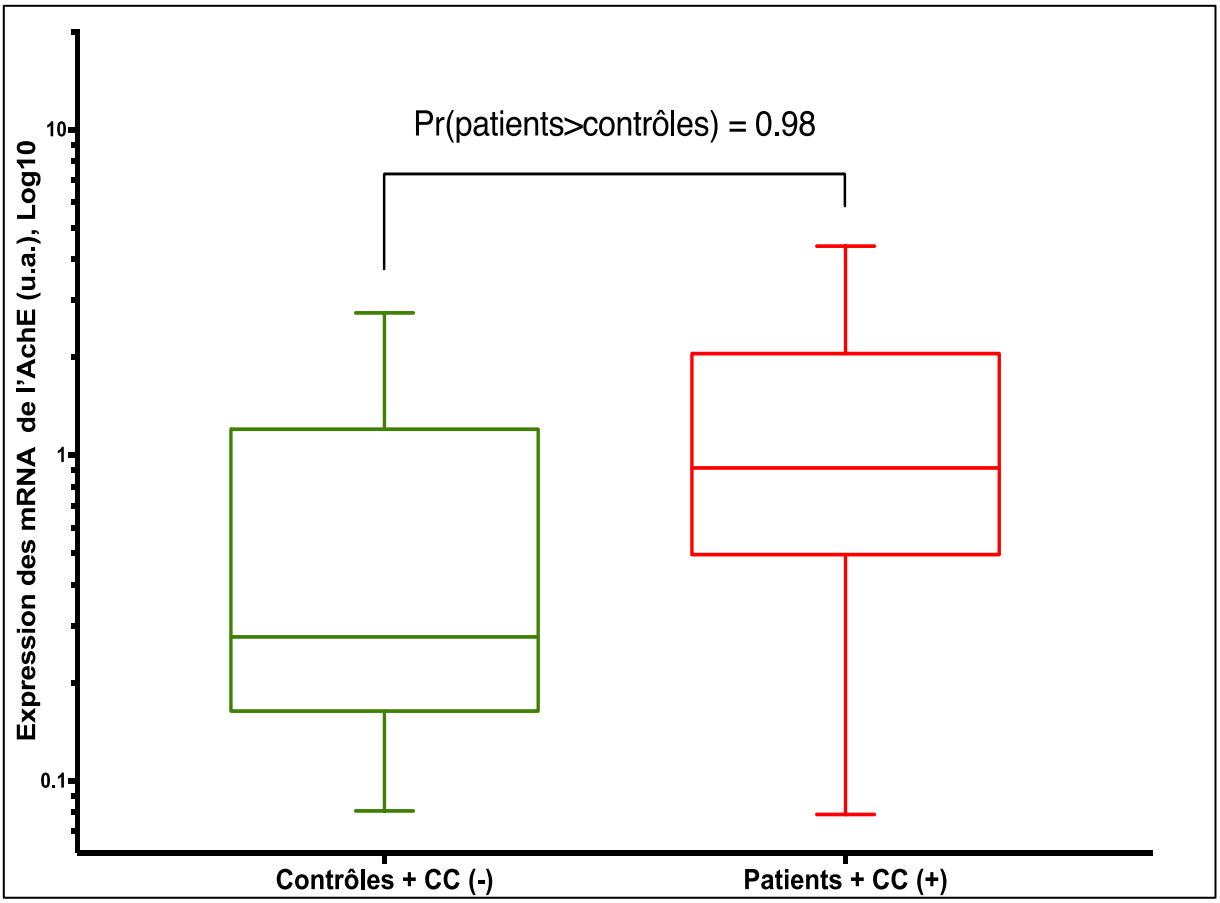


Figure 34. Expression des ARNm circulants de l'AchE dans la population adulte de l'étude en tenant compte des résultats du test de compression carotidienne

Expression des ARNm circulants des RM_2 et de l'AchE dans la population adulte de l'étude en tenant compte des résultats du test Holter ECG

En prenant en compte les résultats du test Holter ECG, seuls ou associés aux résultats du test de compression carotidienne, les différences entre les 2 groupes ne sont pas plus marquées par rapport aux analyses des adultes sans prendre en compte ce test. Par exemple, les probabilités de supériorité Pr(patients>contrôles) sont de 0,97 pour les RM_2 et 0,94 pour l'AchE avec le test Holter ECG seul, et 0,99 pour les RM_2 et 0,94 pour l'AchE quand il est associé au test de compression carotidienne.

Expression des ARNm circulants des RM_2 dans la population pédiatrique de l'étude

Chez les enfants, de 1 à 18 ans, l'expression moyenne des RM_2 est significativement augmentée chez les malades par rapport aux enfants contrôles, avec une probabilité de supériorité Pr(patients>contrôles) = 0,90. Les médianes d'expression sont de 1,0 [0,3 ; 1,6] pour les patients et de 0,3 [0,2 ; 1,1] pour les contrôles (figure 35).

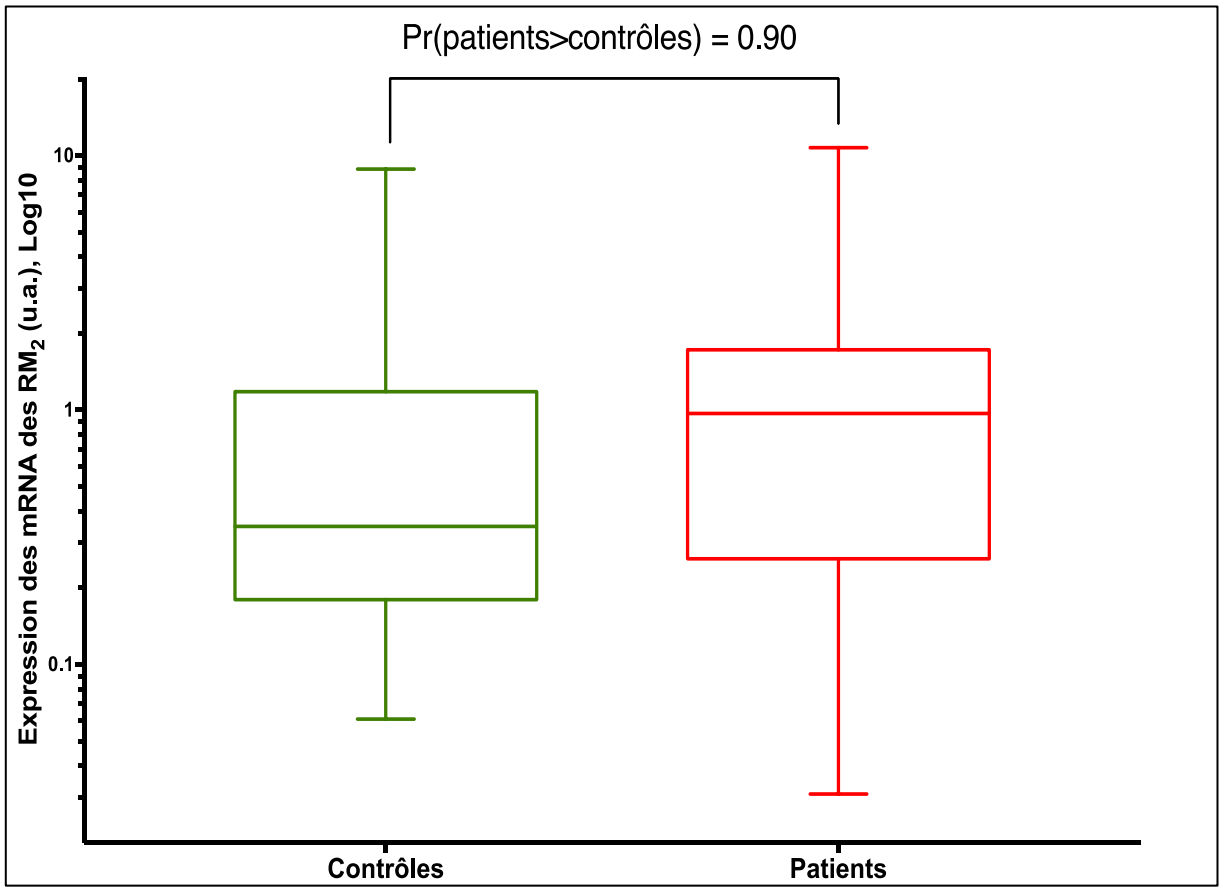


Figure 35. Expression des ARNm circulants des RM_2 dans la population pédiatrique de l'étude

Expression des ARNm circulants de l'AchE dans la population pédiatrique de l'étude

Dans la sous-population pédiatrique de l'étude, il n'y a pas de différence significative entre les 2 groupes. Les médianes sont de 0,7 [0,4 ; 1,1] pour les patients et 0,5 [0,4 ; 1,1] pour les témoins. Pr(patients > contrôles) = 0,74 (figure 36).

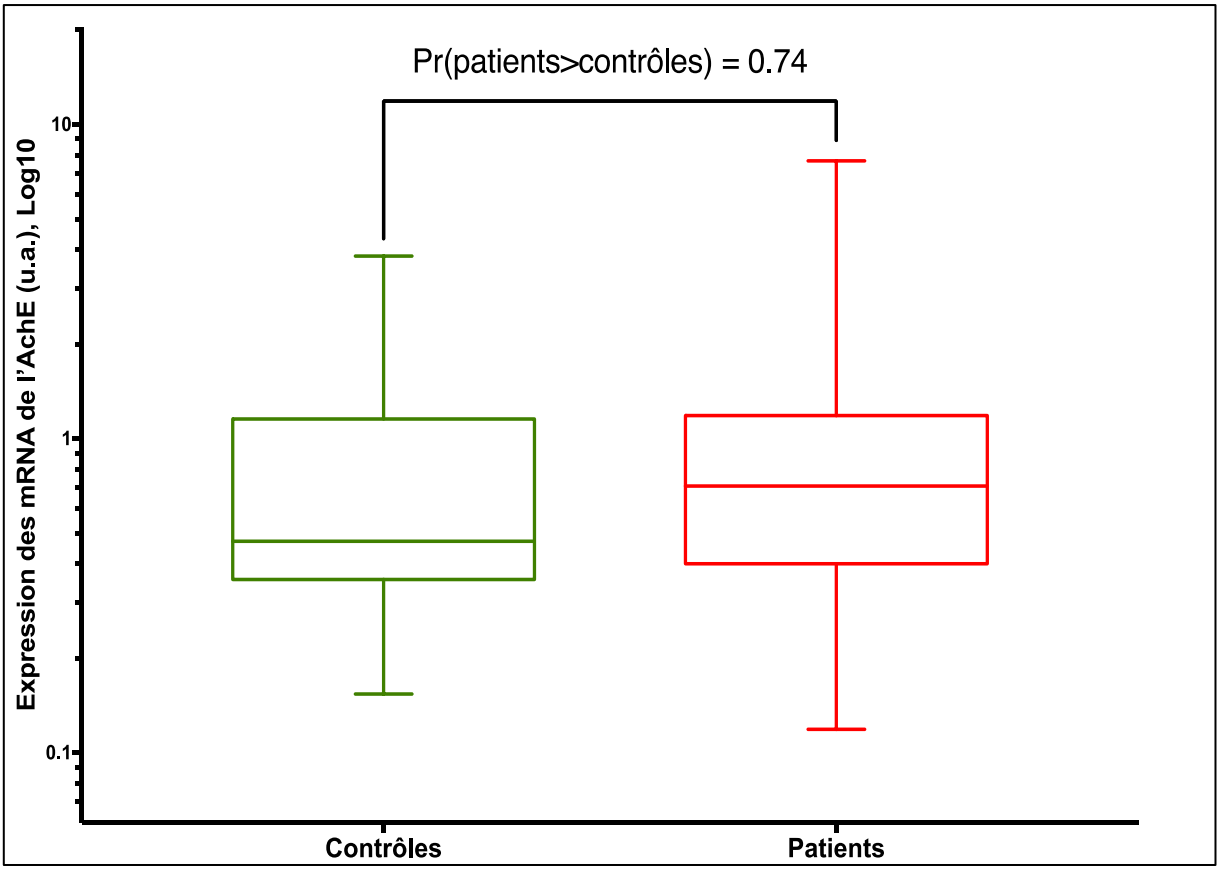


Figure 36. Expression des ARNm circulants de l'AchE dans la population pédiatrique de l'étude

Rapport d'expression des ARNm circulants RM_2/AchE dans la population pédiatrique de l'étude

La probabilité de supériorité que le rapport d'expression RM_2 /AchE soit plus important chez les patients comparativement aux contrôles Pr(patients>contrôles) est estimée à 0,97. Les médianes sont respectivement de 1,2 [0,8 ; 1,6] et de 1,1 [0,6 ;1,3] pour les patients et les contrôles (figure 37).

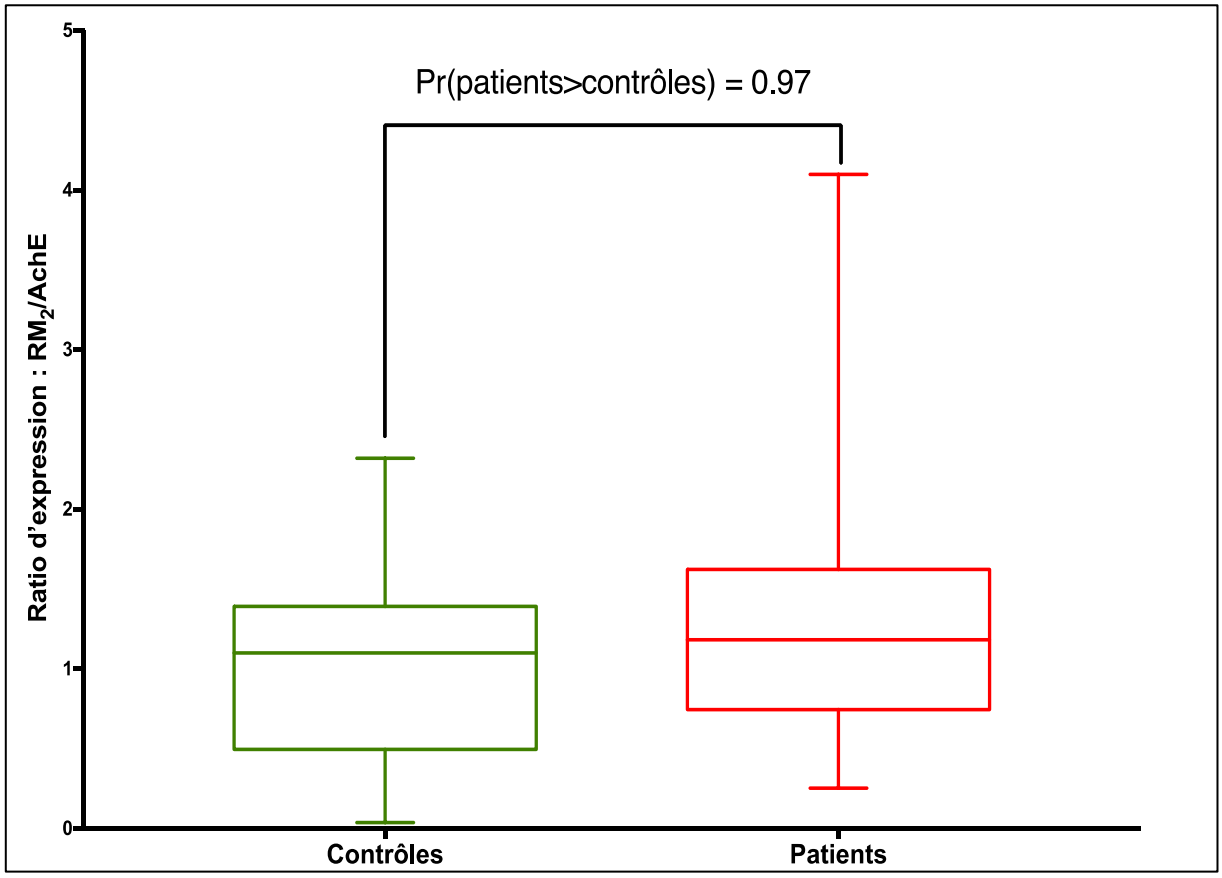


Figure 37. Rapport d'expression des ARNm circulants RM_2 /AchE dans la population pédiatrique de l'étude

Discussion

Les ARNm circulants des RM_2 sont significativement surexprimés chez les patients présentant des malaises vagaux, enfants et adultes, comparativement aux sujets contrôles. Ces résultats valident l'objectif principal de l'étude. D'après nos précédentes études, plusieurs sous-types des récepteurs muscariniques semblent être surexprimés en cas d'hyperactivité vagale (Livolsi *et al.*, 2010a). Dans cette étude, nous nous sommes intéressés uniquement aux RM_2, le sous-type muscarinique le plus exprimé dans le cœur (Wei and Sulakhe, 1978; Hulme *et al.*, 1990; Caulfield, 1993; Shi *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001; Livolsi *et al.*, 2010a, 2010b). De plus, il est connu que les récepteurs muscariniques sont également exprimés dans les globules blancs, notamment les lymphocytes (Hellström-Lindahl and Nordberg, 1996; Ricci *et al.*, 2002; Tayebati *et al.*, 1999, 2002). Nous avons mis en évidence que cette anomalie muscarinique est également présente dans le sang et n'est pas limitée au tissu cardiaque, comme dans notre étude précédente chez les nourrissons (Livolsi *et al.*, 2010b). Si ces résultats se confirment par d'autres études, l'expression des ARNm circulants des RM_2 pourrait devenir un marqueur biologique d'hyperactivité vagale et des maladies associées, telles que les malaises vagaux, les malaises inexpliqués de l'enfant et certains cas de MSN.

L'expression des ARNm circulants de l'AchE est aussi significativement augmentée chez les patients par rapport aux contrôles. Cette enzyme a pour rôle de dégrader et d'inactiver l'Ach, neuromédiateur d'action pré et post-synaptique (système parasympathique) (Massoulié *et al.*, 1993a, 1993b, 2008). Cette surexpression observée renforce l'hypothèse d'un mécanisme compensatoire de cette enzyme associé à la surexpression des RM_2. Les résultats observés chez les enfants, à savoir une augmentation non significative de l'expression de l'AchE, suggèrent que ce mécanisme de compensation n'est pas encore complet ou inefficace à ce stade du développement. Ainsi, contrairement aux RM_2, l'augmentation de l'expression de l'AchE semble se faire plus tardivement, sans toutefois constater une corrélation entre l'âge et le niveau d'expression de l'enzyme. Pour appuyer cette hypothèse d'une compensation secondaire par l'AchE, nous avons constaté dans l'étude présentée ci-après (Adamopoulos *et al.*, 2016), que

l'expression des RM_2 peut être déjà très importante dès le plus jeune âge (dans les premiers mois de vie), alors que l'expression de l'AchE n'est pas encore augmentée. (Hellström-Lindahl and Nordberg, 1996; Pezzementi, *et al.*, 1993; Sussman, *et al.*, 1993; Massoulié *et al.*, 2008; Tayebati *et al.*, 1999, 2002; Ricci *et al.*, 2002)

Chez les patients de l'étude, adultes et enfants, l'expression moyenne du rapport RM_2/AchE est significativement augmentée comparativement aux témoins. Cela suggère que la compensation induite de l'AchE ne semble pas être suffisante pour empêcher la survenue des malaises vagaux. Ainsi l'association entre une surexpression des RM_2 et une compensation insuffisante de l'AchE, pourrait être à l'origine de ces syncopes. Néanmoins, d'autres mécanismes de compensation semblent entrer en jeu, car certains sujets présentaient ces caractéristiques sans pour autant présenter malaises.

Les travaux précédents de notre équipe ont montré que l'expression des ARNm circulants, mesurée par RT-qPCR, est corrélée à la densité de RM_2 présents dans le cœur, visualisée par expérience de binding. La même corrélation a été observée pour l'AchE, entre l'activité érythrocytaire (technique de référence) et l'expression des ARNm circulants (Livolsi *et al.,* 2010a, 2010b). Cela justifiait l'utilisation de la RT-qPCR comme seule méthode d'analyse dans notre étude, technique sensible et reproductible adaptée à l'utilisation en clinique (Nolan *et al.*, 2006).

La surexpression des RM_2 et de l'AchE est-elle un phénomène permanent ou transitoire suite au malaise ? Cette question reste ouverte et il est difficile d'y répondre. Pour cela, il faudrait réaliser une étude longitudinale où l'on prélèverait des patients à plusieurs reprises au cours du temps, avant et après un malaise par exemple. Dans notre étude, le prélèvement sanguin a été effectué à différents moments en fonction des patients. Chez certains patients, le dernier malaise était assez récent, alors que pour d'autres il remontait à plusieurs mois, voire plusieurs années. Nous n'avons pas trouvé de différence d'expression entre ces patients, ce qui peut orienter la réponse vers un phénomène permanent plutôt que transitoire. De plus, des sujets contrôles présentaient ces surexpressions sans manifestations

cliniques, ce qui conforte l'idée que ce n'est pas le malaise qui entraîne la surexpression transitoire des RM_2 ou de l'AchE.

Le test de compression carotidienne est un examen clinique très utilisé pour le diagnostic des malaises d'origine inconnue, potentiellement vagaux (Brignole *et al.*, 2018). Dans notre étude, ce test a été réalisé chez tous les sujets adultes et nous avons constaté environ 25% de faux positifs (10 sur 45 chez les patients) ou de faux négatifs (8 sur 32 chez les témoins). Lorsque que l'on tient compte des résultats, nous observons une différence du niveau d'expression des RM_2 encore plus marquée que lorsque seul le critère clinique a été utilisé. Nous avons comparé les patients avec un test de compression carotidienne positif par rapport aux témoins avec test de compression carotidienne négatif, et cela donne une différence plus significative malgré un nombre de sujets analysés moins important. Ces résultats permettent de justifier l'utilisation de ce test dans le diagnostic des malaises vagaux. Le test du Holter ECG n'a, quant à lui, pas d'influence sur la différence d'expression des ARNm entre les 2 groupes. Si l'on prend en compte les résultats de ce test, seul ou associé aux résultats du test de compression carotidienne, la surexpression des RM_2 ou de l'AchE chez les patients n'est pas plus importante. Toutefois, il faut sûrement relativiser ces résultats du fait du faible nombre de sujets entrant dans la comparaison. En effet, nous avons constaté un grand nombre (60%) de patients malades présentaient un Holter ECG « négatif », c'est à dire sans augmentation du rMSSD et/ou du PNN50.

Nous pouvons formuler plusieurs limitations dans notre étude. Tout d'abord, même si la surexpression des RM_2 est un scénario cohérent dans la survenue des malaises vagaux, il n'est pas exclu que d'autres paramètres biologiques entrent en jeu dans cette pathologie. En effet, la physiopathologie de ces malaises semble être complexe et sûrement multifactorielle, c'est-à-dire pas limitée à la surexpression des RM_2. D'autres études ont mis en évidence l'implication d'autres paramètres biologiques dans des syncopes, telles que l'adénosine, la sérotonine ou les endorphines (Evans *et al.*, 1989; Grubb *et al.*, 1993; Wallbridge *et al.*, 1994; Shen *et al.*, 1996; Joulia *et al.*, 2013, 2014) et nous n'excluons pas d'associer les résultats de ces recherches à nos travaux dans nos prochaines études.

Une grande variabilité interindividuelle de l'expression des RM_2 et de l'AchE a été observée dans les 2 groupes. Cela peut être dû à une définition trop imprécise des critères cliniques couramment utilisés dans le diagnostic des malaises vagaux, et par conséquent utilisés ici comme critères de sélection dans notre étude. Il est important de choisir des critères de sélection clairs, or dans cette pathologie cela était difficile. Dans nos prochaines études, il faudra associer plusieurs critères cliniques et physiologiques (mesurés par des tests, tels que le test de compression carotidienne ou le tilt test), afin de réduire autant que faire se peut la variabilité interindividuelle que nous avons observée.

Des études ont montré une implication de la transmission génétique dans les malaises vagaux (Lelonek *et al.*, 2008; Márquez *et al.*, 2007). Encore aujourd'hui, on ignore si la surexpression des RM_2 et de l'AchE est due à une mutation génétique ou secondaire à une libération excessive d'Ach par exemple. Mais nous avons entrepris des recherches génétiques pour tenter de déterminer le rôle éventuel de la génétique dans ces malaises (Márquez *et al.*, 2007; Lelonek *et al.*, 2008).

En conclusion, ces résultats ont conforté l'idée que la surexpression des RM_2 pouvait être à l'origine, ou du moins contribuer, à l'hyperactivité vagale entraînant des malaises vagaux. Nous avons retrouvé ces anomalies dans le sang humain comme nous les avions observées dans le sang de lapins (Livolsi *et al.*, 2010a) et dans les cœurs de nourrissons décédés de MSN (Livolsi *et al.*, 2010b). Ces paramètres biologiques pourraient permettre, associés aux examens cliniques et physiologiques, d'aider au diagnostic des malaises vagaux et permettre une meilleure prise en charge, à condition bien sûr qu'ils deviennent des biomarqueurs dûment validés.

Perspectives

Cette étude a donc permis d'objectiver des anomalies de l'expression des ARNm des RM_2 et de l'AchE dans le sang humain de malades présentant des syncopes vagales. Elle ouvre la voie à d'autres études pour analyser ces paramètres biologiques dans d'autres pathologies, telles que les malaises sévères inexpliqués du jeune enfant ou la MSN.

PUBLICATION 1

(Soumise)

INCREASED EXPRESSION OF BLOOD MUSCARINIC RECEPTORS IN PATIENTS WITH REFLEX SYNCOPE

***Short title**: Reflex syncope and blood muscarinic receptors*

***Maxime BEUTELSTETTER**, PharmD[1,2]*; Angelo LIVOLSI, MD[3]*; Hugues GRENEY, PhD[4]; Pauline HELMS, MD[3]; Catherine SCHMIDT-MUTTER, MD,PhD[1,2]; Charlie DE MELO, MD[5]; Gerald ROUL, MD,PhD[6]; Florian ZORES, MD[7]; Alexandre BOLLE, PharmD[1]; Nassim DALI-YOUCEF, PhD[8,9]; Magali BEAUGEY, MS[4]; Alban SIMON, MS[1]; Nathalie NIEDERHOFFER, PhD[4]; Jacques REGNARD, MD[10]; Malika BOUHADDI, MD[10]; Chris ADAMOPOULOS, MD,PhD[3]; Mickael SCHAEFFER, PhD[11]; Erik SAULEAU, MD, PhD[11]; Pascal BOUSQUET, MD,PhD[1,4].*

**: First co-authors, equal contribution.*

[1]*Clinical Investigation Center, INSERM 1434, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France.*
[2]*Biopathology of Myelin, Neuroprotection and Therapeutic Strategies, INSERM U1119, University of Strasbourg, Faculty of Medicine, Strasbourg, France.*
[3]*Unit of Cardiopediatrics, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France.*
[4]*Laboratory of Neurobiology and Cardiovascular Pharmacology, Federation of Translational Medicine, EA 7296, University of Strasbourg, Faculty of Medicine, Strasbourg, France.*
[5]*Unit of Neonatal Intensive Care, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France.*
[6]*Unit of Cardiology, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France.*
[7]*Specialized Medical Group – The Premium, Strasbourg, France.*
[8]*Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, University Hospital of Strasbourg, France.*
[9]*Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology, Department of Functional Genomics and Cancer, Illkirch, France.*
[10]*Physiology-Functional Explorations, Regional University Hospital of Besançon, Besançon, France.*
[11]*Department of Public Health, methods in clinical research, University of Strasbourg, Strasbourg, France.*

Abstract

Aims *- Pathophysiology of reflex syncope is not fully understood but a vagal overactivity might be involved in this syncope. So far, no specific biological abnormalities have been identified in this clinical entity. Previously, overexpression of muscarinic M_2 receptors and acetylcholinesterase was found in particular in the heart and in lymphocytes of rabbits with vagal overactivity as well as in hearts of Sudden Infant Death Syndromes. Acetylcholinesterase overexpression was interpreted as a compensatory mechanism associated with M_2 receptor overexpression The aim of this present study was to look whether blood M_2 receptor expression is increased in blood of patients with reflex syncope in which vagal overactivity is involved. The second objective was to investigate whether acetylcholinesterase is also overexpressed in these patients.*

Methods and Results *- We enrolled 136 subjects in this monocenter study. 45 adults exhibiting recurrent reflex syncope were compared with 32 healthy adult volunteers (18-50 years). We also compared 38 children exhibiting reflex syncope requiring hospitalization with 21 controls (1-17 years). All subjects were informed orally and writing of the study's modalities and signed consent. For specific analyses, one blood sample was taken from each subject and blood mRNA expression of M_2 receptors was assessed by qRT-PCR. The samples were analyzed in a blinded procedure. Taking into account the non-symmetric distributions of values in both groups, statistical interferences were assessed using Bayesian techniques.*
A M_2 receptor overexpression was observed in adult and pediatric patients compared to controls. The medians [q1;q3] were 0.9 [0.3;1.9] in patients versus 0.2 [0.1;1.0] in controls; the probability that M_2 receptor expression was higher in patients than in controls (Pr[patients>controls]) was estimated at 0.99. Acetylcholinesterase expression was also increased 0.7 [0.4;1.6] in patients versus 0.4 [0.2;1.1] in controls; the probability that acetylcholinesterase expression was higher in patients than in controls (Pr[patients>controls]) was estimated at 0.97. Both in adults and children, the expression ratio of M_2 receptors over acetylcholinesterase was greater in the patient group compared with the control group.

Conclusion *- M_2 receptor overexpression has been detected in the blood of both, adults and children, exhibiting reflex syncope. As in our experimental model, i.e. rabbits with vagal overactivity, acetylcholinesterase overexpression was associated with M_2 receptor overexpression. For the first time, biological abnormalities are identified in vagal syncope in which only clinical signs are, so far, taken into account for differential diagnosis and therapeutic management. Further work will be needed to validate potential biomarkers of risk or severity associated with the cholinergic system.*

Introduction

Syncope is defined by the ACC/AHA/HRS Syncope Guideline as "an abrupt, transient, complete loss of consciousness and postural tone, secondary to inadequate cerebral perfusion"[1]. The onset of syncope is relatively rapid, and the subsequent recovery is spontaneous, complete, and relatively prompt. It is a common pathology, representing around 5% of hospital admissions, 3% of emergency unit visits[2] and 1 to 3% of pediatrics emergency department visits[3]. Despite their brief and benign nature, frequent reflex syncope can influence the quality of life of patients[4] and reflex syncope in children is a source of stress for their parents. They may be anxious and consider that their child has either stopped breathing and many will pick their child up or attempt cardiopulmonary resuscitation, or both[5].

Reflex (or neutrally-mediated) syncope is a "syncope due to a reflex that causes vasodilation, bradycardia or both"[1]. Vasovagal syncope, the most common form of reflex syncope mediated by the vasovagal reflex and associated to cerebral hypoperfusion and triggered by emotion or orthostatic stress, is usually preceded by prodromal symptoms of autonomic system activation (sweating, pallor, or nausea)[1,7]. Vagal overactivity (VO), with an inappropriate reflex implicating afferent, central, and efferent pathways, seems to be involved in the reflex syncope, particularly in vasovagal syncope[8]. The vagal nervous system is considered as having a protective role[4], balancing the sympathetic influence on the cardiac rhythm[7].

So far, no biological abnormalities were identified in reflex syncope. Our hypothesis is that biological abnormalities of the cholinergic system are associated with clinical manifestations of VO such as reflex syncope. The biological substrate of a VO could be i) exaggerated production and release of the neurotransmitter, acetylcholine; ii) abnormally high density of muscarinic M_2 receptors (M_2R) specific to acetylcholine; iii) abnormally low enzymatic inactivation of acetylcholine by the acetylcholinesterase (AchE). The dosing of acetylcholine in real time is neither easy nor reliable. That is the reason why we explored the hypothesis according to which the expression of M_2R and AchE are increased in blood of patients exhibiting reflex syncope.

Thus, in our previous translational study, abnormally high M_2R density was observed in the myocardium of rabbits presenting VO[9,10]. M_2R overexpression is most often accompanied by an unexpected increase of AchE expression or activity[10,11]. This AchE abnormality was interpreted as a possible compensatory response to M_2R overexpression. Both abnormalities were found in the white blood cells of the rabbit VO model[10]. Muscarinic receptors are expressed in lymphocytes and their mRNAs were detected in the majority of mononuclear immune cells with a significant variability among subjects[12,13]. So far, no plasma M_2R have been identified.

The present study aimed at testing whether M_2R overexpression could be associated with VO in a relatively common clinical situation, namely reflex or neutrally-mediated syncope, usually uncomfortable in adults and possibly harmful in children[14].

Methods

Study design

This study was a monocenter, pathophysiological, and comparative study. Adult patients exhibiting recurrent reflex syncope, i.e. at least 3 episodes, were compared to healthy adult volunteers. Children exhibiting reflex syncope requiring hospitalization or medical consultation were compared to hospitalized children with neither history of syncope nor cardiac pathology. The adult and children subjects were recruited from the Clinical Investigation Center, adult cardiology unit, and pediatrics unit.

Study approval

This study was performed in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki and the guidelines for Good Clinical and Laboratory Practice. The study was approved by the institutional review board of the Comité de Protection des Personnes-Est IV, Strasbourg, France and recorded in ClinicalTrials.gov (NCT01358461). The funders had no role in the design of the study, nor the collection, monitoring, analysis, or interpretation of the data, nor the writing of the report. The authors designed and conducted the study, managed the database, and wrote all drafts of the manuscript. All the authors vouch for the accuracy and completeness of the data and reported analyses, as well as for the study's adherence to the protocol.

Subjects

We recruited 136 subjects in this study at the University Hospital of Strasbourg. All subjects met the inclusion and exclusion criteria (Table 1) and completed all assessments. 83 patients with reflex syncope were compared to 53 control subjects with no current or history of syncope. Pediatric patients, 38 children; age range: [1 to 18 years], were enrolled in

pediatric unit after medical consultation for reflex syncope. 21 control children were selected in the cardio-pediatric unit after examination of medical history. 45 Adult patients [18 to 50 years] were enrolled in the cardiology unit after medical consultation for recurrent reflex syncope. 53 healthy adult volunteers were recruited for control adult group. All subjects received a financial compensation for this study.

Study endpoints

The primary endpoint was M_2R mRNA expression in the blood of adults and children exhibiting reflex syncope. The secondary endpoint was AchE mRNA blood expression.

Study assessments

The selection visit was conducted by a cardiologist, involving clinical examinations, medical history, current treatment, electrocardiogram, and echo-Doppler of carotid arteries (for subjects over 40 years of age). During the following visit, Holter electrocardiographic monitoring was carried out in all adult subjects (Supplementary material for assessment details and interpretation criteria). Holter electrocardiographic, which is usually performed in case of recurrent syncope, was considered positive (significant vagal overactivity) when rMSSD was higher than 56 milliseconds (ms) in males and 62ms in females and when PNN50 was higher than 28% in males and 29% in females[15,16]. A carotid sinus massage test (CSMT) was also performed in adult subjects. In this study the CSMT was performed by manually massaging for 5 to 10 seconds the anterior sternocleidomastoid muscle on a motorized inclination table (Genin-France) with continuous blood pressure blood monitoring (in accordance with the FinapressTM® instructions) and the heart rate (Task Force Monitor, CNS system, Graz, Austria). CSMT was suggestive of exaggerated parasympathetic activity when the heart rate reduction in response to carotid massage was greater than 10% or the mean arterial pressure decreased by more than 20% compared to the baseline[17].

Two blood samples were collected from each subject for the complete blood count and mRNA specific analysis (M_2R and AchE). For the complete blood count, 4mL of peripheral blood were sampled. Assessments were performed in the hematology laboratory of Strasbourg University Hospital. The second blood sample (2.5mL) was collected in PaxGene Blood RNA Tubes® according to Qiagen® recommendations. Total RNA was extracted automatically by QIAcube® with the PaxGene RNA kit (Qiagen®); 200ng of total RNA were reverse transcribed into cDNA, using the iScript cDNA Synthesis kit (Biorad®). Target gene expressions were measured by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) using a specific primer for the target genes: CHRM2 for M_2R and ACHE for AchE. The housekeeping gene (HKG) 18S ribosomal RNA was employed for the normalization of the expressions[18,19], the same as that used in our previous studies for the same purpose[10,11]. M_2R and AchE expressions normalized by 18S are expressed as arbitrary units (a.u.). The samples were analyzed in a blinded procedure. Detailed laboratory data are provided as supplementary material.

Statistics

The initial characteristics of patients were estimated in each group by means or proportions, depending on the nature of each variable: categorical or quantitative.

Results were expressed as median with 25 and 75 percentiles (also in box plot graphs) for continuous variables or number of individuals (and frequency) of each modality for qualitative variables. To model the studied ratio distributions, taking into account the non-symmetry in distributions in both groups, generalized linear models with Gamma distributions (with a logarithm link function) were used to model and compare values in each group. Gamma distribution deals with strictly positive yet asymmetric values, thus according less weight to extreme values. Statistical inference and risk estimations were run using Bayesian techniques[20].

For each analysis, a McMC (Markov Chain Monte Carlo) chain with 5,000 burn-in iterations and 100,000 iterations as parameters generated posterior distributions. Convergence was checked in every case. Minimally informative prior distributions were chosen as normal distribution, with zero mean and variance of ten for coefficients in regression models. Estimates for the model's coefficients have been presented as means and [95% credible interval] for each posterior distribution. The probability for a coefficient to be strictly positive (i.e., the probability of observing a positive difference between both groups) was estimated from the quantiles of posterior distribution. According to the context of this study, a probability of observing a positive effect greater than 90% was considered to be strongly relevant. All analyses were performed using R software[21].

Results

The characteristics of the study population have been presented in Table 2. All detailed results are available in supplementary material.

M_2R and AchE expression in the total population (figure 1)

The medians [q1; q3 interval] of M_2R expression level were 0.2 [0.1; 1.0] in the control group and 0.9 [0.3; 1.9] in the patient group for the total population, including children and adults. The probability that M_2R expression was greater in the patient group than in the control group was estimated at Pr[patients>controls] = 0.99 in this population (Figure 1A).

The medians of AchE expression were 0.4 [0.2; 1.1] in the control group and 0.7 [0.4; 1.6] in the patient group, with probability of superiority Pr[patients>controls] = 0.97 (figure 1B).

M_2R:AchE expression ratio (figure 1C)

The medians of the M_2R:AchE ratio were 0.8 [0.5; 1.1] in the control group and 1.1 [0.8; 1.3] in the patient group. The probability that the M_2R:AchE expression ratio was greater in the patient group than in the control group was estimated at Pr[patients>controls] = 1.00 for the total population.

Correlations

No strong correlations were found between the M_2R expression and the number of syncope (measured by the lifetime cumulative events of syncope), age of subject or gender. The same applied for AchE expression (data not shown).

M_2R and AchE mRNA expression in the adult population

When adults were analyzed separately, we found very similar results. In brief, the probability that M_2R expression was greater in the patient group 0.9 [0.1; 2.0] than in the control group 0.2 [0.1; 0.8] was estimated at Pr[patients>controls] = 0.98 (figure 2A).

The medians of AchE expression were 0.8 [0.4; 2.1] in the patient group and 0.4 [0.2; 1.1] in the control group, with a probability of superiority for the patients estimated at Pr[patients>controls] = 0.97 in the adult population (figure 2B).

M_2R:AchE expression ratio in the adult population (figure S1 in Supplementary material)

The probability that the M_2R: AchE expression ratio was greater in the patient group than in the control group was estimated at Pr[patients>controls] = 0.98 in adults. The medians were 1.1 [0.7; 1.3] and 0.8 [0.5; 0.9] in patients and controls, respectively.

Carotid sinus massage test and Holter electrocardiographic monitoring

When including the CSMT data, the results were even more pronounced. The probability that M_2R mRNA expression was greater in the patient group with positive CSMT 1.0 [0.4; 2.1] than in the control group with negative CSMT 0.1 [0.1; 1.1] was estimated at Pr[patients>controls] = 0.99. For AchE expression, this probability was estimated at Pr[patients>controls] = 0.98. The medians were 1.0 [0.5; 1.9] in the patient group (with positive CSMT) and 0.3 [0.2; 1.2] in the control group (with negative CSMT) (figure 2C and 2D).

As for the Holter electrocardiographic monitoring results, alone or with CSMT results, the probabilities were lower (detailed results in supplementary material).

M_2R and AchE mRNA expression in the pediatric population

In children, the probability that M_2R expression was greater in the patient group 1.0 [0.3; 1.6] than in the control group 0.3 [0.2; 1.1] was estimated at Pr[patients>controls] = 0.90 (figure 3A).

The medians of AchE expression were 0.7 [0.4; 1.1] in the patient group and 0.5 [0.4; 1.1] in the control group, with a probability for superiority in the patient group in the pediatric population Pr[patients>controls] = 0.74 (figure 3B).

M_2R: AchE expression ratio in the pediatric population (Figure S2 in supplementary material)

The probability that the M_2R:AchE expression ratio was greater in the patient group 1.2 [0.8; 1.6] than in the control group 1.1[0.6; 1.3] was estimated at Pr[patients>controls] = 0.97.

Discussion

M_2R mRNA was largely overexpressed in the pediatric and adult patients compared to the control subjects. These findings confirm the study's primary objective. According to our previous studies, all types of muscarinic receptors seem to be increased in blood; in this study, we focused our research in the M_2 subtype, which is mostly localized in the heart[10] and also expressed in circulating lymphocytes in particular[12,13]. AchE mRNA was also increased in patients compared to controls, although greater difference was observed in adults than in children. It is

interesting to note that in our study M_2R overexpression was assessed in blood, confirming that the muscarinic dysfunction is not restricted to the heart as previously reported[10,11]. Our results suggest that, subject to validation, M_2R overexpression could become a biological marker of VO.

The AchE enzyme degrades and inactivates acetylcholine[23]. The significant AchE overexpression observed, at least in adults, strengthens the hypothesis that this is a compensatory mechanism secondary to M_2R overexpression itself. In children, AchE was also overexpressed, albeit to a lesser extent than in adults, suggesting that the above-mentioned compensatory mechanism is not fully mature at that development stage, whereas M_2R expression abnormality occurs very early in life[11,14]. In some situations, particularly in infants, the expression of M_2R can be highly increased whereas the increase of the enzyme expression is not as important[14]; therefore, the hypothesis according to which the overexpression of the AchE could be the primary phenomenon which in turn would induce an upregulation of the M_2R can be precluded.

In our patients, the median of M_2R:AchE expression ratio was higher than in controls for the total population, as well as in adult and pediatric subpopulations. These ratio differences indicate that the increase of M_2R expression is more relevant than AchE overexpression. These results suggest that, in patients, the compensatory increase of AchE expression could be insufficient to prevent syncope. Finally, the combination of M_2R overexpression and incomplete compensation by AchE overexpression might be the mechanism behind reflex syncope, particularly the very severe equivalent of reflex syncope in infants[14].

As already mentioned in the introduction, our results do not exclude that a sympathetic dysregulation can be the primary cause of the dysfunction of the sympatho-vagal balance[24]. But our results support the hypothesis according to which VO could be the final common pathway of vagal hyperactivity.

It is important to note that two previous studies from our team, have shown that mRNA expression (qRT-PCR) and protein expression (binding experiments) follow parallel changes[10,11]. In other words, mRNA expression clearly results in protein translation in the case of M_2R proteins. Therefore, using qRT-PCR technique to assess M_2R expression was justified[22]. The same applied for mRNA and AchE expression. The qRT-PCR is an accurate and sensitive method to quantify gene expression. To reduce factors which can diminish qRT-PCR accuracy (e.g. quality of RNA, cDNA synthesis by reverse transcriptase, PCR amplification efficiencies), reference genes, known as HKG, are used as internal controls for normalizing the relative expression of target genes[18,19]. In this study, we used the 18S ribosomal gene for HKG, the same as that used previously[10,11,14]. Our previous studies have also shown a correlation between cardiac M_2R density and M_2R mRNA expression in blood, the same overexpression were found in heart and in blood[10]. Based on this background and for practical reasons, the mRNA expression was assessed in the blood of all the subjects. We took 2.5mL whole blood samples using PaxGene® tubes, containing RNA stabilizer solution,that enabled rapid and easy analysis.

Especially in the adult subjects, the blood samples were collected at different times in relation to their last syncope. In some cases, blood has been collected quite a long period afterwards. This could generate variability and thus a loss of power and sensitivity in the dosing of the expression of M_2R and AchE. Thus, the question of whether these biological abnormalities are a transient rather than a permanent process remains open. To answer this question, a longitudinal study should be conducted to assess these biological parameters at different time intervals after the last syncope.

CSMT is a functional test often used in adults with syncope of unknown origin, but possibly reflex syncope[1]. In our study, a CSMT was systematically performed in all subjects, who did not have any contraindication to assess carotid sinus hypersensitivity associated with vagal parasympathetic overactivity. As a matter of fact, the difference in M_2R expression between the two adult groups was even more significant when not only clinical criteria but also CSMT data were considered. This observation confirms that CSMT is suitable for testing VO, at least via M_2R expression assessment, whereas Holter data does not influence the difference. To homogenize our patient selection, we could have used positive CSMT as a selection criterion, in addition to clinical parameters[25]. However, no relationships between CSMT, VO, and M_2R density had previously been demonstrated. Our findings highlight such relationships and thus indicate that CSMT could be used in future studies in this domain.

Limitations

Several limitations of our study should be noted. Our results on M_2R are consistent with

a coherent pathophysiology scenario concerning reflex syncope. However, they do not exclude the involvement of other biological parameters (i.e., neuromediators such as adenosine[26, 27], receptors, enzymes, hormones). In other words, the pathophysiology of the neuro-mediated syncope might be more complex than the only overexpression of muscarinic receptors. Although there are M_2R in the arterial walls, they are mainly located in the cardiac atria and are primarily responsible for slowing the heart rate. Long lasting cardiac pauses as a consequence of the M_2R overexpression may explain syncope; M_2R are also expressed in the vascular walls[28]. Whether or not vascular M_2R overexpression may also contribute to syncope still remains to be investigated.

A quite great inter-individual variability of M_2R and AchE expression in each group was observed. This variability seems to be due to a certain inaccuracy of the clinical criteria currently used for the diagnosis of vagal syncope and consequently for the definition of the inclusion and exclusion criteria used for patient recruitment in our study. Therefore, future studies on this topic, in particular those aiming at clarifying the association between muscarinic receptor overexpression and vagal pathologies, will likely benefit from greater precision of inclusion and exclusion criteria.

Studies have shown the implication of genetic transmission in reflex syncope[29, 30]. So far, whether overexpression of M_2R or AchE might be due to genetic mutations or secondary to excessive acetylcholine release remains unexplored. A clinical study is yet ongoing to determine the role of genetics in reflex syncope.

Conclusion

In adults, as in children, M_2R overexpression appears as a hallmark of VO. Our work helps to understand the pathophysiology of VO. For the first time, biological abnormalities have been identified in pathologies in which, until now, only clinical elements were taken into account for the differential diagnosis and therapeutic management. Further work will be needed to validate potential biomarkers of risk or severity associated with the cholinergic system. This could lead to better management of reflex syncope.

These abnormalities are also observed in other human pathologies, such as sudden infant death syndrome (SIDS) or idiopathic apparent life-threatening event (iALTE)[11,14]. Ours results open the path to forthcoming studies aiming validating M_2R expression as a biological marker of these pathologies.

Supplementary material

A supplementary material is available

Funding

This work was supported by the French Ministry of Health; the National Institute of Health and Medical Research; the French Foundation for Medical Research; the French Federation of Cardiology; the French Society of Cardiology; and the University Hospital of Strasbourg.

Conflict of interest

None declared.

References

1. *Shen W, Sheldon RS, Benditt DG, Cohen MI, Forman DE, Goldberger ZD, Grubb BP, Hamdan MH, Krahn AD, Link MS, Olshansky B, Raj SR, Sandhu RK, Sorajja D, Sun BC, Yancy CW. 2017 ACC/AHA/HRS Guideline for the Evaluation and Management of Patients With Syncope: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines, and the Heart Rhythm Society. Circulation. 2017;CIR.0000000000000499, originally published March 9, 2017.*
2. *Colman N, Nahm K, Ganzeboom KS, Shen WK, Reitsma J, Linzer M, Wieling W, Kaufmann H. Epidemiology of reflex syncope. Clin Auton Res. 2004;14 Suppl 1:9-17.*
3. *Moore S, Watemberg N. Syncope is a frequently under-diagnosed condition in infants and toddlers and has similar features to those seen in adolescents and adults. Acta Paediatr. 2016 Sep;105(9):1083-7.*
4. *Grimaldi Capitello T, Fiorilli C, Placidi S, Vallone R, Drago F, Gentile S. What factors influence parents' perception of the quality of life of children and adolescents with neurocardiogenic syncope? Health Qual Life Outcomes. 2016 17;14:79.*
5. *Anand Iyer, Richard Appleton. Management of reflex anoxic seizures in children. Arch Dis Child 2013; 98:714–717.*
6. *Alboni P, Alboni M, Bertorelle G. The origin of vasovagal syncope: to protect the heart or to escape predation? Clin Auton Res. 2008;18(4):170-8.*
7. *Veltmann C, Borggrefe M, Wolpert C, Schimpf R. Evaluation and management of syncope. Minerva Cardioangiol. 2010;58(6):701–15.*
8. *Béchir M, Binggeli C, Corti R, Chenevard R, Spieker L, Ruschitzka F, Lüscher TF, Noll G. Dysfunctional Baroreflex Regulation of Sympathetic Nerve Activity in Patients With Vasovagal Syncope. Circulation. 2003;107(12):1620–5.*
9. *Livolsi A, Feldman J, Feingold J, Weiss L, Alembik Y, Sharifah-Anion IM, Fischbach M, Messer J, Bousquet P. First Model of Spontaneous Vagal Hyperreactivity and Its Mode of Genetic Transmission. Circulation. 2002;106(18):2301–4.*
10. *Livolsi A, Niederhoffer N, Dali-Youcef N, Mokni W, Olexa-Zorn C, Gies JP, Marcellin L, Feldman J, Bousquet P. Constitutive Overexpression of Muscarinic Receptors Leads to Vagal Hyperreactivity. PLoS One. 2010;5(12):e15618.*
11. *Livolsi A, Niederhoffer N, Dali-Youcef N, Rambaud C, Olexa C, Mokni W, Gies JP, Bousquet P.. Cardiac muscarinic receptor overexpression in sudden infant death syndrome. PloS One. 2010;5(3):e9464.*
12. *Tayebati SK, Codini M, Gallai V, Mannino F, Parnetti L, Ricci A, Sarchielli P, Amenta F.. Radioligand binding assay of M1-M5 muscarinic cholinergic receptor subtypes in human peripheral blood lymphocytes. J Neuroimmunol. 1999;99(2):224–9.*
13. *Hellström-Lindahl E, Nordberg A. Muscarinic receptor subtypes in subpopulations of human blood mononuclear cells as analyzed by RT-PCR technique. J Neuroimmunol. 1996;68(1–2):139–44.*
14. *Adamopoulos C, Greney H, Beutelstetter M, Bousquet P, Livolsi A. Expression of Circulating Muscarinic Receptors in Infants With Severe Idiopathic Life-Threatening Events. JAMA Pediatr. 2016;170(7):707–8.*
15. *Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Eur Heart J. 1996;17(3):354–81.*
16. *Chapleau MW, Sabharwal R. Methods of assessing vagus nerve activity and reflexes. Heart Fail Rev. 2011;16(2):109–27.*
17. *Almquist A, Gornick C, Benson W, Dunnigan A, Benditt DG. Carotid sinus hypersensitivity: evaluation of the vasodepressor component. Circulation. 1985;71(5):927–36.*
18. *Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. Methods. 2001;25(4):402–8.*
19. *Azarpeykan S, Dittmer KE. Evaluation of housekeeping genes for quantitative gene expression analysis in the equine kidney. J Equine Sci. 2016;27(4):165-168.*
20. *Lesaffre E, Lawson AB. Bayesian Biostatistics. John Wiley & Sons; 2012. 715 p.*
21. *Team RC. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2014. http://www.R-project.org/*
22. *Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Nat. Protoc. 2006. 1, 1559–1582.*

23. *Massoulié J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallette FM. Molecular and cellular biology of cholinesterases. Progress in Neurobiology. 1993;41(1), 31–91.*
24. *Lewis T. A Lecture on vasovagal syncope and the carotid sinus mechanism. Br Med J. 1932;1(3723):873–6.*
25. *Almquist A, Gornick C, Benson W, Dunnigan A, Benditt DG. Carotid sinus hypersensitivity: evaluation of the vasodepressor component. Circulation. 1985;71(5):927–36.*
26. *Joulia F, Coulange M, Desplantes A, Barberon B, Kipson N, Gerolami V, Jammes Y, Kerbaul F, Née L, Fromonot J, Bruzzese L, Michelet P, Boussuges A, Brignole M, Deharo JC, Guieu R. Purinergic profile of fainting divers is different from patients with vasovagal syncope. Int J Cardiol. 2014. 1;174(3):741-3 26.*
27. *Joulia F, Coulange M, Lemaitre F, Costalat G, Franceschi F, Gariboldi V, Nee L, Fromonot J, Bruzzese L, Gravier G, Kipson N, Jammes Y, Boussuges A, Brignole M, Deharo JC, Guieu R. Plasma adenosine release is associated with bradycardia and transient loss of consciousness during experimental breath-hold diving. Int J Cardiol. 2013. 12;168(5):e138-41.*
28. *Lamping KG, Wess J, Cui Y, Nuno DW, Faraci FM. Muscarinic (M) receptors in coronary circulation: gene-targeted mice define the role of M2 and M3 receptors in response to acetylcholine. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004 (7):1253-8. Epub 2004 May 6.*
29. *Márquez MF, Hernández-Pacheco G, Hermosillo AG, Gómez JR, Cárdenas M, Vargas-Alarcón G. The Arg389Gly beta1-adrenergic receptor gene polymorphism and susceptibility to faint during head-up tilt test. Europace, 2007, pp. 585-588.*
30. *M.Lelonek, Pietrucha T, Matyjaszczyk M, Goch JH. Mutation T/C, Ile 131 of the gene encoding the alfa subunit of the human Gs protein and predisposition to vasovagal syncope. Circ J, 2008, pp. 558-562.*

Table and figure legends

Table 1 - Detailed inclusion and exclusion criteria for enrollment in the study

Table 2 - Characteristics of the study population

**: CSMT was suggestive of exaggerated parasympathetic activity, when the heart rate reduction in response to carotid massage was greater than 10% or mean arterial pressure decreased by more than 20% compared to the baseline.*

†: A Holter test was considered positive (significant vagal activity) when rMSSD was higher than 56ms in males and 62ms in females and when PNN50 was higher than 28% in males and 29% in females.

Figure 1 - mRNA expression of muscarinic M_2 receptors (M_2R), acetylcholinesterase (AchE) and ratio of M_2R/AchE mRNA expression in the total population (on log-scale)

***A**: Medians of mRNA M_2R expression with 25 and 75 percentiles in box plots based on 136 subject data, along with the probability that M_2R expression is greater in the patient group than the control group [Pr(patients>controls)], estimated from the posterior distribution in regression models. Statistical interferences were assessed using Bayesian techniques.*

***B:** Medians of mRNA AchE expression with 25 and 75 percentiles in box plots based on136 subject data, and the probability that AchE expression is greater in the patient group than the control group [Pr(patients>controls)], estimated from the posterior distribution in regression models. Statistical interferences were assessed using Bayesian techniques.*

***C:** Medians of the mRNA M_2R:AchE expression ratio with 25 and 75 percentiles in box plots based on 136 subject data, and the probability that M_2R expression is greater in the patient group than the control group [Pr(patients>controls)], estimated from the posterior distribution in regression models. Statistical interferences were assessed using Bayesian techniques.*

Figure 2 - Expressions of M_2R and AchE in the adult population (on log-scale)

***A**: Medians of mRNA M_2R expression with 25 and 75 percentiles in box plots based on 83 adult data, along with the probability that M_2R expression is greater in the patient group than the control group [Pr(patients>controls)], estimated from the posterior distribution in regression models. Statistical interferences were assessed using Bayesian techniques.*

***B**: Medians of mRNA AchE expression with 25 and 75 percentiles in box plots based on 83 adult data, and the probability that AchE expression is greater in the patient group than the control group [Pr(patients>controls)], estimated from the posterior distribution in regression models. Statistical interferences were assessed using Bayesian techniques.*

***C**: Medians of mRNA M_2R expression with 25 and 75 percentiles in box plots based on 83 adult data, along with the probability that M_2R expression is greater in the patient group than the control group [Pr(patients>controls)], estimated from the posterior distribution in regression models. The results of the Carotid Sinus Massage Test (CSMT) are considered: CSMT(-) for a negative test and CSMT (+) for a positive test. Statistical interferences were assessed using Bayesian techniques.*

***D**: Medians of mRNA AchE expression with 25 and 75 percentiles in box plots based on 83 adult data, and the probability that AchE expression is greater in the patient group than the control group [Pr(patients>controls)], estimated from the posterior distribution in regression models. The results of the Carotid Sinus Massage Test (CSMT) are considered: CSMT(-) for a negative test and CSMT (+) for a positive test. Statistical interferences were assessed using Bayesian techniques.*

Figure 3 – Expressions of M_2R and AchE in the pediatric population (on log-scale)

***A**: Medians of mRNA M_2R expression with 25 and 75 percentiles in box plots based on 53 pediatric data, along with the probability that M_2R expression is greater in the patient group than the control group [Pr(patients>controls)], estimated from the posterior distribution in regression models. Statistical interferences were assessed using Bayesian techniques.*

***B**: Medians of mRNA AchE expression with 25 and 75 percentiles in box plots based on 53 pediatric data, and the probability that AchE expression is greater in the patient group than the control group [Pr(patients>controls)], estimated from the posterior distribution in regression models. Statistical interferences were assessed using Bayesian techniques.*

Table 1- Detailed inclusion and exclusion criteria for the enrollment in the study

	Inclusion criteria	***Exclusion criteria***
Adult patients	*Men or women aged 18 to 50* *Patients with clinical signs of recurrent reflex syncope (>3 episodes)* *Normal electrocardiogram* *Normal blood count* *No contraindication for the carotid sinus massage test in carotid Doppler echography* *Non-smoking or occasional smoking (<3 per day)*	*Cardiovascular, neurological, psychiatric, immunologic, infectious or metabolic diseases* *Dysautonomia* *Ongoing treatment targeting the autonomic nervous system* *Consumption of doping agents or addiction (cocaine, cannabis, amphetamines, alcohol…)* *Consumption of tobacco, coffee, within the 24 hours before the clinical and laboratory investigations* *Pregnancy or breastfeeding*
Adult controls	*Men or women aged 18 to 50* *No history of reflex syncope or cardiac diseases* *Normal electrocardiogram* *Normal blood count* *No contraindication for the carotid sinus massage test in carotid Doppler echography* *Non-smoking or occasional smoking (<3 per day)*	
Pediatric patients	*Males or females aged 1 to 17* *Patients with clinical signs of reflex syncope requiring hospitalization or medical consultation* *Normal electrocardiogram* *Normal blood count* *Non-smoking or occasional smoking (<3 per day)*	
Pediatric controls	*Males or females aged 1 to 17* *No history of reflex syncope or cardiac diseases* *Normal electrocardiogram* *Normal blood count* *Non-smoking or occasional smoking (<3 per day)*	

Table 2 - Characteristics of the study population

		Patients		Controls	
		Adults	**Children**	**Adults**	**Children**
Number of subjects		45	38	32	21
Total		83		53	
Number of subjects by gender	**Females**	38	20	12	8
	Total	58		20	
	Males	7	18	20	13
	Total	25		33	
Age in inclusion (mean +/- SEM years)		27·3 ± 8·6	8·8 ± 4·8	24·8 ± 5·4	7·7 ± 3·6
Total (mean +/- SEM years)		18·9 ± 11·7		18·0 ± 9·7	
Carotid Sinus Massage Test	**Positive***	34	NA	8	NA
	Negative	10		24	
Holter electrocardiographic monitoring	**Positive†**	16	NA	6	NA
	Negative	28		26	

SEM: standard error of the mean

Figure 1 - mRNA expression of muscarinic M_2 receptors (M_2R), acetylcholinesterase (AchE) and ratio of M2R/AchE mRNA expression in the total population (on log-scale)

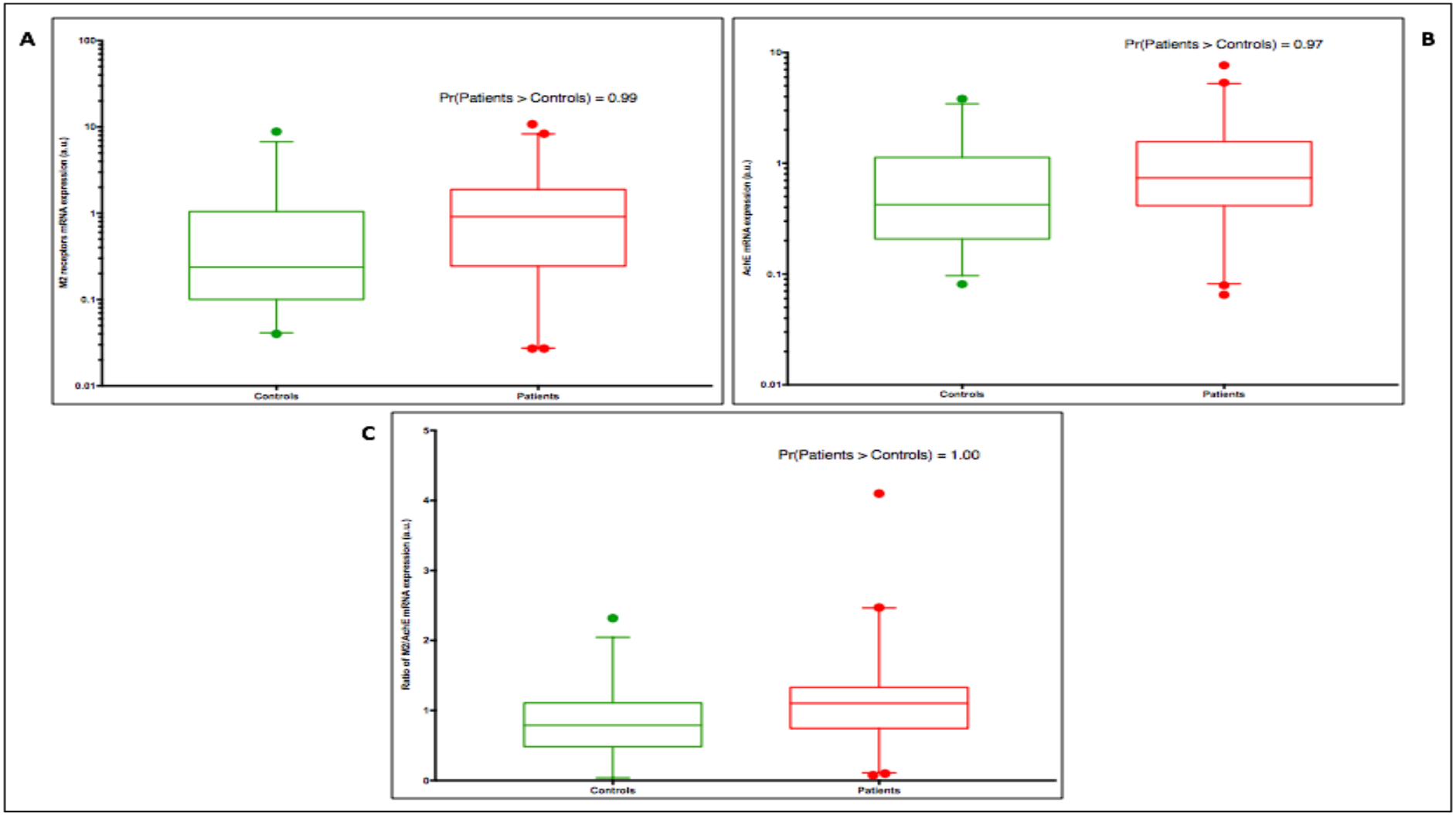


Figure 2 - Expressions of M_2R and AchE in the adult population (on log-scale)

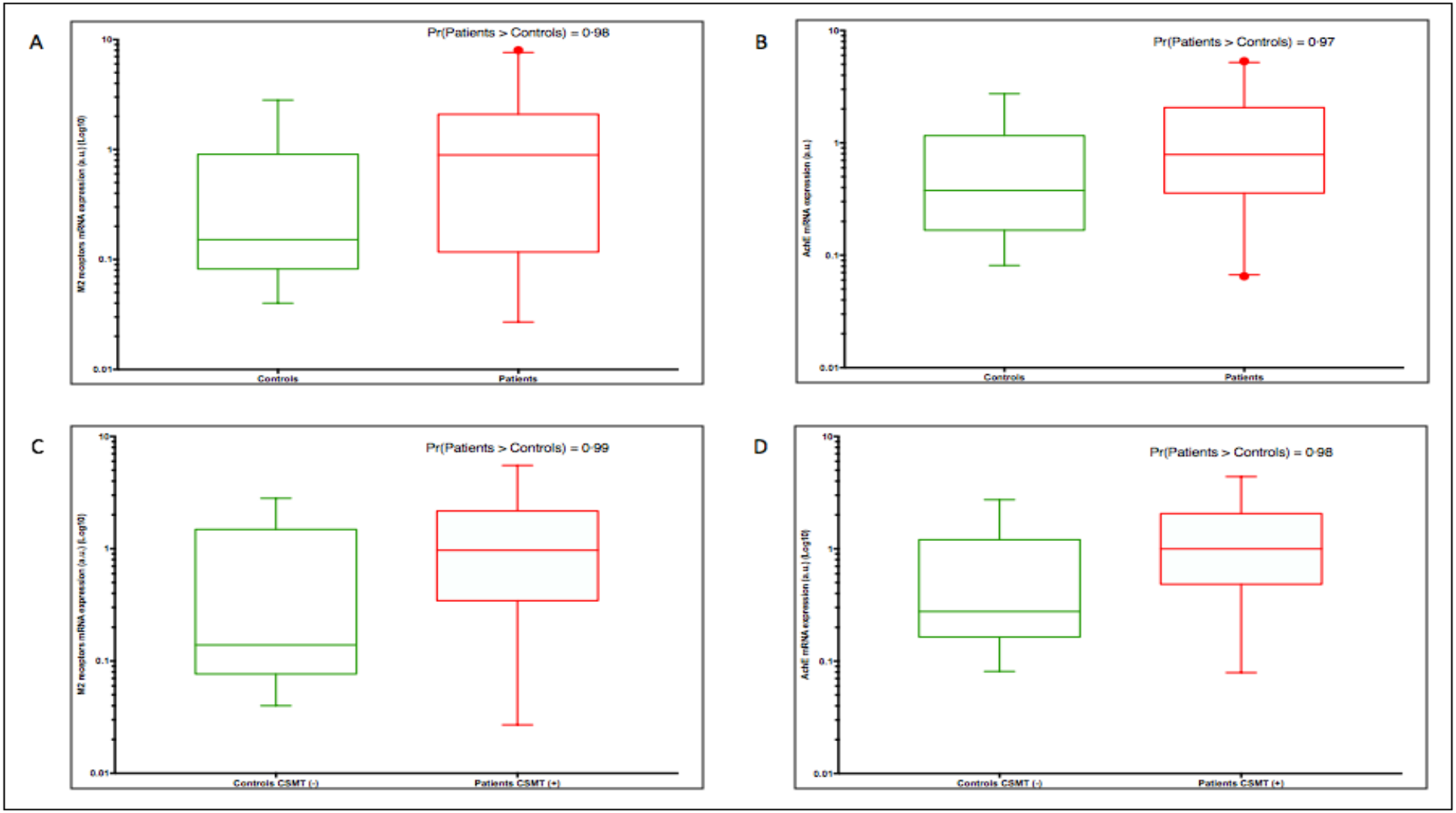
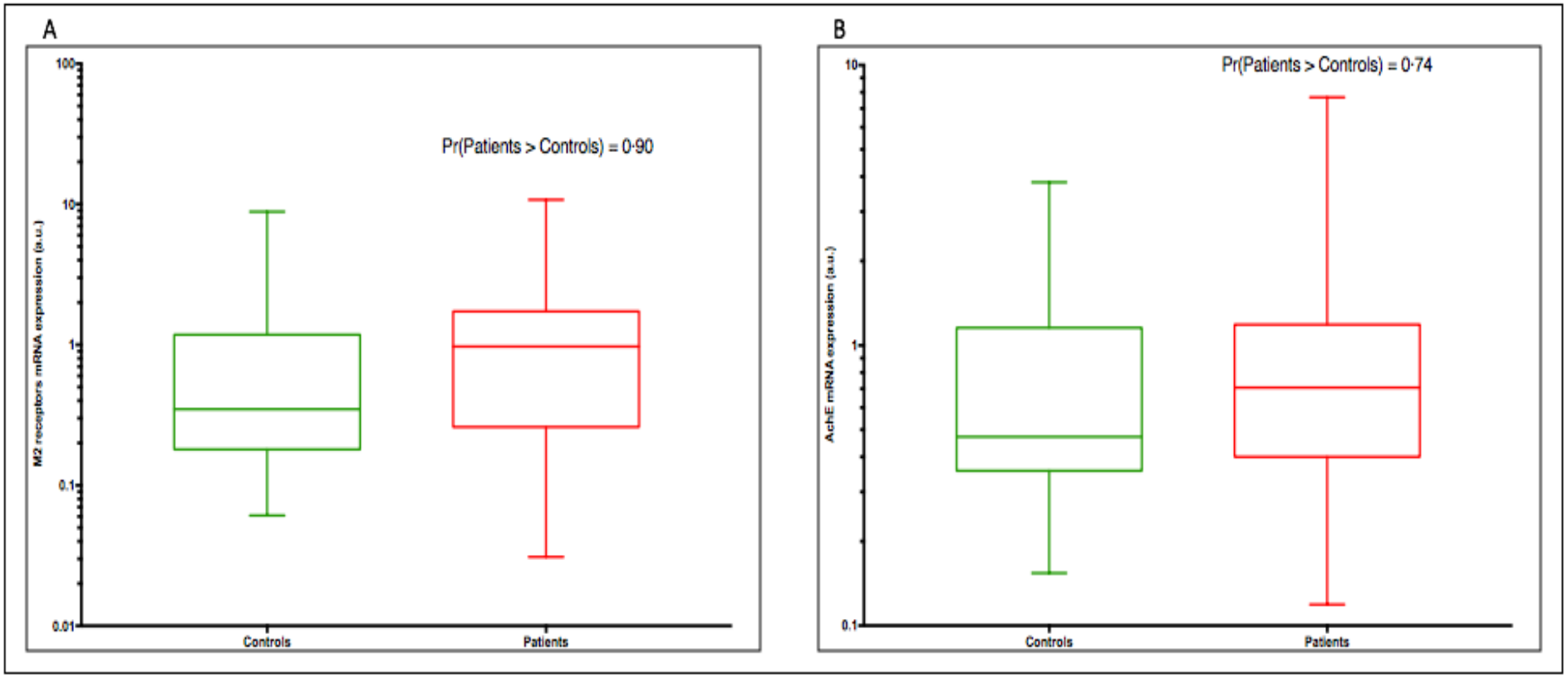


Figure 3 – Expressions of M_2R and AchE in the pediatric population (on log-scale)



SUPPLEMENTARY MATERIAL

This appendix has been provided by the authors to give readers additional information about their work

Supplement to:

REFLEX SYNCOPE: OVEREXPRESSION OF CIRCULATING MUSCARINIC RECEPTORS

Reflex syncope and blood muscarinic receptors

STUDY OVERSIGHT

Investigators

***Dr. Angelo LIVOLSI**, **coordinator investigator**, Unit of Cardiopediatrics, University Hospitals of Strasbourg, Strasbourg, France.*

***Pr. Pascal BOUSQUET**, associated investigator, Laboratory of Neurobiology and Cardiovascular Pharmacology, Federation of Translational Medicine, EA 7296, University of Strasbourg, Strasbourg, France.*

***Dr. Pauline HELMS**, associated investigator, Unit of Cardiopediatrics, University Hospitals of Strasbourg, Strasbourg, France.*

Dr. Catherine SCHMIDT-MUTTER**, associated investigator, Center of Clinical Investigation INSERM 1434, University Hospitals of Strasbourg, Strasbourg, France**.

***Pr. Gerald ROUL**, associated investigator, Unit of Cardiology, University Hospitals of Strasbourg, Strasbourg, France.*

***Dr. Florian ZORES**, associated investigator, Unit of Cardiology, University Hospitals of Strasbourg, Strasbourg, France.*

Authors (exhaustive list and affiliation)

Maxime BEUTELSTETTER*, *Center of Clinical Investigation INSERM 1434, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France.*

Angelo LIVOLSI*, *M.D., Unit of Cardiopediatrics, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France.*

***Hugues GRENEY**, Ph.D., Laboratory of Neurobiology and Cardiovascular Pharmacology, Federation of Translational Medicine, EA 7296, University of Strasbourg, Strasbourg, France.*

***Pauline HELMS**, M.D., Unit of Cardiopediatrics, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France.*

Catherine SCHMIDT-MUTTER,** M.D., Ph.D., Center of Clinical Investigation INSERM 1434, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France**.

***Charlie DE MELO**, M.D., Unit of Neonatal Intensive Care, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France.*

***Gérald ROUL**, M.D., Ph.D., Unit of Cardiology, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France.*

***Florian ZORES**, M.D., Specialized Medical Group – The Premium, Strasbourg, France.*

***Alexandre BOLLE,** Pharm.D., Center of Clinical Investigation INSERM 1434, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France.*

***Nassim DALI-YOUCEF**, Pharm.D., Ph.D., Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France. IGBMC, Department of Functional Genomics and Cancer, Illkirch, France.*

***Magali BEAUGEY**, Laboratory of Neurobiology and Cardiovascular Pharmacology, Federation of Translational Medicine, EA 7296, University of Strasbourg, Strasbourg, France.*

***Alban SIMON,** Center of Clinical Investigation INSERM 1434, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France.*

***Nathalie NIEDERHOFFER**, Ph.D., Laboratory of Neurobiology and Cardiovascular Pharmacology, Federation of Translational Medicine, EA 7296, University of Strasbourg, Strasbourg, France.*

***Jacques REGNARD**, M.D., Ph.D., Physiology-Functional Explorations, Regional University Hospital of Besançon, Besançon, France.*

***Malika BOUHADDI**, M.D., Ph.D., Physiology-Functional Explorations, Regional University Hospital of Besançon, Besançon, France.*

***Chris ADAMOPOULOS**, M.D., Ph.D., Unit of Cardiopediatrics, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France.*

***Mickael SCHAEFFER**, Department of Public Health, methods in clinical research, University of Strasbourg, Strasbourg, France.*

***Erik SAULEAU**, M.D., Ph.D., Department of Public Health, methods in clinical research, University of Strasbourg, Strasbourg, France.*

***Pascal BOUSQUET**, M.D., Ph.D., Laboratory of Neurobiology and Cardiovascular Pharmacology, Federation of Translational Medicine, EA 7296, University of Strasbourg, Strasbourg, France.*

****: First co-authors, equal contribution.***

ADDITIONAL METHODOLOGY DETAILS

Study assessments

Holter:

The Holter electrocardiographic monitoring with assessment of sinus variability (SV) is currently used as the most relevant assessment in studies on severe vagal syncopes in infant and adult. The SV represents the physiological variations of the RR intervals (between 2 QRS), reflecting the influence of vago-sympathic balance on the sinus node. The data of sinus variability are studied in accordance to the European Society of Cardiology and the North American Society of Stimulation and Electrophysiology (1). The indices reflecting the vagal activity in the time domain are primarily the square root of the difference of consecutive normal RR intervals (rMSSD express in ms) and the percentage of consecutive normal RR intervals differing by more than 50ms (PNN50n express in %). Therefore, we considered positive test (important vagal activity), results higher than 10% compared to reference values, i.e., rMSSD > 56ms in males and > 62ms in females; PNN50 > 28% in males and > 29% in females[1,2,3].

[1]: Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Circulation 1996 ; 93 : 1 043-65.
[2]: J. Sztajzel, M. Jung, A. Bayes de Luna : Reproducibility and Gender-Related Differences of Heart Rate Variability during All-Day Activity in Young Men and Women. Ann Noninvasive Electrocardiol 2008; 13 : 270 – 277.
[3]: MW. Chapleau and R. Sabharwal : Methods of assessing vagus nerve activity and reflexes. Heart Fail Rev . 2010. DOI 10.1007/s10741-010-9174-6.

Carotid Sinus Massage Test:

The Carotid Sinus Massage Test (CSMT) is currently used for the differential diagnosis between carotid sinus hypersensitivity and convulsive syncopes. In this study the CSMT was performed by manually massaging for 5 to 10 seconds the anterior sternocleidomastoid muscle on a motorized inclination table (Genin-France) with continue blood pressure blood monitoring (in accordance with the FinapressTM instructions) and the heart rate (Task Force Monitor, CNSsytem, Graz, Austria). We considered responses as suggestive of exaggerated parasympathetic activity when reduction of heart rate was greater than 10% and/or arterial pressure decreased by more than 20% compared to the baseline[4, 5,6,7,8].

[4]: Brignole M, Alboni P, Benditt D, Bergfeldt L, Blanc JJ, Bloch Thomsen PE, et al. : Guidelines on management (diagnosis and treatment) of syncope. Eur Heart J 2001; 22: 1256e306.
[5]: Almquist A, Gornick CC, Benson Jr DW, Dunnigan A, Benditt DG. : Carotid sinus hypersensitivity : evaluation of the vaso-depressor component. Circulation 1985; 71 : 927e37.
[6]: Kenny RA, Richardson DA, Steen N, Bexton RS, Shaw FE, Bond J. Carotid sinus syndrome: a modifiable risk factor for nonaccidental falls in older adults (SAFE PACE). J Am Coll Cardiol 2001 ; 38 : 1491e6.
[7]: Benchimol M. and Oliveira-Souza R. : Diagnostic Relevance of the Carotid Sinus Massage During a Head Up Tilt Table Test (HUTT). Arq Bras Cardiol 2008; 90 : 264 - 267.
[8]: Sture Bevegard B., Shepherd J. T. : Circulatory effects of stimulating the carotid arterial stretch receptors in man at rest and during exercise. J Clin Investigation 1966 ; 45 : 133 – 142.

Genes sequences for mRNA expression assessments:

M_2 receptor gene (CHRM2):
***F**: AAGACCCCGTTTCTCCAAGT - **R**: GAGGCAACAGCACTGACTGA*

AchE gene (ACHE):
***F**: TGGAACCCCAACCGTGAG - **R**: GTAGAAGCCACCCCCATAGA.*

Housekeeping gene 18S ribosomal RNA (18S):
***F**: CCTGCGGCTTAATTTGACTC – **R**: ATGCCAGAGTCTCGTTCGTT*

The RT-qPCR is an accurate and sensitive method to quantify gene expression. To reduce factors which can diminish RT-qPCR accuracy (e.g. quality of RNA, cDNA synthesis by reverse transcriptase, PCR amplification efficiencies), reference genes, known as housekeeping genes (HKGs), are used as internal controls for normalizing the relative expression of target genes. In this study, we are used the 18S ribosomal gene for HKG, the same than that which has be used for the previous studies in rabbits and SIDS [9, 10,11].

[9]: Livolsi A, Niederhoffer N, Dali-Youcef N, Rambaud C, Olexa C, Mokni W, et al. Cardiac muscarinic receptor overexpression in sudden infant death syndrome. PloS One. 2010;5(3):e9464.

[10]: Livolsi A, Niederhoffer N, Dali-Youcef N, Mokni W, Olexa-Zorn C, Gies J-P, et al. Constitutive Overexpression of Muscarinic Receptors Leads to Vagal Hyperreactivity. PLoS ONE [Internet]. 22 déc 2010 [cité 27 oct 2015];5(12).

[11]: Adamopoulos C, Greney H, Beutelstetter M, Bousquet P, Livolsi A. Expression of Circulating Muscarinic Receptors in Infants With Severe Idiopathic Life-Threatening Events. JAMA Pediatr. 2016;170(7):707‑8.

DETAILED DATA OF ALL SUBJECTS

Subject number *1xxx: children 2xxx: adults*	***Groupe*** *patient (p) control (c)*	***Age*** *(years)*	***Sexe*** *female (F) male (M)*	***CSMT***	***Holter***	***M2*** *(a.u.)*	***AchE*** *(a.u.)*	***M2/AchE*** *(a.u.)*
1001	*c*	*4*	*F*	*	*	*0,188*	*0,171*	*1,100*
1002	*p*	*10*	*M*	*	*	*8,338*	*7,677*	*1,086*
1003	*p*	*3*	*M*	*	*	*0,211*	*0,420*	*0,502*
1009	*p*	*8*	*F*	*	*	*1,221*	*0,915*	*1,335*
1010	*p*	*3*	*M*	*	*	*0,050*	*0,165*	*0,301*
1011	*p*	*4*	*F*	*	*	*0,267*	*0,292*	*0,912*
1013	*p*	*13*	*M*	*	*	*1,004*	*0,523*	*1,918*
1014	*c*	*10*	*F*	*	*	*1,285*	*0,892*	*1,441*
1016	*p*	*17*	*F*	*	*	*1,885*	*1,553*	*1,214*
1017	*p*	*3*	*F*	*	*	*1,787*	*0,735*	*2,430*
1020	*c*	*8*	*F*	*	*	*0,349*	*0,472*	*0,741*
1021	*p*	*12*	*F*	*	*	*0,534*	*0,680*	*0,784*
1023	*p*	*16*	*M*	*	*	*1,452*	*0,848*	*1,711*
1026	*p*	*2*	*M*	*	*	*1,230*	*1,022*	*1,204*
1027	*p*	*1*	*M*	*	*	*0,261*	*0,119*	*2,189*
1028	*p*	*13*	*F*	*	*	*0,676*	*0,533*	*1,268*
1030	*p*	*12*	*M*	*	*	*5,721*	*3,960*	*1,445*
1031	*p*	*5*	*F*	*	*	*0,031*	*0,122*	*0,253*
1033	*p*	*8*	*F*	*	*	*0,258*	*0,336*	*0,768*
1034	*p*	*6*	*F*	*	*	*0,178*	*0,464*	*0,384*
1035	*p*	*9*	*M*	*	*	*0,931*	*0,975*	*0,955*
1037	*p*	*9*	*M*	*	*	*1,186*	*1,095*	*1,083*
1038	*p*	*15*	*F*	*	*	*0,938*	*0,447*	*2,097*
1039	*p*	*2*	*M*	*	*	*0,230*	*0,340*	*0,677*
1040	*p*	*2*	*F*	*	*	*3,507*	*1,818*	*1,929*
1041	*p*	*10*	*M*	*	*	*0,064*	*0,137*	*0,465*
1044	*p*	*5*	*F*	*	*	*1,271*	*1,062*	*1,197*
1045	*p*	*15*	*M*	*	*	*5,904*	*4,471*	*1,321*
1047	*c*	*10*	*F*	*	*	*0,355*	*0,393*	*0,903*
1048	*p*	*11*	*F*	*	*	*1,108*	*1,034*	*1,072*
1050	*p*	*8*	*F*	*	*	*1,708*	*1,461*	*1,170*
1053	*p*	*9*	*F*	*	*	*0,244*	*0,649*	*0,375*
1054	*p*	*15*	*M*	*	*	*0,169*	*0,554*	*0,305*
1059	*p*	*10*	*F*	*	*	*1,207*	*0,738*	*1,637*
1064	*c*	*2*	*M*	*	*	*1,076*	*0,700*	*1,536*
1066	*c*	*4*	*M*	*	*	*0,235*	*0,423*	*0,555*
1069	*c*	*8*	*M*	*	*	*0,234*	*0,206*	*1,137*
1071	*c*	*11*	*M*	*	*	*0,156*	*0,357*	*0,437*
1072	*c*	*13*	*F*	*	*	*1,063*	*0,791*	*1,343*
1074	*p*	*13*	*M*	*	*	*1,317*	*0,813*	*1,620*
1075	*c*	*2*	*F*	*	*	*1,566*	*1,058*	*1,480*
1077	*c*	*17*	*M*	*	*	*0,172*	*0,154*	*1,119*
1078	*c*	*7*	*F*	*	*	*0,243*	*0,354*	*0,688*
1079	*p*	*13*	*M*	*	*	*0,336*	*0,293*	*1,147*
1080	*c*	*7*	*M*	*	*	*8,858*	*3,819*	*2,320*
1084	*c*	*5*	*M*	*	*	*0,061*	*1,603*	*0,038*
1085	*p*	*1*	*M*	*	*	*2,203*	*2,744*	*0,803*
1086	*p*	*13*	*F*	*	*	*0,863*	*0,210*	*4,099*

1087	c	13	M	*	*	0,207	0,857	0,242
1088	p	14	F	*	*	0,818	0,514	1,592
1089	p	14	F	*	*	0,286	0,555	0,515
1090	p	3	F	*	*	10,757	4,355	2,470
1092	c	4	M	*	*	0,076	2,002	0,038
1093	c	6	M	*	*	0,541	0,357	1,515
1094	p	9	M	*	*	2,477	1,966	1,260
1095	c	8	M	*	*	0,413	0,366	1,128
1097	c	6	M	*	*	0,142	0,359	0,396
1098	c	7	M	*	*	1,394	1,326	1,051
1099	c	9	F	*	*	1,574	1,254	1,255
2001	c	34	M	Negative	Negative	2,816	2,737	1,029
2003	c	29	M	Negative	Negative	0,480	0,494	0,971
2004	c	22	F	Positive	Negative	0,466	0,610	0,764
2005	c	41	F	Negative	Negative	2,065	2,062	1,002
2007	p	18	M	Negative	Positive	2,357	2,179	1,082
2009	c	24	F	Negative	Negative	0,073	0,158	0,461
2010	c	27	M	Positive	Negative	1,031	1,373	0,751
2011	c	26	M	Positive	Negative	0,472	0,643	0,734
2012	c	22	M	Positive	Negative	0,082	0,362	0,225
2013	c	26	M	Positive	Negative	0,534	0,649	0,822
2031	p	46	M	Positive	Negative	2,632	4,393	0,599
2033	c	42	F	Negative	Negative	0,075	1,066	0,070
2035	c	25	F	Negative	Negative	0,069	0,081	0,849
2036	c	23	M	Negative	Negative	0,094	0,177	0,533
2037	c	25	M	Negative	Positive	0,965	1,274	0,757
2038	c	21	M	Negative	Positive	2,144	1,962	1,093
2039	c	24	M	Negative	Negative	0,082	0,158	0,520
2040	p	39	F	Positive	Negative	0,397	0,444	0,896
2042	c	19	M	Negative	Negative	0,040	0,209	0,191
2045	c	20	F	Negative	Negative	0,126	0,126	1,006
2047	p	29	F	Negative	Negative	8,016	5,332	1,504
2050	c	25	M	Negative	Positive	0,059	0,164	0,359
2051	c	24	M	Negative	Negative	0,602	0,684	0,881
2052	p	26	F	Positive	Negative	0,119	0,224	0,530
2053	p	21	F	Positive	Negative	5,514	4,227	1,305
2054	p	23	F	Negative	Positive	0,089	0,252	0,351
2055	c	23	F	Negative	Negative	2,561	1,882	1,361
2056	p	24	F	Positive	Negative	1,579	1,143	1,382
2057	c	23	F	Negative	Negative	0,085	0,145	0,587
2058	p	39	M	Positive	Negative	2,958	2,055	1,439
2059	p	23	F	Negative	Negative	0,027	0,133	0,205
2061	p	32	F	Positive	Negative	3,107	2,329	1,334
2064	p	40	M	Negative	Negative	0,041	0,414	0,099
2065	c	23	M	Negative	Positive	0,128	0,277	0,462
2066	p	37	F	Negative	Negative	0,112	0,202	0,557
2067	c	20	M	Negative	Negative	0,140	0,277	0,505
2068	c	18	M	Negative	Positive	1,682	1,207	1,393
2069	c	30	M	Negative	Negative	0,138	0,164	0,845
2070	c	23	M	Negative	Negative	0,728	0,849	0,858
2071	c	22	F	Negative	Negative	0,163	0,224	0,727
2072	c	21	M	Positive	Positive	0,107	0,183	0,585
2073	c	23	M	Negative	Negative	1,658	1,193	1,390
2074	p	20	F	Positive	Positive	2,017	1,606	1,256
2075	p	31	F	Negative	Negative	1,944	2,239	0,868

2076	*c*	*21*	*F*	*Negative*	*Negative*	*0,049*	*0,164*	*0,301*
2077	*c*	*22*	*F*	*Positive*	*Negative*	*0,238*	*0,301*	*0,790*
2078	*c*	*26*	*F*	*Positive*	*Negative*	*0,043*	*0,393*	*0,108*
2080	*p*	*20*	*F*	*Negative*	*Positive*	*0,765*	*0,578*	*1,325*
2083	*p*	*21*	*F*	*Negative*	*Negative*	*0,887*	*0,566*	*1,568*
2085	*p*	*26*	*M*	*Positive*	*Positive*	*0,111*	*0,240*	*0,461*
2086	*p*	*18*	*F*	*Positive*	*Negative*	*0,797*	*0,679*	*1,174*
2087	*p*	*28*	*F*	*Positive*	*Negative*	*1,123*	*1,104*	*1,018*
2089	*p*	*23*	*F*	*Positive*	*Positive*	*1,026*	*0,804*	*1,276*
2090	*p*	*19*	*F*	*Positive*	*Negative*	*0,084*	*0,079*	*1,068*
2091	*p*	*34*	*F*	*Positive*	*Negative*	*0,893*	*0,656*	*1,362*
2092	*p*	*21*	*F*	*Positive*	*Positive*	*0,915*	*0,704*	*1,301*
2093	*p*	*48*	*F*	*Positive*	*Positive*	*3,546*	*2,873*	*1,234*
2094	*p*	*26*	*F*	*Positive*	*Negative*	*0,188*	*0,300*	*0,626*
2095	*p*	*25*	*M*	**	**	*0,079*	*0,065*	*1,220*
2096	*p*	*23*	*F*	*Positive*	*Positive*	*2,170*	*2,630*	*0,825*
2099	*p*	*48*	*F*	*Negative*	*Negative*	*0,820*	*0,753*	*1,089*
2101	*p*	*22*	*F*	*Positive*	*Positive*	*1,455*	*1,084*	*1,342*
2102	*p*	*23*	*F*	*Positive*	*Positive*	*0,870*	*0,788*	*1,104*
2104	*p*	*20*	*M*	*Positive*	*Positive*	*1,879*	*1,569*	*1,198*
2105	*p*	*25*	*F*	*Positive*	*Negative*	*1,416*	*1,421*	*0,996*
2106	*p*	*22*	*F*	*Positive*	*Negative*	*0,857*	*0,916*	*0,935*
2107	*p*	*24*	*F*	*Positive*	*Negative*	*1,332*	*1,423*	*0,936*
2109	*p*	*24*	*F*	*Positive*	*Negative*	*2,501*	*2,062*	*1,213*
2111	*p*	*28*	*F*	*Positive*	*Positive*	*0,115*	*0,154*	*0,744*
2112	*p*	*39*	*F*	*Positive*	*Negative*	*3,360*	*2,856*	*1,177*
2113	*p*	*19*	*M*	*Positive*	*Negative*	*0,693*	*0,521*	*1,330*
2114	*p*	*23*	*F*	*Positive*	*Positive*	*0,579*	*0,496*	*1,167*
2115	*p*	*22*	*F*	*Positive*	*Negative*	*0,050*	*0,163*	*0,310*
2116	*p*	*25*	*F*	*Positive*	*Negative*	*2,185*	*2,154*	*1,014*
2118	*p*	*21*	*F*	*Positive*	*Negative*	*0,041*	*0,534*	*0,076*
2119	*p*	*45*	*F*	*Positive*	*Positive*	*0,908*	*1,085*	*0,837*
2121	*p*	*19*	*F*	*Positive*	*Positive*	*0,027*	*0,105*	*0,258*

Table S1. Detailed data of all subjects

Subject number: 1xxx = pediatric population, 2xxx = adult population
Groupe: p=patient group, c=control group
Age: age in enrollment
Sexe: F=female, M=male
M2: value of M_2 receptors expression (a.u.)
AchE: value of AchE expression (a.u.)
M2/AchE: value of ratio of M_2 and AchE expressions (a.u.)
**: Not applicable*
***: Not done*

SUPPLEMENTARY DETAILED RESULTS

Descriptive analyzes

Variables	*Group*	*N*	*Min*	*Q1*	*Median*	*Mean*	*Q3*	*Max*	*SD*	*IQR*
Age	***Patient***	*83*	*1.0*	*10.0*	*19.0*	*18.9*	*24.5*	*48.0*	*11.6*	*14.5*
	Control	*53*	*2.0*	*8.0*	*21.0*	*18.0*	*24.0*	*42.0*	*9.7*	*16.0*
M_2	***Patient***	*83*	*0.0*	*0.3*	*0.9*	*1.5*	*1.9*	*10.8*	*1.9*	*1.6*
	Control	*53*	*0.0*	*0.1*	*0.2*	*0.8*	*1.0*	*8.9*	*1.3*	*0.9*
AchE	***Patient***	*83*	*0.1*	*0.4*	*0.7*	*1.2*	*1.6*	*7.7*	*1.4*	*1.1*
	Control	*53*	*0.1*	*0.2*	*0.4*	*0.8*	*1.1*	*2.3*	*0.8*	*0.9*
M_2/AchE	***Patient***	*83*	*0.1*	*0.8*	*1.1*	*1.1*	*1.3*	*4.1*	*0.6*	*0.6*
	Control	*53*	*0.0*	*0.5*	*0.8*	*0.8*	*1.1*	*2.3*	*0.5*	*0.6*

Table S2. Detailed results of descriptive analyzes for the total population

Variables:
- *Age: Age of subjects in years*
- *M_2: value of M_2 receptors expression*
- *AchE: value of AchE expression*
- *M_2/AchE: value of ratio of M_2 and AchE expressions*

N: number of subject in each group
Min: minimum value for each variable
Q1: first quartile for each variable
Median: estimated numeric median value for each variable
Mean: estimated numeric mean value for each variable
Q3: third quartile for each variable
Max: maximum value for each variable
SD: standard deviation for each variable
IQR: interquartile range for each variable

Variables	*Group*	*N*	*Min*	*Q1*	*Median*	*Mean*	*Q3*	*Max*	*SD*	*IQR*
Age	***Patient***	*45*	*18.0*	*21.0*	*24.0*	*27.3*	*31.0*	*48.*	*8.6*	*10.0*
	Control	*32*	*18.0*	*22.0*	*23.0*	*24.8*	*26.0*	*42.0*	*5.4*	*4.0*
M_2	***Patient***	*45*	*0.0*	*0.1*	*0.9*	*1.4*	*2.0*	*8.0*	*1.6*	*1.9*
	Control	*32*	*0.0*	*0.1*	*0.2*	*0.6*	*0.8*	*2.8*	*0.8*	*0.7*
AchE	***Patient***	*45*	*0.1*	*0.4*	*0.8*	*1.3*	*2.1*	*5.3*	*1.2*	*1.6*
	Control	*32*	*0.1*	*0.2*	*0.4*	*0.7*	*1.1*	*2.7*	*0.7*	*0.9*
M_2/AchE	***Patient***	*45*	*0.1*	*0.7*	*1.1*	*1.0*	*1.3*	*1.6*	*0.4*	*0.5*
	Control	*32*	*0.1*	*0.5*	*0.8*	*0.7*	*0.9*	*1.4*	*0.3*	*0.4*

Table S3. Detailed results of descriptive analyzes for the adult population

Variables:
- *Age: Age of subjects in years*
- *M_2: value of M_2 receptors expression*
- *AchE: value of AchE expression*
- *M_2/AchE: value of ratio of M_2 and AchE expressions*

N: number of subject in each group
Min: minimum value for each variable
Q1: first quartile for each variable
Median: estimated numeric median value for each variable
Mean: estimated numeric mean value for each variable
Q3: third quartile for each variable
Max: maximum value for each variable
SD: standard deviation for each variable
IQR: interquartile range for each variable

Variables	Group	N	Min	Q1	Median	Mean	Q3	Max	SD	IQR
Age	Patient CSMT+	34	18.0	21.2	24.0	26.9	28.0	48.0	8.3	6.8
	Control CSMT-	24	18.0	21.8	23.0	25.1	25.0	42.0	6.1	3.2
M_2	Patient CSMT+	34	0.0	0.4	1.0	1.4	2.1	5.5	1.3	1.7
	Control CSMT-	24	0.0	0.1	0.1	0.7	1.1	2.8	0.9	1.1
AchE	Patient CSMT+	34	0.1	0.5	1.0	1.3	1.9	4.4	1.1	1.4
	Control CSMT-	24	0.1	0.2	0.3	0.7	1.2	2.7	0.8	1.0
M_2/AchE	Patient CSMT+	34	0.1	0.8	1.1	1.0	1.3	1.4	0.4	0.4
	Control CSMT-	24	0.1	0.5	0.8	0.8	1.0	1.4	0.4	0.5

Table S4. Detailed results of descriptive analyzes for the total population, including the Carotid Sinus Massage Test

Variables:
- *Age: Age of subjects in years*
- *M_2: value of M_2 receptors expression*
- *AchE: value of AchE expression*
- *M_2/AchE: value of ratio of M_2 and AchE expressions*

N: number of subject in each group
Min: minimum value for each variable
Q1: first quartile for each variable
Median: estimated numeric median value for each variable
Mean: estimated numeric mean value for each variable
Q3: third quartile for each variable
Max: maximum value for each variable
SD: standard deviation for each variable
IQR: interquartile range for each variable

Variables	Group	N	Min	Q1	Median	Mean	Q3	Max	SD	IQR
Age	Patient	38	1.0	4.2	9.0	8.8	13.0	17.0	4.8	8.8
	Control	21	2.0	5.0	7.0	7.7	10.0	17.0	3.8	5.0
M_2	Patient	38	0.0	0.3	1.1	1.6	1.6	10.8	2.3	1.4
	Control	21	0.1	0.2	0.3	1.0	1.1	8.9	1.9	0.9
AchE	Patient	38	0.1	0.4	0.7	1.2	1.1	7.7	1.5	0.7
	Control	21	0.2	0.4	0.5	0.9	1.1	3.8	0.8	0.7
M_2/AchE	Patient	38	0.3	0.8	1.2	1.2	1.6	4.1	0.8	0.8
	Control	21	0.0	0.6	1.1	1.0	1.3	2.3	0.6	0.8

Table S5. Detailed results of descriptive analyzes for the pediatric population

Variables:
- *Age: Age of subjects in years*
- *M_2: value of M_2 receptors expression*
- *AchE: value of AchE expression*
- *M_2/AchE: value of ratio of M_2 and AchE expressions*

N: number of subject in each group
Min: minimum value for each variable
Q1: first quartile for each variable
Median: estimated numeric median value for each variable
Mean: estimated numeric mean value for each variable
Q3: third quartile for each variable
Max: maximum value for each variable
SD: standard deviation for each variable
IQR: interquartile range for each variable

Inferential analyzes

	Mean	Sd	2.5%	25%	50%	75%	97.5%
pat conm	0.38	0.15	0.09	0.28	0.38	0.48	0.68
RR pat conm	1.48	0.23	1.09	1.32	1.46	1.62	1.98
Prob pat conm	0.99	0.07	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Table S6. Detailed results of inferential analyzes of M_2 receptors expression for the total population

***pat conm**: variables; pat=patients, conm=controls modality (reference for the estimation)*
***RR pat conm**: relative risk associated with the variable pat (patient) compared to the reference conm (controls modality)*
***Prob pat conm**: probability that the relative risk RR is higher in pat (patients) compared to the reference conm (controls modality)*

Summary of the posterior distribution (McMC) of each parameter:
***Mean:** mean of the distribution*
***Sd:** standard deviation of the distribution*
***2.5%:** 2.5th percentile of the distribution*
***25%:** 25th percentile of the distribution*
***50%:** 50th percentile or median of the distribution*
***75%:** 75th percentile of the distribution*
***97.5%:** 97.5th percentile of the distribution*

	mean	sd	2.5%	25%	50%	75%	97.5%
pat conm	0.26	0.14	-0.00	0.17	0.26	0.35	0.53
RR pat conm	1.31	0.18	1.00	1.18	1.29	1.42	1.70
Prob pat conm	0.97	0.16	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Table S7. Detailed results of inferential analyzes of Acetylcholinesterase expression for the total population

***pat conm**: variables; pat=patients, conm=controls modality (reference for the estimation)*
***RR pat conm**: relative risk associated with the variable pat (patient) compared to the reference conm (controls modality)*
***Prob pat conm**: probability that the relative risk RR is higher in pat (patients) compared to the reference conm (controls modality)*

Summary of the posterior distribution (McMC) of each parameter:
***Mean:** mean of the distribution*
***Sd:** standard deviation of the distribution*
***2.5%:** 2.5th percentile of the distribution*
***25%:** 25th percentile of the distribution*
***50%:** 50th percentile or median of the distribution*
***75%:** 75th percentile of the distribution*
***97.5%:** 97.5th percentile of the distribution*

	mean	sd	2.5%	25%	50%	75%	97.5%
pat conm	0.30	0.10	0.10	0.23	0.30	0.37	0.50
RR pat conm	1.36	0.14	1.10	1.26	1.35	1.45	1.66
Prob pat conm	1.00	0.04	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Table S8. Detailed results of inferential analyzes of M_2 receptors: Acetylcholinesterase expressions ratio for the total population

***pat conm**: variables; pat=patients, conm=controls modality (reference for the estimation)*
***RR pat conm**: relative risk associated with the variable pat (patient) compared to the reference conm (controls modality)*
***Prob pat conm**: probability that the relative risk RR is higher in pat (patients) compared to the reference conm (controls modality)*

Summary of the posterior distribution (McMC) of each parameter:
***Mean:** mean of the distribution*
***Sd:** standard deviation of the distribution*
***2.5%:** 2.5th percentile of the distribution*
***25%:** 25th percentile of the distribution*
***50%:** 50th percentile or median of the distribution*
***75%:** 75th percentile of the distribution*
***97.5%:** 97.5th percentile of the distribution*

	mean	sd	2.5%	25%	50%	75%	97.5%
pat conm	0.42	0.20	0.03	0.29	0.42	0.56	0.82
RR pat conm	1.56	0.32	1.03	1.33	1.53	1.75	2.28
Prob pat conm	0.98	0.13	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Table S9. Detailed results of inferential analyzes of M_2 receptors expression for the adult population

***pat conm**: variables; pat=patients, conm=controls modality (reference for the estimation)*
***RR pat conm**: relative risk associated with the variable pat (patient) compared to the reference conm (controls modality)*
***Prob pat conm**: probability that the relative risk RR is higher in pat (patients) compared to the reference conm (controls modality)*

Summary of the posterior distribution (McMC) of each parameter:
***Mean:** mean of the distribution*
***Sd:** standard deviation of the distribution*
***2.5%:** 2.5th percentile of the distribution*
***25%:** 25th percentile of the distribution*
***50%:** 50th percentile or median of the distribution*
***75%:** 75th percentile of the distribution*
***97.5%:** 97.5th percentile of the distribution*

	mean	sd	2.5%	25%	50%	75%	97.5%
pat conm	0.34	0.18	-0.01	0.22	0.34	0.46	0.70
RR pat conm	1.43	0.26	0.99	1.25	1.40	1.59	2.02
Prob pat conm	0.97	0.17	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Table S10. Detailed results of inferential analyzes of AchE expression for the adult population

***pat conm**: variables; pat=patients, conm=controls modality (reference for the estimation)*
***RR pat conm**: relative risk associated with the variable pat (patient) compared to the reference conm (controls modality)*
***Prob pat conm**: probability that the relative risk RR is higher in pat (patients) compared to the reference conm (controls modality)*

Summary of the posterior distribution (McMC) of each parameter:
***Mean:** mean of the distribution*
***Sd:** standard deviation of the distribution*
***2.5%:** 2.5th percentile of the distribution*
***25%:** 25th percentile of the distribution*
***50%:** 50th percentile or median of the distribution*
***75%:** 75th percentile of the distribution*
***97.5%:** 97.5th percentile of the distribution*

	mean	sd	2.5%	25%	50%	75%	97.5%
pat conm	0.27	0.13	0.03	0.19	0.27	0.36	0.52
RR pat conm	1.32	0.17	1.03	1.21	1.31	1.43	1.69
Prob pat conm	0.98	0.12	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Table S11. Detailed results of inferential analyzes of M_2 receptors: Acetylcholinesterase expressions ratio for the adult population

***pat conm**: variables; pat=patients, conm=controls modality (reference for the estimation)*
***RR pat conm**: relative risk associated with the variable pat (patient) compared to the reference conm (controls modality)*
***Prob pat conm**: probability that the relative risk RR is higher in pat (patients) compared to the reference conm (controls modality)*

Summary of the posterior distribution (McMC) of each parameter:
***Mean:** mean of the distribution*
***Sd:** standard deviation of the distribution*
***2.5%:** 2.5th percentile of the distribution*
***25%:** 25th percentile of the distribution*
***50%:** 50th percentile or median of the distribution*
***75%:** 75th percentile of the distribution*
***97.5%:** 97.5th percentile of the distribution*

	mean	sd	2.5%	25%	50%	75%	97.5%
pat conm	0.52	0.23	0.07	0.36	0.52	0.67	0.97
RR pat conm	1.72	0.40	1.07	1.44	1.68	1.95	2.65
Prob pat conm	0.99	0.11	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Table S12. Detailed results of inferential analyzes of M_2 receptors expression for the adult population, including the Carotid Sinus Massage Test

***pat conm**: variables; pat=patients, conm=controls modality (reference for the estimation)*
***RR pat conm**: relative risk associated with the variable pat (patient) compared to the reference conm (controls modality)*
***Prob pat conm**: probability that the relative risk RR is higher in pat (patients) compared to the reference conm (controls modality)*

Summary of the posterior distribution (McMC) of each parameter:
***Mean:** mean of the distribution*
***Sd:** standard deviation of the distribution*
***2.5%:** 2.5th percentile of the distribution*
***25%:** 25th percentile of the distribution*
***50%:** 50th percentile or median of the distribution*
***75%:** 75th percentile of the distribution*
***97.5%:** 97.5th percentile of the distribution*

	mean	sd	2.5%	25%	50%	75%	97.5%
pat conm	0.44	0.21	0.04	0.30	0.43	0.57	0.84
RR pat conm	1.58	0.33	1.03	1.34	1.54	1.78	2.33
Prob pat conm	0.98	0.13	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Table S13. Detailed results of inferential analyzes of Acetylcholinesterase expression for the adult population, including the Carotid Sinus Massage Test

***pat conm**: variables; pat=patients, conm=controls modality (reference for the estimation)*
***RR pat conm**: relative risk associated with the variable pat (patient) compared to the reference conm (controls modality)*
***Prob pat conm**: probability that the relative risk RR is higher in pat (patients) compared to the reference conm (controls modality)*

Summary of the posterior distribution (McMC) of each parameter:
***Mean:** mean of the distribution*
***Sd:** standard deviation of the distribution*
***2.5%:** 2.5th percentile of the distribution*
***25%:** 25th percentile of the distribution*
***50%:** 50th percentile or median of the distribution*
***75%:** 75th percentile of the distribution*
***97.5%:** 97.5th percentile of the distribution*

	mean	sd	2.5%	25%	50%	75%	97.5%
pat conm	0.52	0.26	0.00	0.35	0.53	0.70	1.03
RR pat conm	1.75	0.46	1.00	1.42	1.69	2.02	2.81
Prob pat conm	0.97	0.16	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Table S14. Detailed results of inferential analyzes of M_2 receptors expression for the adult population, including the HolterTest

***pat conm**: variables; pat=patients, conm=controls modality (reference for the estimation)*
***RR pat conm**: relative risk associated with the variable pat (patient) compared to the reference conm (controls modality)*
***Prob pat conm**: probability that the relative risk RR is higher in pat (patients) compared to the reference conm (controls modality)*

Summary of the posterior distribution (McMC) of each parameter:
***Mean:** mean of the distribution*
***Sd:** standard deviation of the distribution*
***2.5%:** 2.5th percentile of the distribution*
***25%:** 25th percentile of the distribution*
***50%:** 50th percentile or median of the distribution*
***75%:** 75th percentile of the distribution*
***97.5%:** 97.5th percentile of the distribution*

	mean	sd	2.5%	25%	50%	75%	97.5%
pat conm	0.37	0.23	-0.10	0.22	0.37	0.52	0.81
RR pat conm	1.48	0.34	0.91	1.24	1.45	1.69	2.26
Prob pat conm	0.94	0.24	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Table S15. Detailed results of inferential analyzes of Acetylcholinesterase expression for the adult population, including the Holter Test

***pat conm**: variables; pat=patients, conm=controls modality (reference for the estimation)*
***RR pat conm**: relative risk associated with the variable pat (patient) compared to the reference conm (controls modality)*
***Prob pat conm**: probability that the relative risk RR is higher in pat (patients) compared to the reference conm (controls modality)*

Summary of the posterior distribution (McMC) of each parameter:
***Mean:** mean of the distribution*
***Sd:** standard deviation of the distribution*
***2.5%:** 2.5th percentile of the distribution*
***25%:** 25th percentile of the distribution*
***50%:** 50th percentile or median of the distribution*
***75%:** 75th percentile of the distribution*
***97.5%:** 97.5th percentile of the distribution*

	mean	sd	2.5%	25%	50%	75%	97.5%
pat conm	0.55	0.28	-0.03	0.37	0.56	0.74	1.08
RR pat conm	1.80	0.50	0.97	1.44	1.75	2.09	1.98
Prob pat conm	0.99	0.07	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Table S16. Detailed results of inferential analyzes of M_2 receptors expression for the adult population, including the Carotid Sinus Massage Test and Holter Test

***pat conm**: variables; pat=patients, conm=controls modality (reference for the estimation)*
***RR pat conm**: relative risk associated with the variable pat (patient) compared to the reference conm (controls modality)*
***Prob pat conm**: probability that the relative risk RR is higher in pat (patients) compared to the reference conm (controls modality)*

Summary of the posterior distribution (McMC) of each parameter:
***Mean:** mean of the distribution*
***Sd:** standard deviation of the distribution*
***2.5%:** 2.5th percentile of the distribution*
***25%:** 25th percentile of the distribution*
***50%:** 50th percentile or median of the distribution*
***75%:** 75th percentile of the distribution*
***97.5%:** 97.5th percentile of the distribution*

	mean	sd	2.5%	25%	50%	75%	97.5%
pat conm	0.42	0.28	-0.13	0.24	0.42	0.61	0.95
RR pat conm	1.58	0.44	0.88	1.27	1.53	1.83	2.58
Prob pat conm	0.94	0.25	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Table S17. Detailed results of inferential analyzes of Acetylcholinesterase expression for the adult population, including the Carotid Sinus Massage Test and Holter Test

***pat conm**: variables; pat=patients, conm=controls modality (reference for the estimation)*
***RR pat conm**: relative risk associated with the variable pat (patient) compared to the reference conm (controls modality)*
***Prob pat conm**: probability that the relative risk RR is higher in pat (patients) compared to the reference conm (controls modality)*

Summary of the posterior distribution (McMC) of each parameter:
***Mean:** mean of the distribution*
***Sd:** standard deviation of the distribution*
***2.5%:** 2.5th percentile of the distribution*
***25%:** 25th percentile of the distribution*
***50%:** 50th percentile or median of the distribution*
***75%:** 75th percentile of the distribution*
***97.5%:** 97.5th percentile of the distribution*

	mean	sd	2.5%	25%	50%	75%	97.5%
pat conm	0.30	0.24	-0.15	0.14	0.30	0.46	0.78
RR pat conm	1.40	0.34	0.86	1.15	1.35	1.59	2.18
Prob pat conm	0.90	0.29	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Table S18. Detailed results of inferential analyzes of M_2 receptors expression for the pediatric population

***pat conm**: variables; pat=patients, conm=controls modality (reference for the estimation)*
***RR pat conm**: relative risk associated with the variable pat (patient) compared to the reference conm (controls modality)*
***Prob pat conm**: probability that the relative risk RR is higher in pat (patients) compared to the reference conm (controls modality)*

Summary of the posterior distribution (McMC) of each parameter:
***Mean:** mean of the distribution*
***Sd:** standard deviation of the distribution*
***2.5%:** 2.5th percentile of the distribution*
***25%:** 25th percentile of the distribution*
***50%:** 50th percentile or median of the distribution*
***75%:** 75th percentile of the distribution*
***97.5%:** 97.5th percentile of the distribution*

	mean	sd	2.5%	25%	50%	75%	97.5%
pat conm	0.13	0.21	-0.26	-0.01	0.13	0.27	0.55
RR pat conm	1.17	0.25	0.77	0.99	1.14	1.31	1.73
Prob pat conm	0.74	0.44	0.00	0.00	1.00	1.00	1.00

Table S19. Detailed results of inferential analyzes of Acetylcholinesterase expression for the pediatric population

***pat conm**: variables; pat=patients, conm=controls modality (reference for the estimation)*
***RR pat conm**: relative risk associated with the variable pat (patient) compared to the reference conm (controls modality)*
***Prob pat conm**: probability that the relative risk RR is higher in pat (patients) compared to the reference conm (controls modality)*

Summary of the posterior distribution (McMC) of each parameter:
***Mean:** mean of the distribution*
***Sd:** standard deviation of the distribution*
***2.5%:** 2.5th percentile of the distribution*
***25%:** 25th percentile of the distribution*
***50%:** 50th percentile or median of the distribution*
***75%:** 75th percentile of the distribution*
***97.5%:** 97.5th percentile of the distribution*

	mean	sd	2.5%	25%	50%	75%	97.5%
pat conm	0.32	0.17	-0.01	0.21	0.32	0.43	0.66
RR pat conm	1.40	0.24	0.99	1.23	1.38	1.54	1.94
Prob pat conm	0.97	0.16	0.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Table S20. Detailed results of inferential analyzes of M_2 receptors: Acetylcholinesterase expressions ratio for the pediactric population

***pat conm**: variables; pat=patients, conm=controls modality (reference for the estimation)*
***RR pat conm**: relative risk associated with the variable pat (patient) compared to the reference conm (controls modality)*
***Prob pat conm**: probability that the relative risk RR is higher in pat (patients) compared to the reference conm (controls modality)*

Summary of the posterior distribution (McMC) of each parameter:
***Mean:** mean of the distribution*
***Sd:** standard deviation of the distribution*
***2.5%:** 2.5th percentile of the distribution*
***25%:** 25th percentile of the distribution*
***50%:** 50th percentile or median of the distribution*
***75%:** 75th percentile of the distribution*
***97.5%:** 97.5th percentile of the distribution*

SUPPLEMENTARY FIGURES (WITH LEGENDS)

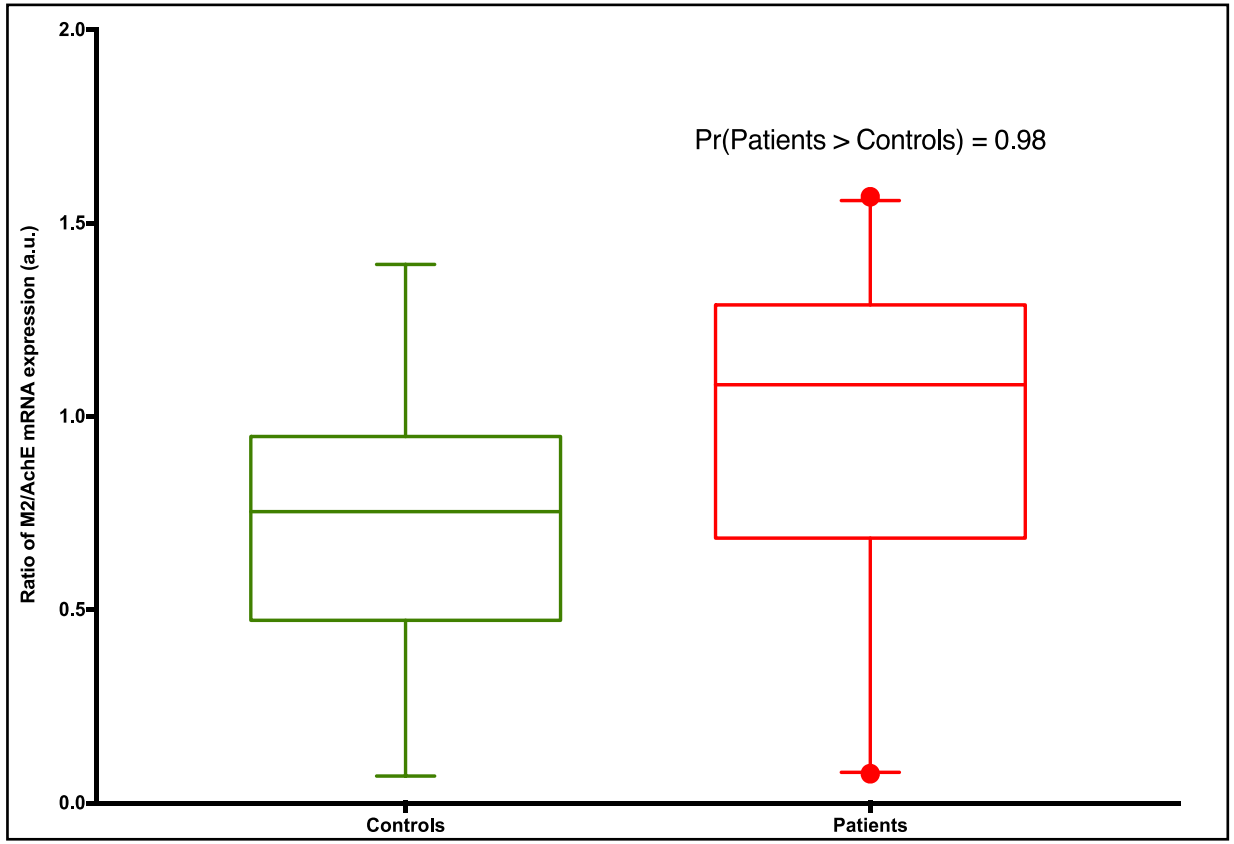


Figure S1 – M_2R:AchE expressions ratios in the adult population

Medians of ratio of mRNA M_2R:AchE expressions with 25 and 75 percentiles in box plots based on all subject data, and the probability that this ratio is greater in the patients group than in the control group [Pr(patients>controls)] estimated from the posterior distribution in regression models

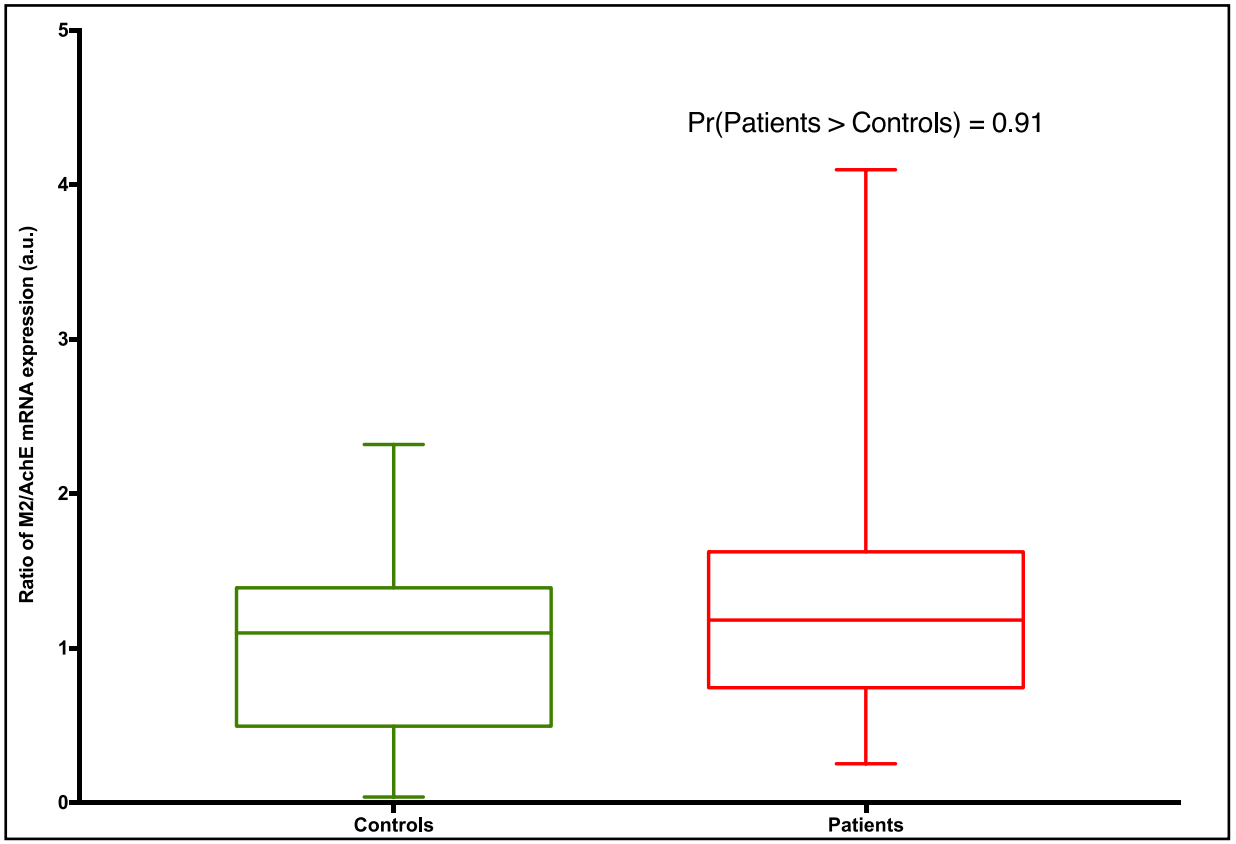


Figure S2 – M_2R:AchE expressions ratios in the pediatric population

Medians of ratio of mRNA M_2R:AchE expressions with 25 and 75 percentiles in box plots based on all subject data, and the probability that this ratio is greater in the patients group than in the control group [Pr(patients>controls)] estimated from the posterior distribution in regression models

PARTIE 2

ANOMALIES MUSCARINIQUES ET MALAISES IDIOPATHIQUES DU NOURRISSON

Contexte

Chez l'enfant de moins d'un an, la survenue d'un malaise constitue un motif fréquent d'hospitalisation en réanimation ou aux urgences pédiatriques. Ces malaises sévères du nourrisson suscitent une grande angoisse dans les familles qui décrivent une impression de mort imminente. Ils sont définis par « The National Institutes of Health Consensus Development Conference on Infantile Apnoea and Home Monitoring » comme « un épisode choquant pour l'observateur et qui se caractérise par une combinaison d'apnée (centrale ou occasionnellement obstructive), de changement de couleur (généralement cyanotique ou pâleur) et de changement marqué du tonus musculaire ». On utilise aujourd'hui le terme anglais de « Apparent Life Threatening Events ou ALTE » pour parler de ces malaises. Ce terme remplace celui de « mort subite rattrapée », qui implique une relation trop étroite entre ces malaises sévères et la MSN (McGovern and Smith, 2004). La prévalence des ALTEs est estimée entre 0,6 et 2,4 pour mille naissances et représenterait 0,6 à 0,8% des consultations aux services des urgences pédiatriques (pour les enfants de moins de 1 an) (Wennergren *et al.*, 1987; Kiechl-Kohlendorfer *et al.*, 2005).

A l'heure actuelle, la prise en charge des malaises sévères inexpliqués du nourrisson reste limitée aux manœuvres de réanimation et au suivi médicalement assisté. Les pédiatres sont donc démunis devant ces situations d'urgence par défaut de prise en charge spécifique. Une hospitalisation se discute en fonction des cas mais il est préférable d'hospitaliser ces nourrissons pendant au moins 24h pour un monitoring cardiorespiratoire, un complément de recherche étiologique, si nécessaire, et une gestion de l'anxiété de la famille. Certains facteurs de risque imposent l'hospitalisation :

- âge inférieur à 1 mois
- antécédent de prématurité
- répétition des malaises
- examen clinique anormal
- cyanose

Durant l'hospitalisation une prise en charge spécifique de l'enfant doit être entreprise rapidement afin d'évaluer la gravité du malaise, faire un bilan étiologique et mettre en place un traitement adapté si nécessaire ou une surveillance en prévention de complications. Les investigations systématiquements réquises sont répertoriées dans le tableau 7.

Examen pratiqué	Variables recueillies
Signes vitaux à l'admission	pression artérielle ; fréquence cardiaque ; température
Examen clinique à l'admission	poids ; taille ; signes post-malaise
Radiographie du thorax	inhalation ; anomalie de la silhouette trachéale
ECG	allongement QT ; ischémie ; trouble du rythme
Bilan sanguin	hématies hémoglobine hématocrite plaquettes leucocytes neutrophiles eosinophiles basophiles lymphocytes monocytes glucose Na+ K+ HCO3- Ca2+ urée créatinine clairance créatinine ASAT ALAT CRP CPK

Tableau 7. Examens systématiques lors de l'hospitalisation d'un nourrisson présentant un malaise sévère inexpliqué.

Ces cas de malaises sévères inexpliqués peuvent avoir comme origines une grande diversité de causes possibles, ce qui rend la prise en charge du nourrisson extrêmement exigeante. Seules des investigations cliniques et biologiques

approfondies et minutieuses peuvent permettre de retrouver une étiologie à ces malaises. Les hypothèses diagnostiques les plus fréquentes sont :

- les reflux gastro-œsophagiens,
- les apnées obstructives,
- les douleurs aiguës,
- les troubles convulsifs,
- les infections respiratoires,
- autres : intoxication au monoxyde de carbone, méningo-encéphalite, …

D'après les dernières études, entre 30 et 50% des cas de ALTE demeurent inexpliqués et sans diagnostic malgré les investigations cliniques, on parle alors de « idopathic ALTE ou iALTE » (Kiechl-Kohlendorfer *et al.*, 2005). Dans la majorité de ces cas, le contexte est évocateur d'une origine vagale, puisque de nombreux malaises surviennent lors de pleurs, d'une douleur aiguë ou de stress, autant d'événements connus pour stimuler le parasympathique (Lurie and Benditt, 1996). Comme chez l'adulte, les mécanismes physiopathologiques sont mal connus. Aucune anomalie biologique éventuellement associée, pathognomonique de tels malaises n'a été décrite à ce jour. L'implication de la composante parasympathique de l'arc baroréflexe dans les malaises vagaux est invoquée depuis longtemps, mais les données tant cliniques que biologiques, sont parcellaires et contradictoires (Sapoznikov *et al.*, 2010). La notion d'une prédominance vagale du baroréflexe chez le nouveau-né et l'enfant a été avancée mais jamais démontrée (Benditt *et al.*, 1998; Lucet *et al.*, 2000; Shojaei-Brosseau *et al.*, 2003).

Dans ces conditions, il n'existe pas de marqueur de risque biologique associé à cette pathologie. Bien que la relation entre les malaises inexpliqués du jeune enfant et la MSN reste controversée (Naud, 2015), le système cholinergique semble être impliqué dans le mécanisme pathophysiologie des 2 situations cliniques (Kinney *et al.*, 1995; Dick and Ford, 2009; Livolsi *et al.*, 2010b).

Dans cette étude, nous avons analysé l'expression des ARNm circulants (dans le sang total) des RM_2 chez des enfants de moins d'un an présentant un malaise sévère inexpliqué. De plus, nous avons également analysé l'expression sanguine des ARNm de l'AchE chez ces mêmes enfants.

Méthodes

Nous avons inclus 26 enfants de moins d'un an au cours de l'étude précédente, sur les malaises vagaux. Ces nourrissons ont été analysés séparément des autres sujets de l'étude (adultes et enfants de plus d'un an). Parmi ces nourrissons, 17 ont été inclus pour un ou des malaise(s) inexpliqué(s), supposé(s) d'origine vagale. Ils avaient été intégrés dans le groupe « malaises vagaux » lors de l'étude précédente. Après leur inclusion, des investigations cliniques ont été menées afin de déterminer la cause de ce malaise. Cette recherche étiologique inclut au minimum un examen clinique approfondi avec un relevé des signes vitaux, une radiographie du thorax, un ECG et un bilan biologique complet (numération de formule sanguine, ionogramme, bilan rénal et hépatique). Les autres examens complémentaires dépendent de l'orientation diagnostique. Cela a permis de classer ces enfants en 2 groupes : 12 dans le groupe « ALTE » pour ceux pour lesquels nous avons identifié une cause du malaise, et 5 dans le groupe « iALTE » lorsque qu'aucune étiologie n'a été identifiée. Les causes retrouvées étaient les suivantes : 1 malformation congénitale de la trachée, 1 obstruction des voies respiratoires, 1 infection sévère (coqueluche), 4 reflux gastro-intestinaux sévères, 4 crises épileptiques et 1 trouble du rythme cardiaque. Un 3ème groupe contrôle a été constitué avec les 9 nourrissons sains et qui ne présentaient pas d'antécédents personnels ou familiaux de ALTE ou de MSN.

Comme pour les autres sujets de l'étude précédente, ces nourrissons ont été prélevés sur tube PAXgene® afin d'analyser l'expression des ARNm circulants des RM_2 et de l'AchE. Le protocole d'analyse est le même que pour l'étude précédente. Durant toute l'étude, les échantillons ont été analysés en aveugle de leur situation clinique (ALTE, iALTE ou contrôle).

L'analyse statistique a été réalisée avec des tests non paramétriques de Mann-Whitney. Une différence statistiquement significative s'exprime avec une valeur de $p<0,05$.

Résultats

Les caractéristiques de base des groupes sont résumées dans le tableau 7.

Groupes / Caractéristiques	Contrôle (n=9)	ALTE (n=12)	iALTE (n=5)
	Moyenne (SD)		
Age (mois)	3,2 (1,2)	3,1 (1,1)	2,8 (1,4)
Sexe masculin	6	7	3
Poids de naissance (g)	3192 (399)	2996 (468)	3542 (424)
Age gestationnel (semaines)	38 (0,5)	37 (1,8)	38 (0,4)
Score APGAR à 5min après la naissance	9,5 (0,5)	9,5 (0,4)	9,6 (0,5)
Prématuré	0	2	0

Tableau 8. Résumé des caractéristiques de base à l'inclusion des enfants.

Expression des ARNm circulants des RM_2

Les médianes d'expression des ARNm des RM_2 circulants ne sont pas significativement différentes entre le groupe contrôle (0,19 [range, 0,02-1,30]) et le groupe ALTE (0,13 [range, 0,01-0,65]), p=0,70. En revanche, l'expression sanguine des RM_2 est significativement augmentée dans le groupe iALTE (11,73 [range, 3,32-16,35]) par rapport aux deux autres groupes, p<0,001. Ces résultats sont représentés dans sur la figure 38 ci-dessous.

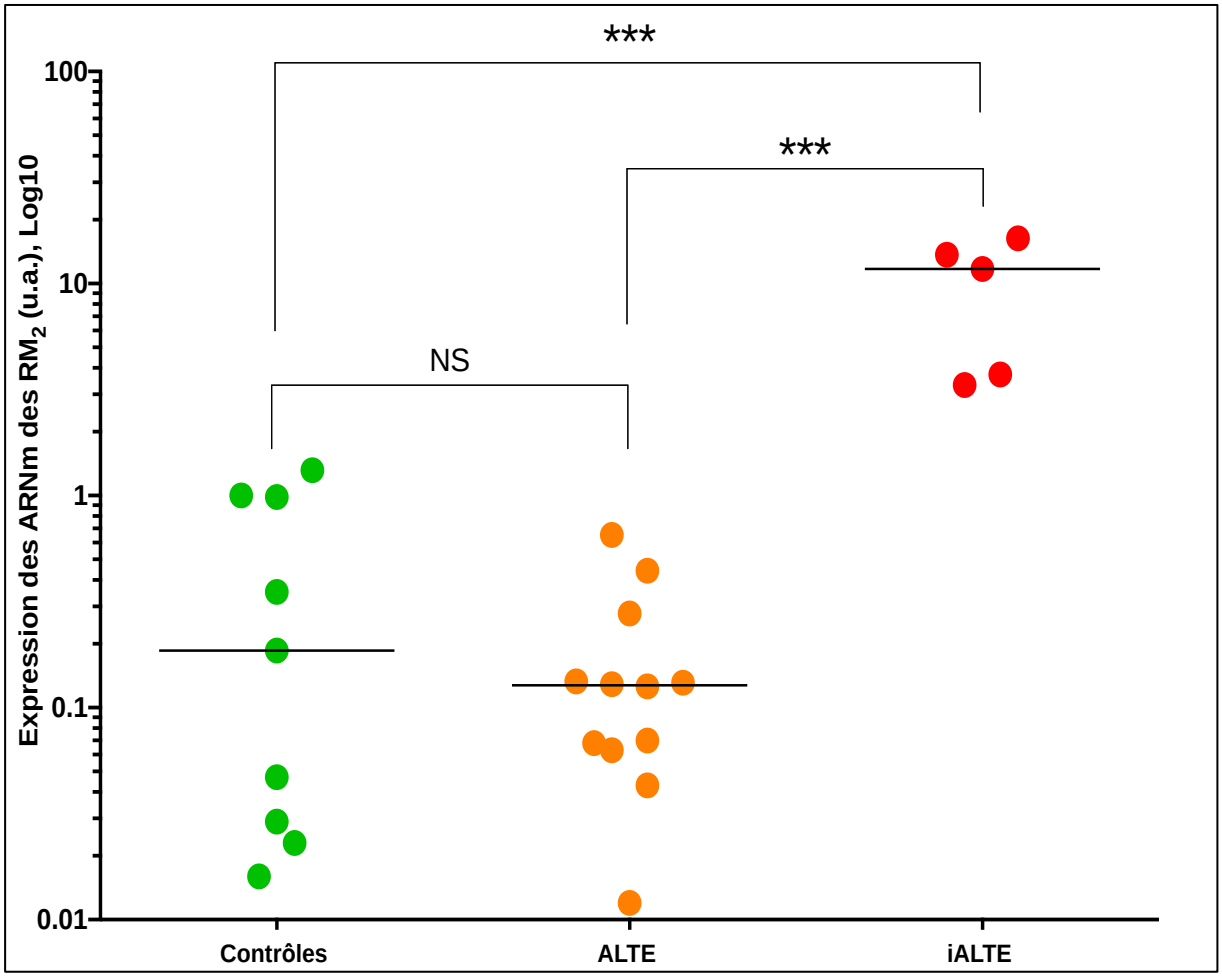


Figure 38. Expression des ARNm circulants dans les 3 groupes d'enfants de moins d'un an.

Expression des ARNm de l'AchE

La médiane d'expression de l'AchE circulante est significativement supérieure chez les patients du groupe iATLE (2,31 [range, 0,54-3,10]) par rapport aux enfants contrôles (0,352 [range, 0,09-1,25]), p<0,05. Elle est également significativement augmentée comparativement au groupe ALTE (0,21 [range, 0,05-0,73]), p<0,001. Mais il n'y a pas de différence significative pour l'expression de l'AchE entre le groupe contrôle et le groupe ALTE, p=0,13 (figure 39).

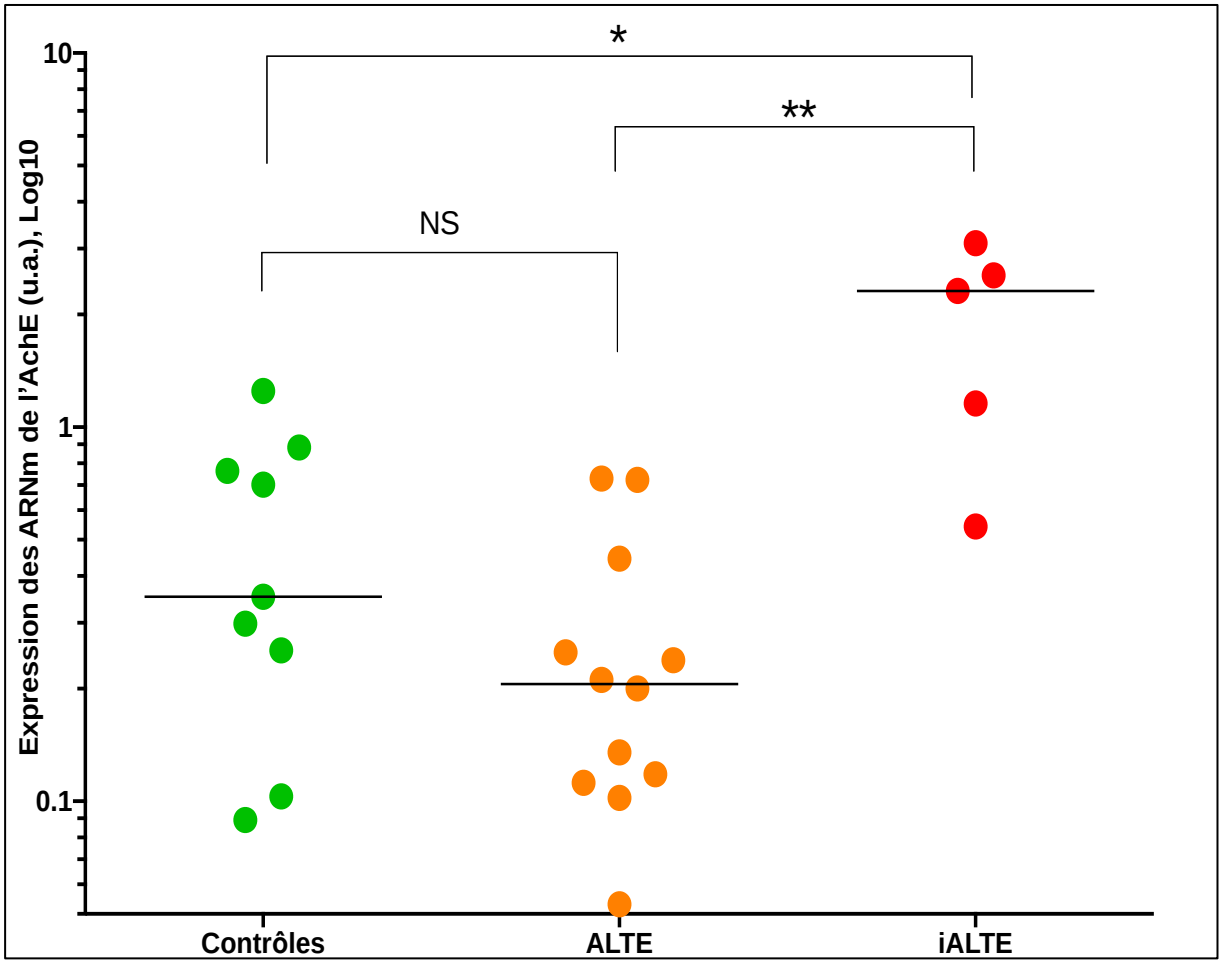


Figure 39. Expression des ARNm circulants de l'AchE dans les 3 groupes d'enfants de moins d'un an

Rapport d'expression RM_2/AchE

Les mêmes résultats sont observés lorsque l'on analyse les rapports d'expression RM_2/AchE (figure 40) :

- Pas de différences significatives entre le groupe ALTE (0,63 [range, 0,06-2,06]) et le groupe contrôle (1,06 [0,02-2,84]), p=0,86.

- Augmentation significative de la médiane de ce rapport pour les enfants du groupe iALTE (5,08 [1,20-25,23]) par rapport au groupe contrôle, p<0,05, et comparativement au groupe ALTE, p<0,01.

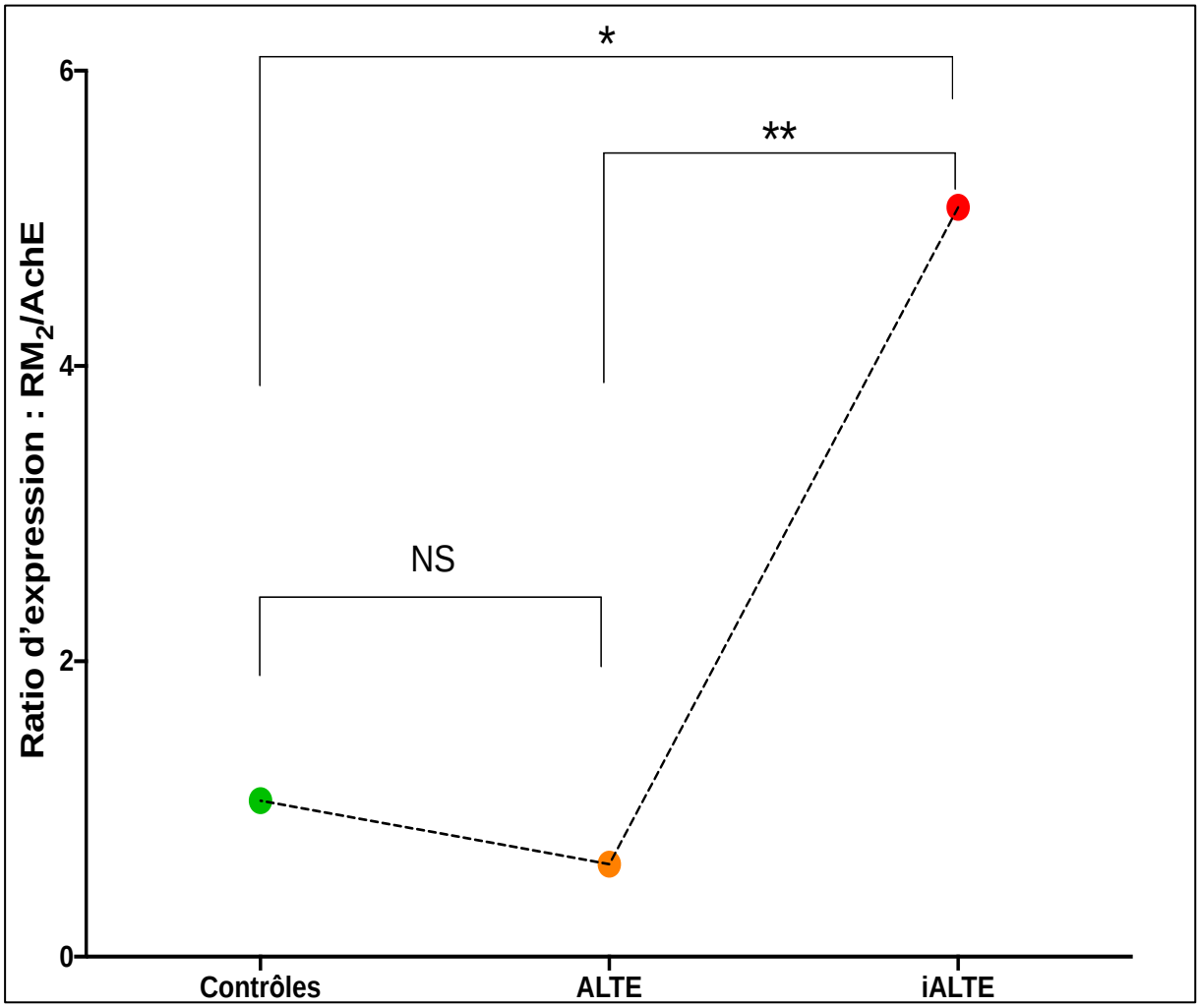


Figure 40. Rapport d'expression RM_2/AchE dans les 3 groupes d'enfants de moins d'un an

Discussion

Dans cette étude, les 5 enfants ayant présenté un malaise très sévère idiopathique (iALTE) ont une expression moyenne des ARNm circulants des RM_2 20 à 50 fois supérieure aux enfants des 2 autres groupes. On constate une nette différence sans chevauchement des valeurs. Ces résultats semblent être spécifiques et ne sont pas seulement le reflet d'une phase aiguë du malaise, car pour les enfants des groupes ALTE et iALTE ont été inclus pour malaise très sévère inexpliqué, la surexpression n'est donc pas liée au malaise. En raison de l'application stricte des critères de sélection, cette surexpression des RM_2 ne semble pas être associée à une maladie sous-jacente ou un traitement. En effet, l'expression moyenne des RM_2 est faible et n'est pas différente entre les 2 groupes, ALTE et contrôle (enfants sains, sans antécédents de pathologies ou de traitement). Ces premières observations semblent indiquer que les mécanismes physiopathologies entrainant les ALTE et les iALTE sont probablement différents.

L'expression de l'AchE suit la même tendance que celle des RM_2, elle est plus élevée chez les enfants ayant présenté un malaise idiopathique par rapport aux autres enfants. Néanmoins, nous constatons que cette surexpression de l'AchE dans le groupe iALTE est moins marquée que celle des RM_2. Nous proposons l'hypothèse selon laquelle cette augmentation d'expression, interprétée comme un mécanisme de compensation, pourrait être insuffisante pour prévenir les malaises liés à la surexpression des RM_2. Cette hypothèse est confortée par le fait que la moyenne des rapports des expressions RM_2/AchE est très largement augmentée dans le groupe iALTE. Ceci suggère que, pour les patients avec une forte surexpression des RM_2, l'augmentation compensatrice de l'AchE serait insuffisante ou inefficace.

Une autre étude a montré une altération des récepteurs muscariniques cérébraux dans des cas de MSN (Kinney *et al.*, 1995). La relation entre les malaises sévères inexpliqués (ALTE) et la MSN est toujours discutée (Kahn *et al.*, 1984; Brooks, 1992). L'hypothèse que les ALTE seraient un facteur de risque de MSN est même plutôt contestée, mais en général la sévérité et l'absence de diagnostic des ALTE ne sont pas prises en compte. Ces nouvelles observations, associées à nos

précédentes études (Livolsi *et al.*, 2010a, 2010b), suggèrent que l'hyperactivité du système parasympathique pourrait être le facteur de vulnérabilité commun entre la MSN et les iALTE.

La limite de cette étude est le faible nombre de patients, mais les cas de malaises très sévères idiopathiques sont heureusement assez rares. Il est cependant nécessaire de confirmer ces résultats sur un nombre de patients plus important.

Perspectives

Ces premiers résultats chez des enfants de moins d'un an présentant des malaises sévères inexpliqués ont conduit à la conception d'un nouveau protocole d'étude clinique visant à consolider les observations sur un nombre plus important d'enfants. Le résumé de cette étude est présenté ci-dessous.

Parmi les 5 enfants ayant présenté un malaise idiopathique, 3 d'entre eux sont malheureusement décédés dans les semaines suivant leur malaise. De plus, 2 de ces 3 enfants ont présenté une grande similitude dans la survenue des malaises répétés jusqu'à leurs décès, étiquetés MSN.

Après une analyse de leurs antécédents familiaux, nous avons constaté d'autres cas de MSN dans la fratrie et parmi les cousins germains chez l'un de ces nourrissons décédés. Ces observations renforcent l'idée d'une implication génétique dans la MSN et ont ouvert la voie vers une étude familiale dans cette pathologie (partie 3. « MSN familiale : surexpression muscarinique et analyse génétique »).

Appel A Projet Jeune Chercheur (AAPJC) – Etude « iALTE »

Nous avons conçu et rédigé ce protocole d'étude intitulé « Malaises sévères inexpliqués, mort subite du nourrisson et récepteurs muscariniques » ou « étude iALTE », afin de valider ces premiers résultats chez un nombre plus important d'enfants de moins d'un an.

Cette étude est basée sur l'hypothèse que les enfants de moins d'un an présentant un malaise sévère inexpliqué idiopathique (iALTE), auraient une surexpression des RM_2 sanguins par rapport à des nourrissons présentant un malaise sévère avec étiologie identifiée (ALTE). Nous avons conçu une étude multicentrique (Strasbourg, Reims, Nancy et Besançon), en standardisant la prise en charge de ses enfants, afin d'augmenter la capacité de recrutement. Cette étude suit une prise en charge « classique » de ces cas, en y ajoutant un recueil sanguin spécifique pour l'analyse de nos marqueurs. Elle a donc pu être classifiée en recherche impliquant la personne humaine de catégorie 2 ou « recherches interventionnelles à risques et contraintes minimes ».

Ce projet a été déposé à un appel à projet jeune chercheur (AAPJC) du Groupement Interrégional de Recherche Clinique et d'Innovation (GIRCI) Est 2015 et a obtenu un financement pour le recrutement et l'analyse de 30 nourrissons. Cette étude a été approuvée le 27/09/2016 par le CPP Est IV.

Après avoir obtenu toutes les autorisations nécessaires (CNIL, CCTIRS, ANSM) et rédigé tous les documents réglementaires (consentement éclairé, notice d'information, circuit biologique) et pratiques (instructions de prélèvement et de stockage), nous avons pu débuter l'étude, dans un premier temps à Strasbourg en octobre 2017, puis dans les autres centres recruteurs : Nancy en juin, Reims en septembre et Besançon en novembre 2018. Le premier patient a été inclus à Nancy en septembre 2018.

Les Hôpitaux Universitaires de STRASBOURG

MALAISES SEVERES INEXPLIQUES, MORT SUBITE DU NOURRISSON ET RECEPTEURS MUSCARINIQUES
iALTE (idiopathic Apparent Life-Threatening Events)

Appel A Projet Jeune Chercheur (AAPJC) GIRCI-Est 2015 - HUS n°6432
N° IDRCB: 2016-A00815-46

Gestionnaire *:* *Hôpitaux Universitaires de Strasbourg* *1, place de l'Hôpital,* *67 091 STRASBOURG cedex* *Tél. : 03 88 11 52 66* *Fax : 03 88 11 54 94* *Email : DRCI@chru-strasbourg.fr*	*P. le Directeur Général,* *Directeur de la Recherche Clinique* *et des Innovations* *Dimitri SANCHEZ*
Investigateur Coordonnateur : *Dr DE MELO Charlie* *Réanimation Pédiatrique Spécialisée* *Hôpital de Hautepierre-CHU de Strasbourg* *Avenue Molière, 67098 Strasbourg* *Tel : 03 88 12 83 08* *Email : charlie.demelo@chru-strasbourg.fr*	***Signature de l'Investigateur Coordonnateur :***
Méthodologiste responsable *Pr Sauleau Erik* *Pôle Santé Publique, Santé au travail et Hygiène hospitalière* *Groupe Méthode en Recherche Clinique* *1, place de l'Hôpital* *67000 Strasbourg* *Tel : 03 88 11 62 10* *Email: erik.sauleau@chru-strasbourg.fr*	***Signature :***

Version N° 1.2
Date de la version : 27/09/2016

Résumé de l'etude

Titre de la recherche	***Malaises sévères inexpliqués, mort subite du nourrisson et récepteurs muscariniques***
Titre abrégé	***iALTE***
Gestionnaire	*Hôpitaux Universitaires de Strasbourg*
Investigateur coordonnateur	***Dr DE MELO Charlie***
N° HUS	***6432***
N° ID RCB	***2016-A00815-46***
Justification de la recherche	*Les malaises très sévères du nourrisson, qui se compliquent le plus souvent de lésions neurologiques importantes ou de mort subite, constituent une situation devant laquelle les pédiatres sont démunis sur le plan étiologique et thérapeutique. Il y a donc urgence à identifier un marqueur de sévérité qui puisse conduire à l'initiation de thérapeutiques adaptées. Au cours d'une recherche translationnelle, notre équipe a démontré l'existence de la 1ère anomalie myocardique dans un modèle animal d'hyperréactivité vagale et dans la mort subite du nourrisson : augmentation de l'expression des récepteurs muscariniques M_2 et de l'acétylcholinestérase (AchE), en tant que mécanisme de compensation. Ces anomalies sont retrouvées dans le sang. Dans une étude PHRC récente ces anomalies ont été retrouvées dans le sang de malades, enfants et adultes, présentant des malaises vagaux sévères (manuscrits soumis et en préparation). Parmi ces sujets, 5 enfants de moins d'un an présentant des malaises très sévères (ayant entraîné la mort de trois d'entre eux) avaient des taux de récepteurs M_2 très supérieurs à ceux des sujets témoins et des cas de malaises d'étiologies connues.*
Objectif principal	*L'objectif principal est de poursuivre la validation du marqueur en montrant que, chez des nourrissons (28 jours ≤ âge< 12 mois) présentant des malaises très sévères, la densité de récepteurs muscariniques M_2 est significativement supérieure dans les cas de syncopes graves idiopathiques (iALTE) et/ou de mort subite rattrapée, à celle observée dans les cas où les étiologies sont connues (ALTE). Il s'agit donc de confirmer sur un échantillon plus grand nos observations initiales sur 5 cas.*
Objectif secondaire	*L'objectif secondaire est de vérifier si l'AchE est également augmentée en tant que mécanisme compensateur dans le groupe iALTE.*
Critère d'évaluation principal	*Le critère d'évaluation principal est l'expression de l'ARN messager des récepteurs M_2 dans le sang des nourrissons de moins d'un an (RT-PCR).*

Critère d'évaluation secondaire	*Le critère d'évaluation secondaire est l'expression de l'ARN messager de l'AchE dans le sang des nourrissons de moins d'un an (RT-PCR).*
Plan expérimental	- *Etude Prospective de soins courants* - *Multicentrique* - *Comparative* - *Ouverte avec analyse des échantillons en aveugle*
Critères d'éligibilité	***Critères d'inclusion*** *1-Nourrisson âgé de 28 jours à moins de 12 mois à la survenue du malaise (28j ≤ âge < 12 mois)* *2- Admis dans un service de réanimation pédiatrique ou d'urgences pédiatriques après avoir présenté un (des) malaise(s) très sévère(s) nécessitant une prise en charge médicale d'urgence.* *3-Consentement éclairé signé et daté par le/les titulaire(s) de l'autorité parentale du nourrisson* *4-Sujet affilié à un régime de protection sociale d'assurance maladie* ***Critères de non inclusion*** *1-Enfant ayant une pathologie cardiovasculaire, neurologique, infectieuse, toxique ou métabolique connue avant l'inclusion (avant le malaise).* *2-Sujet sous traitement(s) médicamenteux de plus de 3 mois avant l'inclusion.* *3-Impossibilité de donner au(x) titulaire(s) de l'autorité parentale du sujet des informations éclairées (difficultés de compréhension, …)* *4-Sujet en période d'exclusion (déterminée par une étude précédente ou en cours)*
Déroulement pratique de l'essai	***Visite de sélection = admission du sujet :*** *information orale du ou des titulaires de l'autorité parentale du sujet et remise de la notice d'information.* ***Visite d'inclusion = au cours de l'hospitalisation de l'enfant*** *: Recueil du consentement éclairé signé par le(s) titulaire(s) de l'autorité parentale du sujet. Un volume sanguin de 2,5mL sur tube PaxGene® (Qiagen, extraction des ARN) sera ajouté aux prélèvements sanguins de soins courants sur cathéter central mis en place dans le cadre de la prise en charge habituelle.*

Création d'une collection d'échantillons biologiques	*Les extraits d'ARNm issus des échantillons de sang prélevés pour la recherche seront conservés au sein d'une nouvelle collection d'échantillons biologiques au laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. Cette collection sera utilisée jusqu'à épuisement complet des ressources biologiques et permettra de réaliser, si nécessaire, des analyses complémentaires dans la même thématique, sans analyse génétique ayant pour objet l'identification de la personne.*
Médicaments/traitements autorisés et/ ou interdits	*Aucun médicament ne sera interdit, ni utilisé spécifiquement pour les besoins de la recherche*
Nombre de sujets nécessaire	*Les sujets éligibles seront inclus jusqu'à obtenir 15 sujets par groupe. On prévoit 30% à 50% d'inclusion dans le groupe iALTE ; les effectifs de chaque groupe pourront donc ne pas être identiques.*
Méthode statistique	*L'analyse statistique se fera par comparaison des taux d'expression des récepteurs M_2 et de l'AchE entre les deux groupes : iALTE vs. ALTE. Une analyse intermédiaire de ces taux sera réalisée après l'inclusion de 7 sujets dans chaque groupe. La modélisation sera effectuée en utilisant des méthodes bayésiennes d'inférence.*
Calendrier prévisionnel	*Durée de période d'inclusion : 24 mois* *Durée de participation de chaque sujet : 24h maximum* *Durée totale de l'étude : 24 mois et 24h* *Durée d'exclusion : NA*
Perspectives	*Les résultats de cette recherche pourraient permettre la mise en place d'un dépistage du risque de malaises sévères associés à une hyperréactivité vagale et/ou de mort subite dès la naissance puis l'instauration d'une thérapeutique ciblée, avec de l'atropine orale (antagoniste des récepteurs muscariniques), pour cette population d'enfants. Cette prise en charge spécifique devrait aboutir à une diminution significative de la fréquence des malaises sévères, de leurs complications neurologiques notamment et des morts subites du nourrisson.*

PUBLICATION 2

(Publiée en juillet 2016)

EXPRESSION OF CIRCULATING MUSCARINIC RECEPTORS IN INFANTS WITH SEVERE IDIOPATHIC LIFE-THREATENING EVENTS

*Chris Adamopoulos, MD[1]; Hugues Greney, PhD[2]; **Maxime Beutelstetter**, PharmD[3]; Pascal Bousquet, MD[2]; Angelo Livolsi, MD[1]*

[1]Unit of Cardiopediatrics, Hautepierre University Hospital, Strasbourg, France. [2]Laboratory of Neurobiology and Cardiovascular Pharmacology, Federation of Translational Medicine, University of Strasbourg, Strasbourg, France. [3]Center of Clinical Investigation, University Hospitals of Strasbourg, Strasbourg, France.

JAMA Pediatrics

About half of the apparent life-threatening events (ALTEs) that occur among infants remain unexplained and are called idiopathic[1]. Yet there is no biomarker associated with idiopathic ALTEs. Although the connection between ALTEs and sudden infant death syndrome (SIDS) remains controversial, the cholinergic system has been investigated in the pathogenesis of both[2-4]. We investigate the M_2 muscarinic receptors' expression in the blood samples of infants who experienced severe ALTEs.

Methods

We prospectively enrolled 17 consecutive, previously healthy infants (age, <1 year) who had a first episode of severe ALTE, which is defined as a sudden episode that is characterized by some combination of apnea, color change, marked change in muscle tone, choking, or gagging[5]. Severity was defined as direct admission to an intensive care unit shortly after the event. Blood samples for M_2 analysis were collected at admission, and the diagnostic workup started after admission. Cases with no specific diagnosis were classified as idiopathic[5,6]. After the diagnostic procedure was performed for all 17 infants, it was determined that 5 had idiopathic ALTEs and 12 had ALTEs of known etiology. A third group consisted of 9 healthy control infants who had no family history of ALTE/SIDS. The study was conducted in accordance with the national regulations on medical research, and written informed consent was obtained from the infants' parents/guardians.

Whole-blood samples were collected in PaxGene Blood RNA Tubes (Qiagen/BD). Total RNA was extracted with the PaxGene RNA kit (Qiagen); 200 ng of total RNA were reverse transcribed into complementary DNA using the iScript cDNA Synthesis kit (Biorad). M_2 gene expression was measured by quantitative real-time polymerase chain reaction using a specific primer for the M_2 receptor gene CHRM2 (F: AAGACCCCGTTTCTCCAAGT; R: GAGGCAACAGCACTGACTGA). The rabbit 18S housekeeping gene (F: CCTGCGGCTTAATTTGACTC; R: ATGCCAGAGTCTCGTTCGTT) was used for normalization, and M_2 levels are expressed as the M_2:18S ratio. The samples were analyzed following a blinded procedure. Statistical significance was set at $P = .05$.

Results

The baseline characteristics of the groups of infants and the specific diagnoses for ALTEs of known cause are summarized in the Table. The median M_2 expression was not significantly different between the 9 healthy control infants (0.19 [range, 0.02-1.30]) and the 12 infants who experienced ALTEs of known cause (0.13 [range, 0.01-0.65]). In contrast, M_2 expression was significantly higher in the 5 infants who experienced idiopathic ALTEs compared with other 2 groups of infants (11.73 [range, 3.32-16.35]) ($P < .001$) (Figure).

Discussion

In this study, the average M_2 expression in the 5 infants who experienced idiopathic ALTEs was 20 to 50 times higher than the other 2 groups of infants (ie, the 12 infants who experienced ALTEs of known etiology and the 9 healthy control infants), with no overlapping. This finding appears to be specific and is not likely to reflect an acute-phase effect because both the infants who experienced idiopathic ALTEs and the infants who experienced ALTEs of known etiology were severe cases. It also seems unlikely that the receptors' upregulation is driven by certain diseases or treatments because all the values of M_2 expression in the group of infants who experienced ALTEs of known cause were consistently low and were no different than the values found in the group of healthy control infants who did not have any pathologies or treatments. These preliminary observations imply that idiopathic ALTEs and ALTEs of known etiology may have different underlying mechanistic pathways.

Another study has reported alterations in cerebral muscarinic receptors in infants who died of SIDS[3]. Although ALTEs are generally not considered to be related to SIDS, this is based on studies that have not necessarily distinguished groups by illness severity or lack of a diagnosis. The present data, together with our previous findings of cardiac muscarinic receptors in SIDS, suggest that parasympathetic overactivity may be a common vulnerability between SIDS and severe, idiopathic ALTEs[4]. This is also in line with recent evidence suggesting that both syndromes could be related[6].

A limitation of our study is the small sample size, but severe idiopathic ALTE is a rare condition. Larger studies are needed to assess the potential clinical implications of this novel, easily detectable, circulating marker, to understand the mechanisms and develop preventative strategies.

Table: Summary of Baseline Data

Table. Summary of Baseline Data[a]

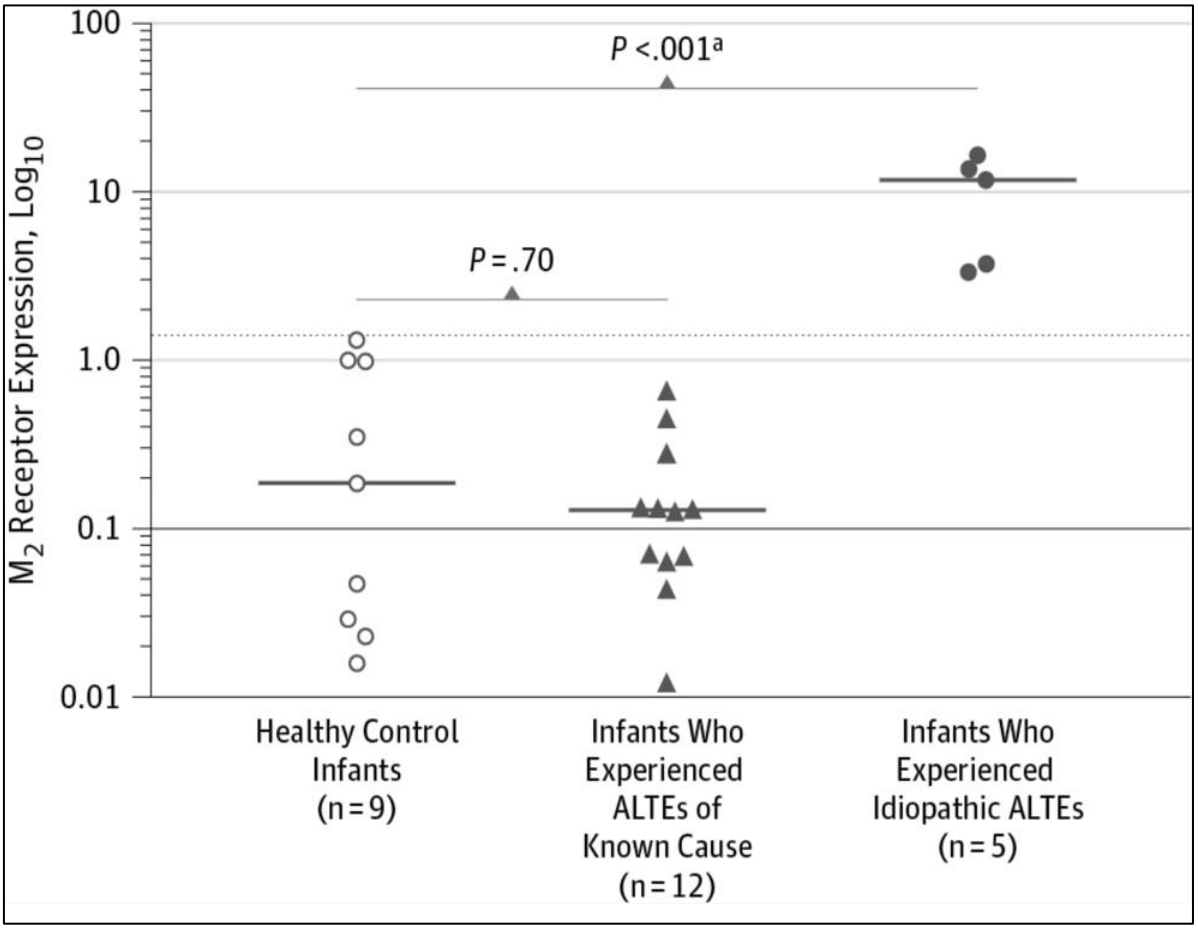
Characteristic	Infants, Mean (SD) Value		
	Healthy Controls (n = 9)	ALTEs of Known Cause[b] (n = 12)	Idiopathic ALTEs (n = 5)
Age, mo	3.2 (1.2)	3.1 (1.1)	2.8 (1.4)
Male sex, No.	6	7	3
Birth weight, g	3192 (399)	2996 (468)	3542 (424)
Gestational age, wk	38 (0.5)	37 (1.8)	38 (0.4)
Apgar score at 5 min	9.5 (0.5)	9.5 (0.4)	9.6 (0.5)
Preterm birth, No.	0	2	0

Abbreviation: ALTEs, apparent life-threatening events.

[a] The differences in the baseline parameters between the 3 groups of infants are not significant.

[b] Of the 12 infants who experienced ALTEs of known cause, 1 had a congenital airway defect, 1 had airway obstruction, 1 had pertussis infection, 4 had severe gastroesophageal reflux, 4 had seizures, and 1 had arrhythmia.

Figure: Muscarinic Receptor (M_2) Expression in 3 Groups of Infants



Muscarinic Receptor (M_2) Expression in 3 Groups of Infants. Each symbol represents 1 individual value. The solid lines represent the median values of the groups; the dotted horizontal line represents the highest control value. ALTEs indicates apparent life-threatening events.
[a]For nonparametric testing, with adjustment for multiple comparisons.

PARTIE 3

MORT SUBITE DU NOURRISSON FAMILIALE : SUREXPRESSION MUSCARINIQUE ET ANALYSE GENETIQUE

Contexte

Malgré la décroissance importante de l'incidence des cas de MSN dans les pays développés depuis plusieurs décennies, cette maladie reste encore l'une des plus fréquentes causes des décès post-néonatales dans ces pays (Goldstein *et al.*, 2016). Par exemple, aux Etats-Unis 8% des morts de nourrissons sont étiquetées MSN (Matthews and MacDorman, 2013). De nombreux efforts ont été entrepris pour réduire les risques liés à l'environnement, tels que les recommandations sur la position de couchage de l'enfant (Fleming *et al.*, 1990; Dwyer *et al.*, 1991; Ponsonby *et al.*, 1993; Irgens *et al.*, 1995) ; sur le type de couchage de l'enfant (Rechtman *et al.*, 2014) ; sur le co-couchage (Tappin *et al.*, 2005; Blair *et al.*, 2014) ; ou les campagnes sur les risques des expositions pré et/ou post-natales au tabac, à l'alcool ou aux drogues (Durand *et al.*, 1990; Klonoff-Cohen *et al.*, 1995; Anderson and Cook, 1997; Fifer *et al.*, 2009). Néanmoins, il persiste des facteurs intrinsèques impliqués dans la MSN, comme la génétique, qui pourraient jouer un rôle important dans cette pathologie. Cette hypothèse était déjà évoquée dans le modèle « triple risque », en tant que facteur de vulnérabilité de l'enfant à la MSN (Filiano and Kinney, 1994).

Depuis une dizaine d'années, le séquençage haut débit de l'exome ou « next generation sequencing » (NGS) a amené une révolution dans la recherche en médecine génétique ou dans le diagnostic de maladies « rares », notamment en pédiatrie. Durant les 5 dernières années, autant de gènes pathogènes ont été identifié que depuis le début des recherches génétiques, notamment dans les domaines du retard du développement et de l'autisme, ainsi que dans les maladies neurologiques, cardiaques, rénales, etc. L'oncologie et les maladies rares sont les domaines où la génétique est actuellement la plus utilisée, pour le diagnostic et pour l'approche thérapeutique, peut-être parce que ce sont les domaines où elle est la plus étudiée. Le NGS est déjà devenu une « routine » dans certains pays pour le diagnostic de maladies dont les étiologies restent difficiles à identifier, telle que la MSN (Strom and Superti-Furga, 2016).

Le NGS permet d'obtenir la séquence nucléotidique de tous les exons du génome d'un individu, c'est-à-dire la partie codante qui ne représente que 2% du génome mais qui regroupe environ 90% des mutations pathogènes. Le NGS est réalisable à partir de petites quantités d'ADN issues de prélèvements de sang ou de tissus, et même de salive. Le résultat de ce séquençage prend la forme d'un fichier contenant l'ensemble des variants identifiés (environ 25000), analysable par un bio-informaticien, qui permettra de réduire ce nombre de mutations à une quantité cliniquement interprétable. Le tableau 8 résume les étapes de ce NGS.

Laboratoire
- Extraction de l'ADN génomique (sang, salive/frottis buccale, autre) - Amplification des exons - Séquençage des exons - Obtention d'un fichier avec des séquences
Bioinformatique
- Comparaison des séquences obtenues avec la séquence de référence - Résultats : environ 25000 variants pour chaque individu - Élimination des variants synonymes : reste environ 10000 variants - Élimination des variants communs et déjà observés chez les individus sains : reste environ 25 à 200 variants
Discussion bioinformatique-clinique
- Évaluation critique de chaque variant

Tableau 9. Résumé des étapes du séquençage haut débit de l'exome

Etabli à partir de (Strom and Superti-Furga, 2016)

Ainsi, cette méthode d'analyse génétique génère une quantité impressionnante de données brutes, qui sont très difficiles à interpréter. En effet, le NGS fournit une très longue liste de variants de signification inconnue, c'est-à-dire une variation génétique dont l'implication dans une pathologie est inconnue, ce qui rend la lecture des résultats compliquée. Ces variants inconnus peuvent contribuer à la vulnérabilité intrinsèque du nourrisson (selon le modèle « Triple risques »), mais les associer à la pathogénicité d'une maladie, notamment dans la MSN, reste un défi (Brownstein *et al.*, 2018)

Les études génétiques avec un NGS restent encore compliquées car il paraît peu probable qu'un seul variant pathogène soit présent dans tous les cas de MSN (Opdal and Rognum, 2011). Il semble plus probable que plusieurs gènes, en combinaison avec d'autres facteurs de risque, soient impliqués dans la prédisposition d'un enfant à la MSN. Ainsi, ces variations génétiques seraient soit des mutations entraînant un désordre génétique puis le décès, soit constitueraient un polymorphisme prédisposant l'enfant durant une période critique de sa vie à un facteur de risque extérieur de MSN (Opdal and Rognum, 2011).

Dans la MSN, cette technique a déjà été utilisée à plusieurs reprises et aurait permis d'expliquer de 15 à 35% des cas de MSN (en fonction des études), en identifiant des anomalies congénitales non détectées durant l'autopsie, telles que des cardiomyopathies, des canalopathies ou des désordres métaboliques (figure 41) (Courts and Madea, 2010; Ackerman *et al.*, 2011; Opdal and Rognum, 2011; Neubauer *et al.*, 2017). Récemment, une revue a répertorié l'ensemble des variations génétiques identifiées avec un rôle probable dans la MSN (figure 42).

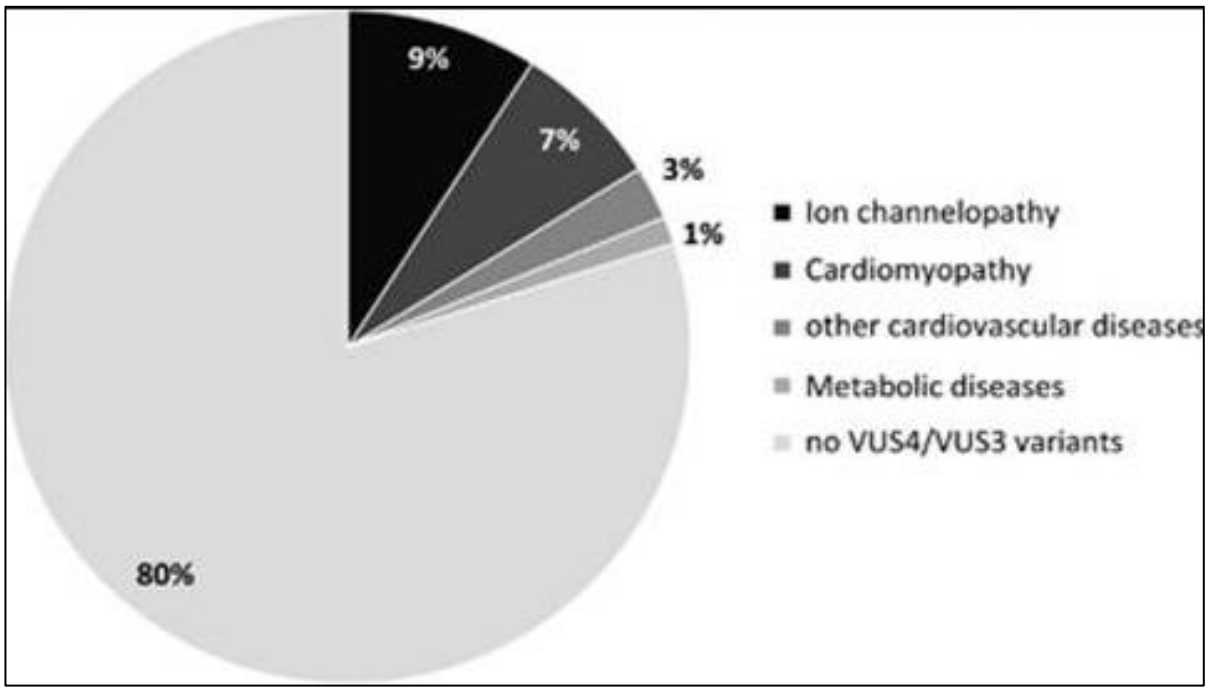


Figure 41. Pourcentage de cas de MSN avec un variant potentiellement pathogène (Neubauer *et al.*, 2017)

Le but de cette étude est de réaliser un séquençage haut débit de l'exome de plusieurs membres d'une famille, dans laquelle nous avons recensé plusieurs cas de MSN, afin d'identifier un ou des variants potentiellement pathogènes associés à la MSN ou à l'hyperactivité vagale. La relation entre ces 2 phénomènes n'étant pas établie, nous avons donc effectué une recherche complète sur tout l'exome pour objectiver d'éventuelles mutations qui pourraient être associées à l'un de ces phénotypes pathologiques. De plus, l'expression sanguine des ARNm des RM_2 et de l'AchE a été prise en compte dans cette étude.

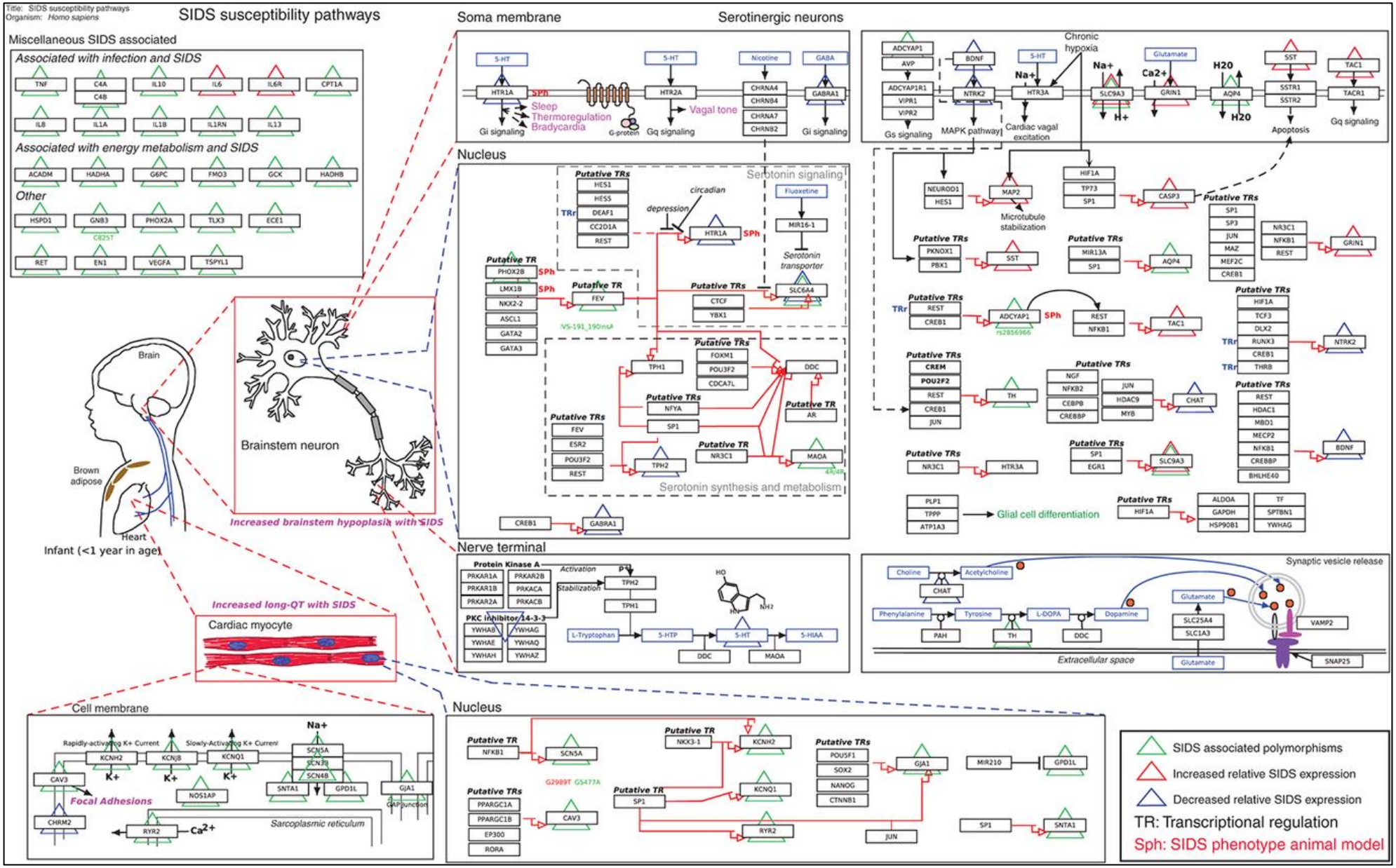


Figure 42. Revue des différentes mutations citées dans la MSN (Salomonis et al., 2014)

https://www.wikipathways.org/index.php/Pathway:WP706

Méthodes

Identification des membres d'une famille

Pour notre étude génétique, nous avons analysé une famille dans laquelle plusieurs cas de MSN ont été constatés. Cette famille dite « MSN » a été identifiée suite aux investigations menées chez 1 des enfants décédés de MSN, qui avait préalablement participé à notre étude sur les marqueurs sanguins (RM_2 et AchE) de malaises sévères inexpliqués du jeune enfant (partie 2, ci-dessus). L'enquête familiale a permis de construire un arbre généalogique complet et de répertorier l'ensemble des événements particuliers, tels que les MSN, les morts fœtales in-utérines (MFIU) ou les retards psychomoteurs (RPM) sur souffrance fœtale. Cet arbre généalogique complet est représenté ci-dessous : tous les membres de la famille y sont représentés ; seuls les individus identifiés par un numéro et marqués par des cercles verts ont pu être génétiquement analysés, (figure 43).

Nous n'avons pas pu confirmer ou infirmer une possible consanguinité chez cette famille issue des gens du voyage.

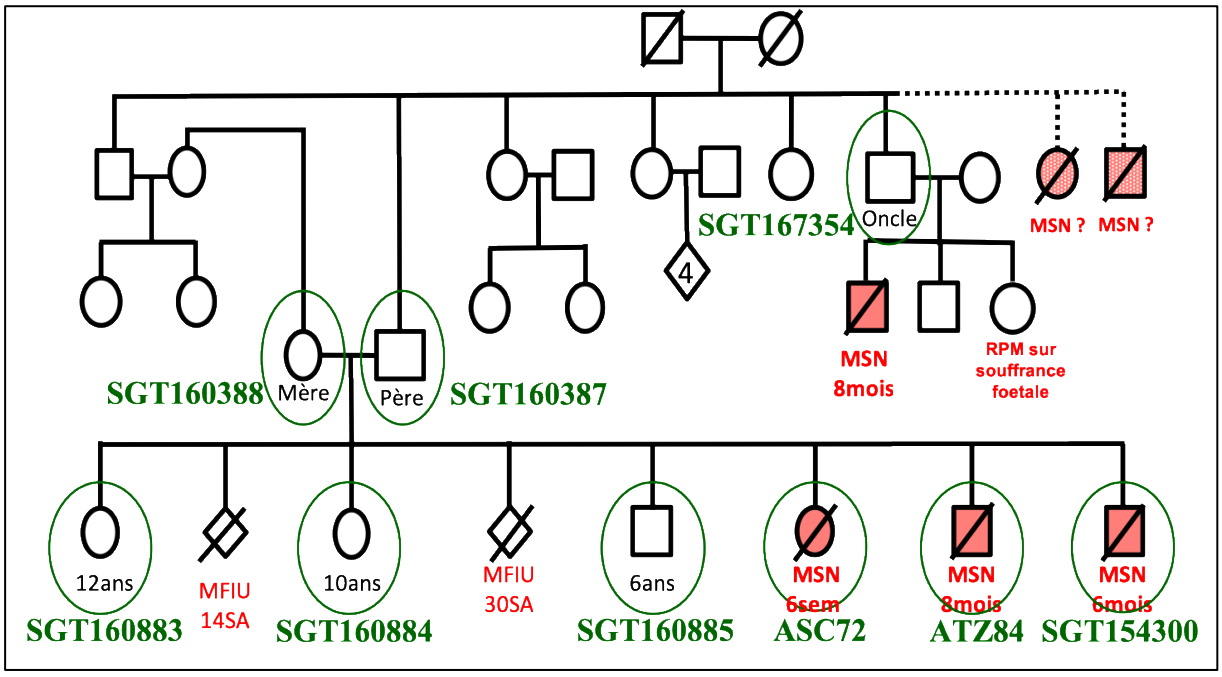


Figure 43. Arbre généalogique complet de la famille « MSN »

Compte tenu des évènements répertoriés, nous avons finalement analysé l'ADN de 9 membres de cette famille : les 2 parents (SGT160388 et SGT160387) ; leurs 6 enfants, 3 décédés de MSN (ASC72, ATZ84 et SGT154300) et 3 toujours vivants en bonne santé (SGT160883, SGT160884 et SGT160885) ; et un oncle (SGT167354) de la branche paternelle, qui a eu 3 enfants dont un est décédé de MSN. On constate également 2 MFIU chez la mère et 1 RPM sur souffrance fœtale chez 1 enfant de l'oncle. Nous n'avons pas pu obtenir de prélèvement de la tante, qui aurait complété avantageusement le panel.

De plus, les investigations cliniques et les expertises médico-légales n'ont pas permis d'identifier une étiologie pour le décès des 3 enfants décédés de la famille, confirmant ainsi la MSN pour ces 3 cas. Chez les 2 derniers enfants, le décès est survenu après plusieurs malaises sévères idiopathiques (iALTE).

Prélèvements des échantillons

Pour chacun des 9 membres identifiés, nous avons obtenu de l'ADN extrait de prélèvements de sang ou de tissus, provenant d'une banque de MSN, pour effectuer un séquençage haut débit de l'exome (NGS ou « Next generation sequencing »), ainsi qu'un prélèvement de sang sur tube PAXgene® pour une analyse des marqueurs sanguins, RM_2 et AchE. L'analyse de ces marqueurs avait déjà été effectuée chez les 2 derniers enfants décédés et les résultats de leurs dosages ont été intégrés à l'ensemble des autres.

Afin de vérifier la qualité des ADN extraits, une électrophorèse sur gel d'agarose a été effectuée avant l'envoi des échantillons pour séquençage. Cette analyse a montré que le prélèvement tissulaire d'un des enfants (ASC72), décédé de MSN il y a quelques années, était dégradé. En effet, la présence d'une trace montre un ADN fragmenté en comparaison avec les autres dépôts. Cet échantillon a tout de même été envoyé pour séquençage (figure 44).

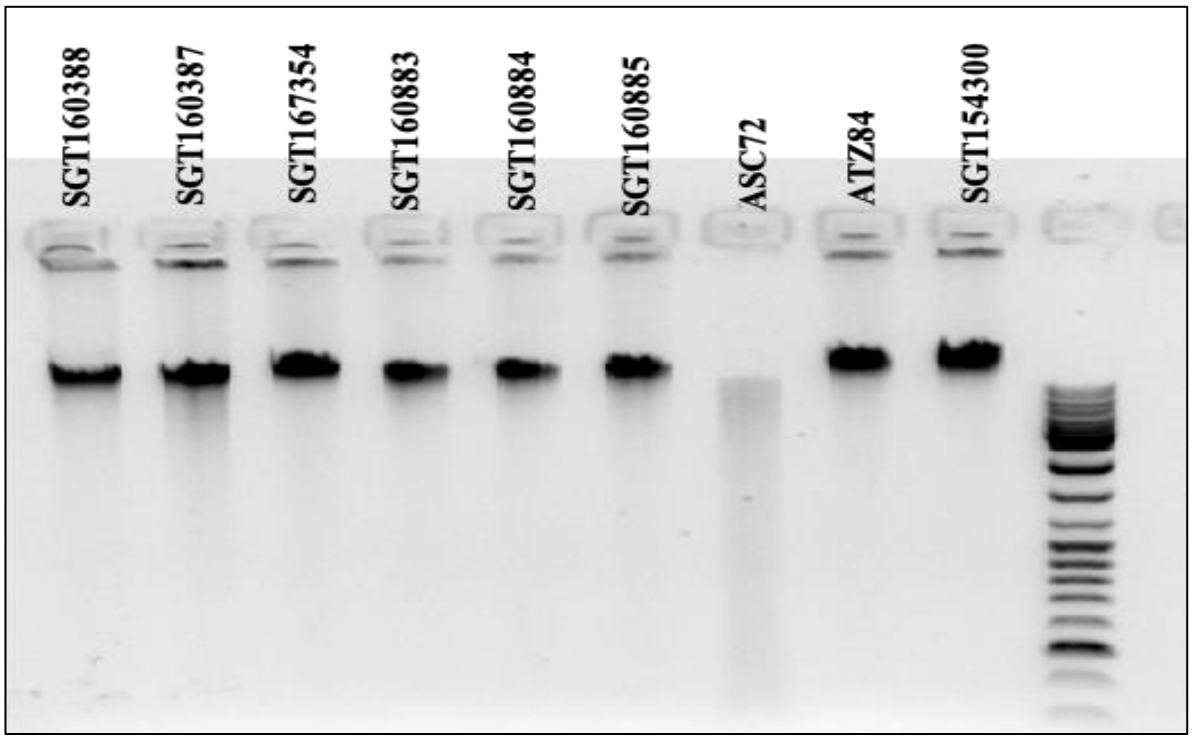


Figure 44. Analyse de la qualité des échantillons d'ADN par la technique d'électrophorèse sur gel d'agarose.

Séquençage haut débit de l'exome

Les 9 échantillons d'ADN ont été envoyés à la société Integragen Genomics® pour la réalisation du séquençage de l'exome.

Avant le processus de séquençage, des tests de contrôle qualité ont également été effectués par la société Integragen afin de vérifier l'intégrité des ADN réceptionnés. Le tableau 9 ci-dessous indique le volume, la concentration et la quantité d'ADN à analyser ainsi que les résultats des tests qualité : « PASS » signifie que le contrôle qualité est validé.

Tous les échantillons d'ADN ont donc pu être séquencés, même celui qui semblait être dégradé.

DNA QC Reception

Name	Volume(ul)	Concentration(ng/ul)	Quantity(ng)	Qualification	Quantification
SGT160-388	16.00	165.25	2644.00	PASS	PASS
SGT160387	16.00	157.25	2516.00	PASS	PASS
SGT167354	20.00	113.89	2277.80	PASS	PASS
SGT160883	25.00	85.65	2141.25	PASS	PASS
SGT160884	25.00	68.43	1710.75	PASS	PASS
SGT160885	24.00	106.54	2556.96	PASS	PASS
ASC72	25.00	35.20	880.00	PASS	PASS
ATZ84	20.00	164.48	3289.60	PASS	PASS
SGT154300	17.00	127.71	2171.07	PASS	PASS

Tableau 10. Contrôle qualité des échantillons d'ADN réceptionnés

De plus, des tests de génotypage ont été réalisés avant et après le séquençage afin de contrôler l'identité génétique du membre de la famille lors de la fourniture des résultats. Ce test de génotypage SNP est basé sur 48 marqueurs SNP, qui ont été choisis pour être inclus dans les exons bien couverts, à haute fréquence allélique et répartis uniformément dans l'exome. Ensuite, à la fin du processus bio-informatique (analyse après le séquençage), les résultats du génotypage SNP sont comparés aux données du NGS, puis un score de concordance est calculé. Cela permet de détecter toute défaillance dans le processus de préparation des échantillons (contamination, inversion des échantillons, ...) et d'assurer la concordance entre les échantillons reçus et les résultats fournis.

Les données brutes du séquençage nous ont été transmises pour une analyse commune avec les bio-informaticiens du laboratoire de génétique médicale UMR_S1112 de la Professeure Hélène Dollfus.

Analyses des marqueurs sanguins

Comme nous l'avons vu précédemment, l'analyse de l'expression des ARNm circulants des RM_2 et de l'AchE a été effectuée à partir d'un prélèvement sanguin sur tube PAXgene®. Ce prélèvement a été effectué chez 6 membres de la famille : les 2 parents, les 3 enfants sains et le dernier enfant décédé. Les expressions de ces paramètres biologiques du $2^{ème}$ enfant décédé (ATZ84) avaient déjà été analysées lors de l'étude précédente, et leurs valeurs ont été ajoutées aux résultats des analyses de cette étude. L'extraction des ARN et la RT-qPCR ont été réalisées selon les mêmes protocoles que pour les analyses précédentes.

Les expressions des ARNm de ces marqueurs de chaque membre ont été comparées entre eux et par rapport à la médiane d'expression « patients », calculée à partir des valeurs de l'expression des RM_2 et de l'AchE chez les patients présentant des malaises vagaux et à la médiane d'expression « témoins », calculée à partir des valeurs de l'expression des RM_2 et de l'AchE des sujets contrôles sains. Ces médianes, issues de l'étude précédente, nous ont servi de « seuil » pour déterminer s'il y a surexpression.

Résultats

Analyses des marqueurs sanguins

A titre indicatif, les médianes d'expression des ARNm circulants des RM_2 étaient de 0,238 chez les sujets contrôles de l'étude précédente et de 0,915 chez les malades de cette même étude. De même, pour l'expression de l'AchE, les médianes sont respectivement de 0,423 et de 0,738 pour les patients et les témoins. En première approximation, nous avons estimé qu'une expression supérieure à la médiane « patients vagaux » pouvait être considérée comme significativement augmentée par rapport aux contrôles.

L'expression des ARNm circulants des RM_2 de 7 des 9 membres de la famille a été analysée. On constate une surexpression de ces récepteurs chez les parents, avec un niveau d'expression de 2,09 pour le père et de 2,6 pour la mère ; ainsi que chez l'un des enfants sain (SGT160885) avec une surexpression très marquée à 5,23 ; et également chez les 2 enfants décédés de MSN : 3,32 pour le ATZ84 et 1,05 pour le SGT154300. Enfin chez 2 des enfants en bonne santé, l'expression sanguine des RM_2 est relativement faible, 0,73 chez le SGT160883 et 0,7 chez le SGT160884 (figure 45).

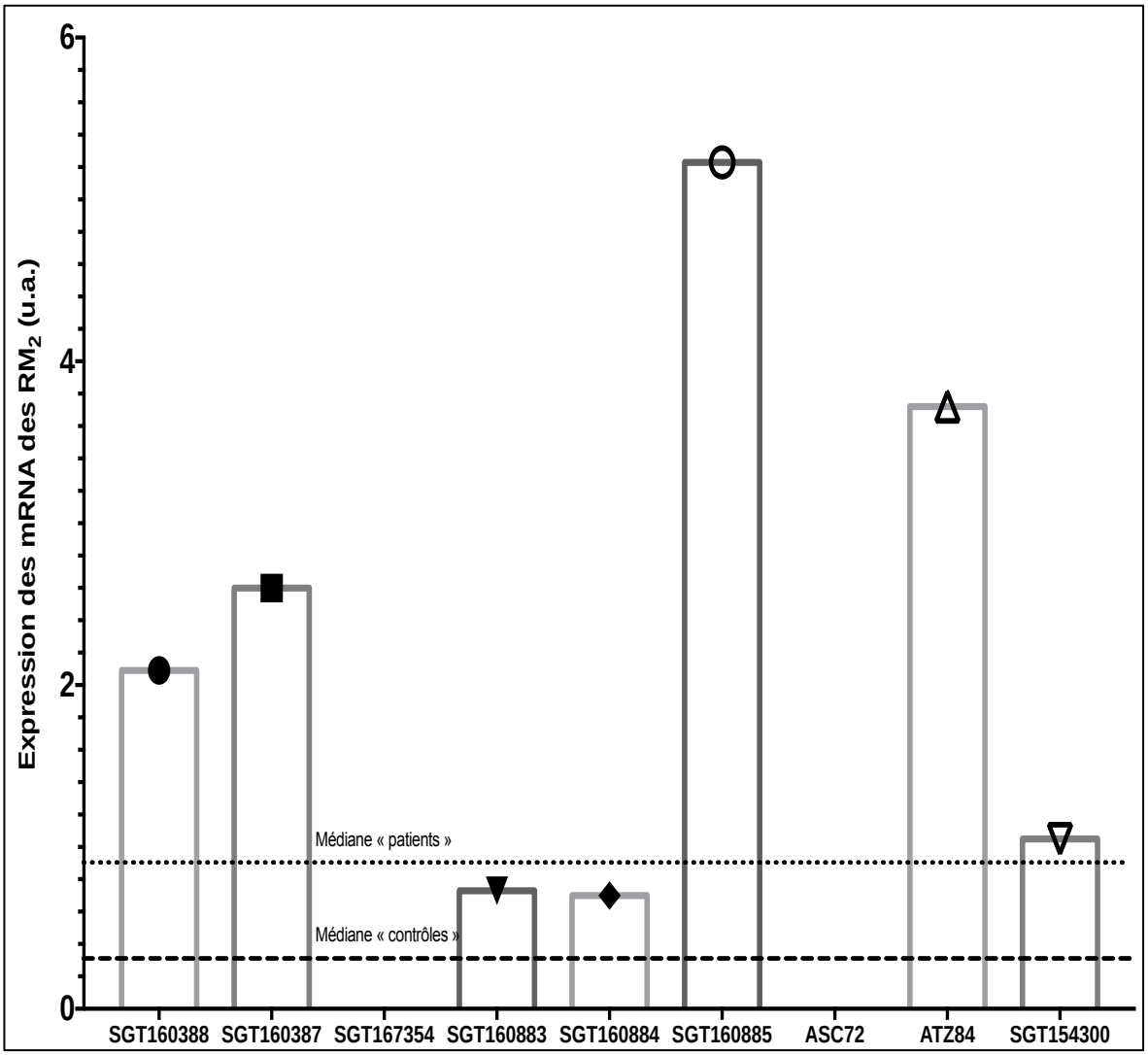


Figure 45. Expression des ARNm circulants des RM_2 dans la famille « MSN »

Les expressions des ARNm circulants de l'AchE chez les mêmes membres de la famille sont les suivantes (figure 46) :

- 2,58 chez le père : surexpression,
- 0,44 chez la mère : pas de surexpression,
- 1,41 chez l'enfant vivant SGT160883 : surexpression,
- 0,56 chez l'enfant vivant SGT160884 : pas de surexpression,
- 2,14 chez l'enfant vivant SGT160885 : surexpression,
- 3,01 chez l'enfant décédé ATZ84 : surexpression,
- 2,92 chez l'enfant décédé SGT154300 : surexpression.

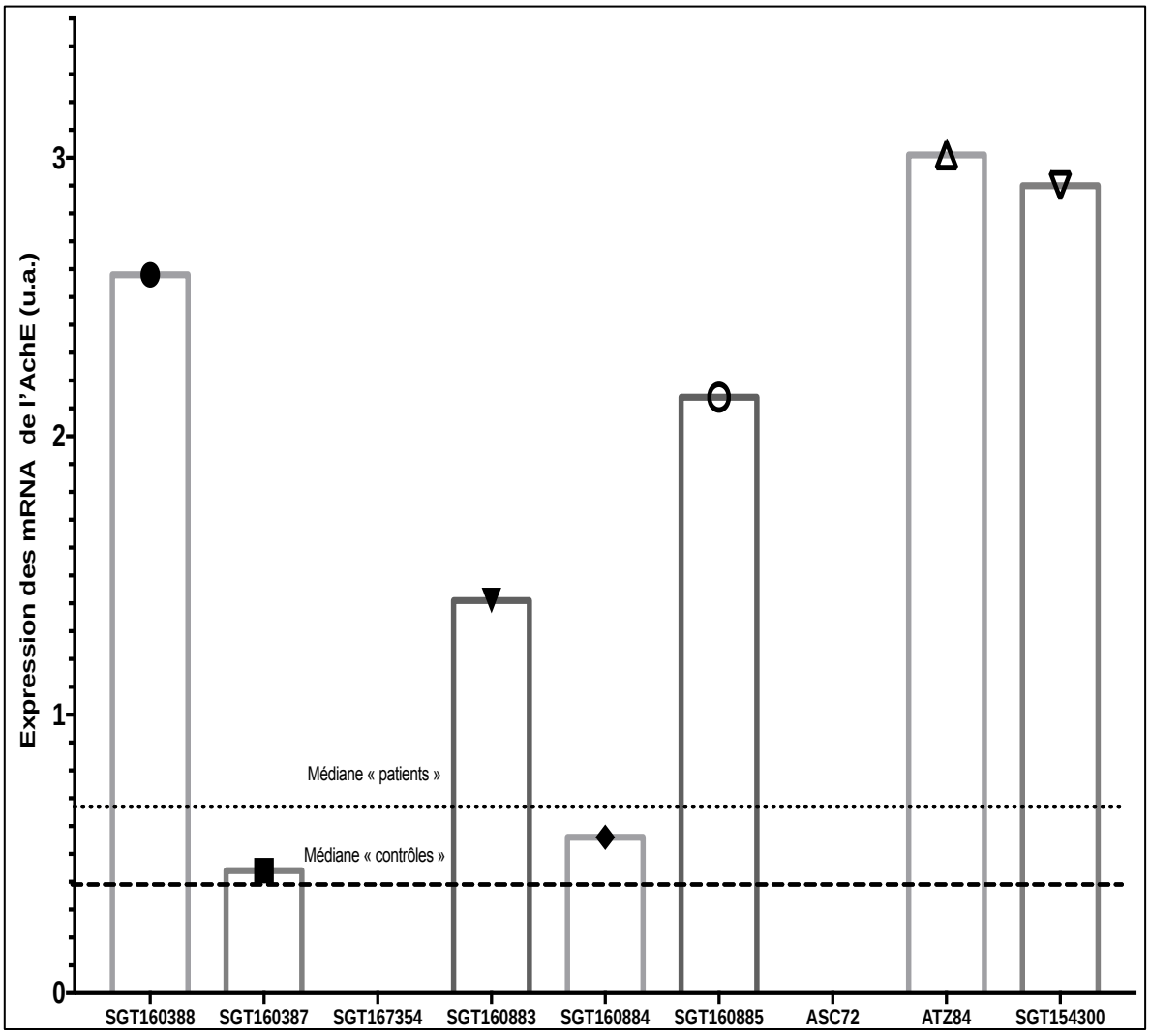


Figure 46. Expression des ARNm circulants de l'AchE dans la famille « MSN »

Analyses génétiques

Différents scénarios ont été testés pour interpréter les résultats bruts fournis par Integragen® :

Transmission d'un variant par le père : mode dominant avec pénétrance incomplète

42 variants transmis par le père et présents chez les 3 enfants décédés de MSN ont été identifiés. Aucun de ces variants n'est actuellement connu pour avoir un lien direct avec la MSN. Seul le variant CACNA2D2, avec une mutation substitution faux-sens Leu1131Phe, a attiré notre attention car il code pour la sous-unité alpha-2/delta des canaux calciques voltage dépendants et pourrait être impliqué dans des épilepsies du jeune enfant (Pippucci *et al.*, 2013).

Transmission d'un variant par le père + un variant transmis par la mère : mode digénisme

En plus des 42 variants transmis par le père, nous avons identifié 68 variants issus de la mère, également présents chez les 3 enfants décédés, dont 1 en lien avec la MSN : CAV3 (figure 42, page 164). Cette mutation substitution faux-sens Cys72Trp est citée dans le domaine protéique de la Caveoline et est notamment impliquée dans des phénotypes pathogènes cardiovasculaires, tels que des cardiopathies hypertrophiques et le syndrome du QT long (Hedley *et al.*, 2013; Taniguchi *et al.*, 2016; Motloch *et al.*, 2017).

Transmission d'un variant par le père + un variant par la mère + un autre variant transmis par le père et l'oncle : mode trigénisme

Avec ce scénario, un 3ème variant d'intérêt a été identifié sur le gène SCUBE2. Cette mutation c.1448-9G>A, c'est-à-dire une substitution adénosine par guanine en -9 de la position c.1448 (exon 14), est présente chez le père, l'oncle et chez tous les enfants mais absente chez la mère. SCUBE2, qui code pour un peptide associé aux récepteurs vasculaires du facteur de croissance (VEGFR), est exprimé dans les cellules endothéliales vasculaires (Lin *et al.*, 2018).

Relation entre les variants identifiés et l'expression des RM_2

Si l'on tient compte de tous ces scénarios et des analyses de l'expression des RM_2, nous constatons que :

- Les 3 enfants décédés présentent les 3 variants CAV3, CACNA2D2 et SCUBE2, ainsi qu'une surexpression des RM_2 pour les 2 enfants analysés (ATZ84 et SGT154300).
- Les 2 enfants sains sans surexpression des RM_2 (SGT160883 et SGT160884) ne présentent que le variant SCUBE2.
- L'enfant sain avec une surexpression des RM_2 (SGT160885) présente 2 variants : CAV3 et SCUBE2.
- La mère ne présente que le variant CAV2 avec une surexpression des RM_2.
- Le père présente les variants CACNA2D2 et SCUBE2 avec une surexpression des RM_2.
- L'oncle présente les variants CACNA2D2 et SCUBE2 sans connaissance du niveau d'expression des RM_2.

On trouve donc les 2 mêmes variants (SCUBE2 et CACNA2D2) chez le père et l'oncle paternel, ainsi que chez les 3 enfants décédés. La mère apporte une mutation absente chez le père et l'oncle, mais présente chez 4 enfants, dont les 3 décédés.

La figure 47 résume l'ensemble de ces résultats :

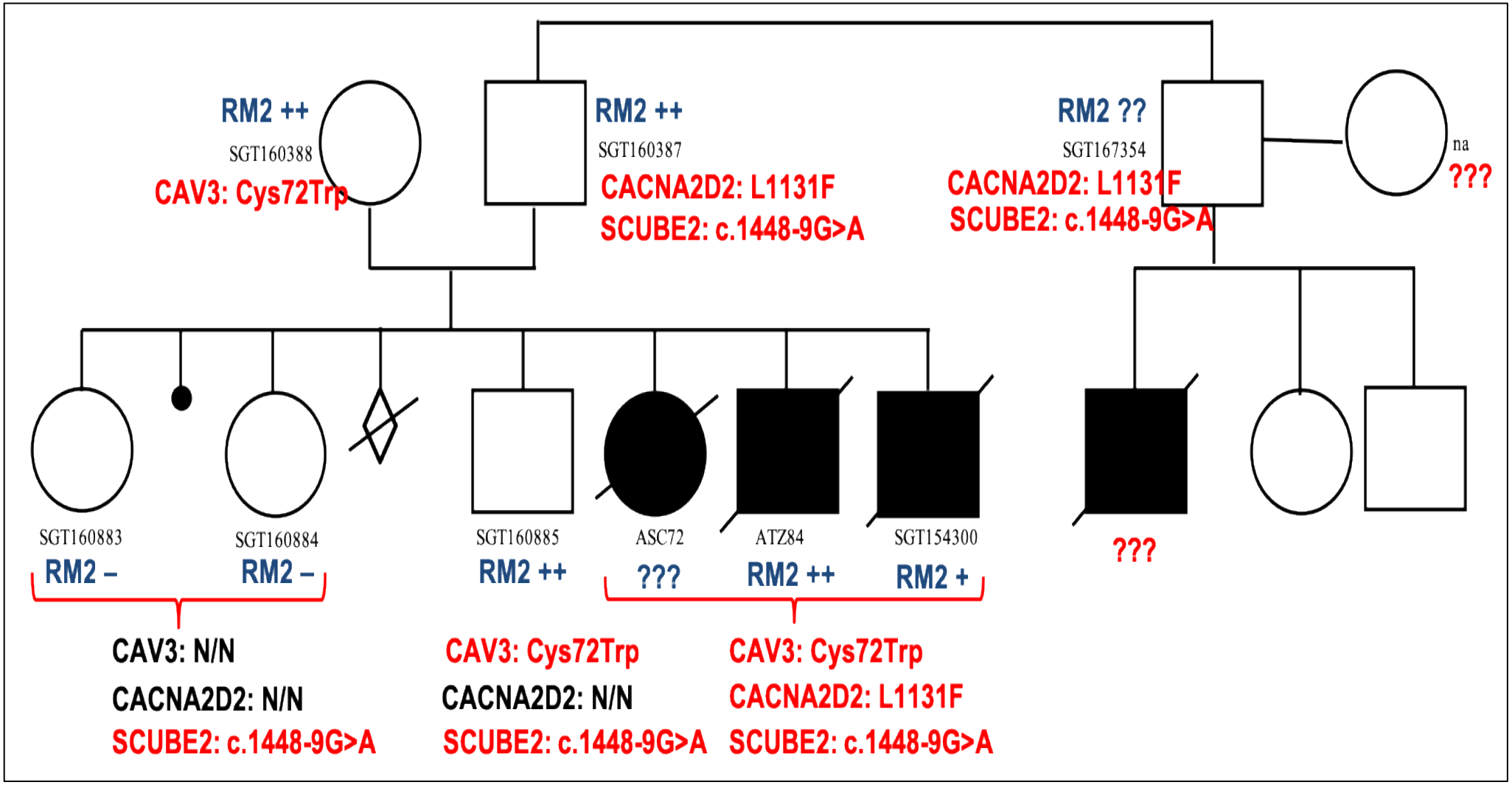


Figure 47. Résumé des résultats combinant les variants identifiés et l'expression sanguine des ARNm des RM_2

Interactions entres les variants identifiés

La figure 48 montre les différentes interactions entre de nombreux gènes, dont les 3 identifiés dans notre famille (encadrés en rouge), ainsi que le gène codant pour les RM_2, CHRM2 (encadré en orange).

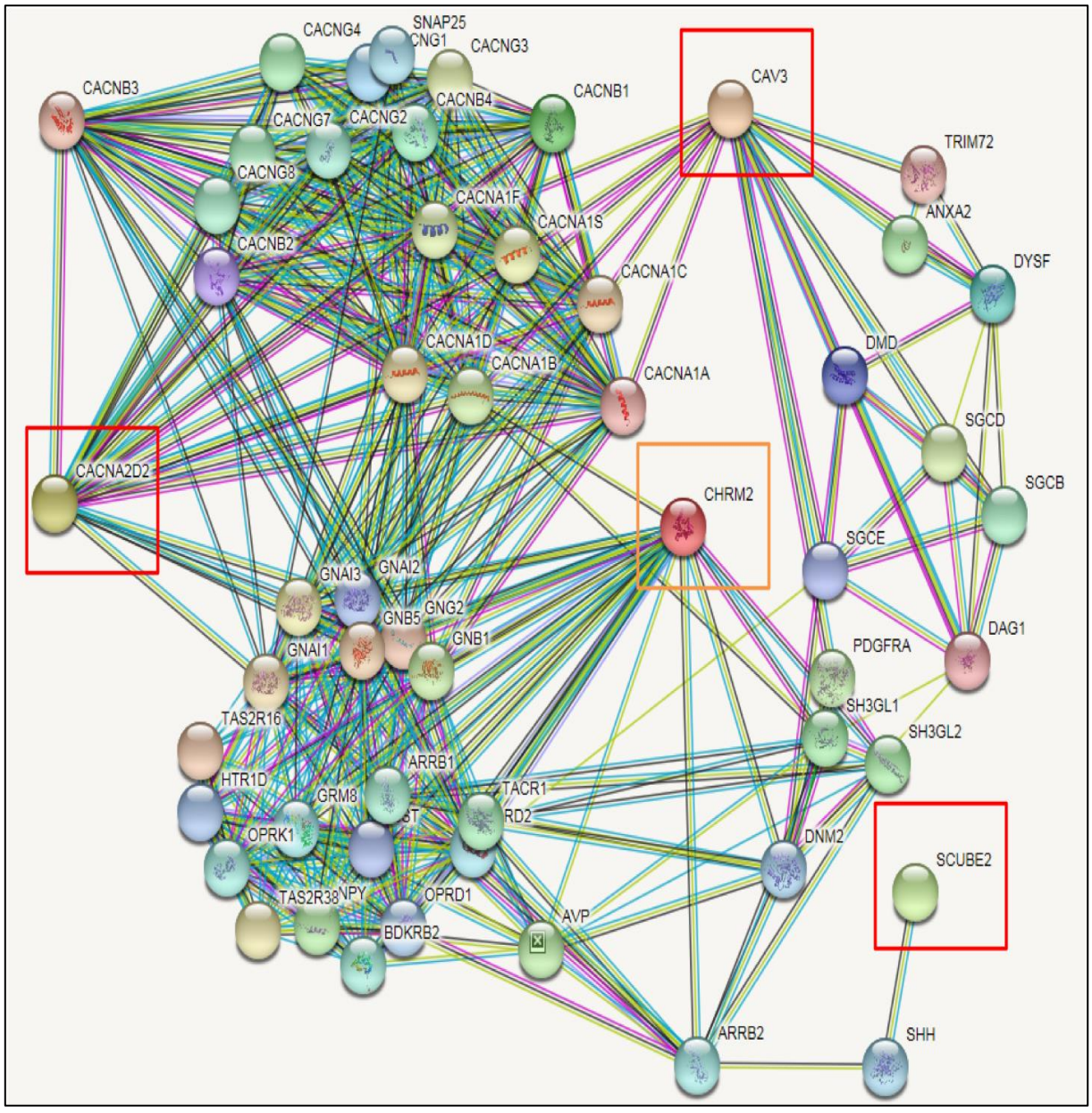


Figure 48 Représentation des relations entre les gènes

Test de pathogénicité du variant SCUBE2 : c.1448-9G>A

Nous avons testé la pathogénicité du variant SCUBE2 (c.1148-9G>C) chez les 6 membres de la famille pour lesquels nous avions de l'ARN : les 2 parents, les 3 enfants sains et le dernier enfant décédé. Le but est d'analyser la pathogénicité de cette mutation en détectant un effet perturbant l'épissage physiologique.

Les amorces ex12F et ex15/16R ont été utilisées en RT-PCR pour amplifier une partie de l'ADNc de SCUBE2 (c.1148-9G>C). Ce couple d'amorces amplifie 2 isoformes du transcript de SCUBE2 en RT-PCR. 2 fragments étaient attendus, l'un de 316 paires de bases et l'autre de 229 paires de bases.

Les amorces utilisées ont bien révélé 2 isoformes physiologiques le contrôle positif ADNc de fibroblastes (flèche noire). En revanche, chez les sujets, l'amplification n'a pas été satisfaisante : on ne détecte qu'une seule isoforme ainsi qu'un épissage aberrant chez tous les membres de la famille (figure 49). L'amplification de GAPDH comme contrôle montre des ARN de bonne qualité (flèche rouge).

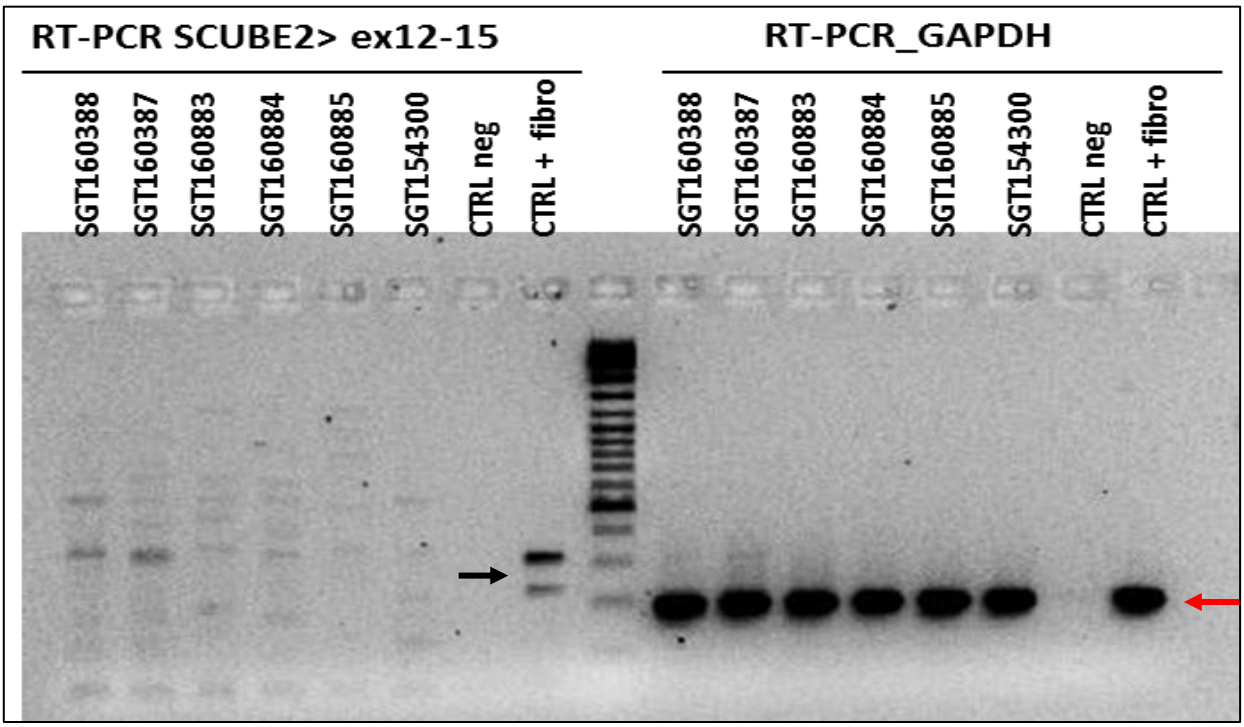


Figure 49. Test de pathogénicité du variant SCUB2 c.1448-9G>A

Discussion

Les premiers résultats de cette étude montrent tout d'abord une possible transmission familiale d'un phénotype biologique potentiellement associé à l'hyperactivité vagale, à savoir la surexpression des RM_2. En effet, on constate que l'expression des ARNm circulants des RM_2 est augmentée chez les parents et chez les enfants. Même si nous avons fixé le « seuil » de surexpression au niveau de la médiane des patients présentant des malaises vagaux, on constate que l'expression des RM_2 est augmentée même chez 2 des enfants sains de la famille « MSN » étudiée comparativement aux sujets contrôles. Ainsi, ces observations renforcent l'idée d'une transmission génétique de cette anomalie biologique, comme nous l'avons constaté chez les lapins (Livolsi *et al.*, 2002, 2010a). Les mêmes hypothèses peuvent être émises concernant l'expression de l'AchE dans cette famille.

L'expression des RM_2 chez le dernier enfant décédé (SGT154300) est 3 fois plus faible que celle de son frère (ATZ84), mort dans les mêmes circonstances, c'est-à-dire une succession de malaises sévères idiopathiques. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les prélèvements sanguins n'ont pas été effectués au même moment de leur développement : à plus de 2 mois pour ATZ84 et à moins de 1 mois pour SGT154300. Or, nous n'avons pas encore validé le dosage de ce paramètre biologique chez des enfants de moins d'un an. Ainsi, il se pourrait que l'expression sanguine des RM_2 soit moindre ou encore incomplète à cet âge, ce qui expliquerait la différence d'expression avec son frère notamment. De plus, il faudrait ensuite comparer cette expression à celle mesurée chez des nouveau-nés contrôles sains.

Les différents scénarios étudiés ont permis d'identifier 3 variants intéressants et potentiellement impliqués, directement ou indirectement dans l'hyperactivité vagale et/ou la MSN. Quelques études ont déjà évoqué l'hypothèse d'un trigénisme dans une pathologie cardiaque (Kuzmin *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2018), par exemple dans des cardiomyopathies hypertrophiques et le syndrome du QT court (Chen *et al.*, 2017). L'hypothèse d'un mode de transmission trigénique est certes peu courante encore mais semble être acceptable dans cette étude. En effet, en considérant

2 phénotypes, MSN et surexpression des ARNm des RM_2, nous constatons que ceux qui présentent ces 2 anomalies phénotypiques, possèdent les 3 mutations identifiées, CAV3, CACNA2D2 et SCUBE2 (du moins pour les 2 enfants décédés chez lesquels nous avons pu analyser les marqueurs sanguins). Le fait que l'oncle exprime également les mêmes variants que le père renforce cette théorie.

Si l'on ne considère que l'événement « MSN », la transmission digénique semble être une hypothèse très probable. En effet, l'association CAV3 (de la mère) – CACNA2D2 (du père) est retrouvée uniquement chez les enfants décédés. Il se pourrait que cette double expression entraîne ce phénotype pathogène de MSN. Cette hypothèse pourrait être étayée si l'on pouvait identifier le variant CAV3 chez la tante ou chez l'un des cousins sains (forcément transmis par la tante, car variant absent chez l'oncle). Mais, il a été impossible de récupérer de l'ADN de ces personnes.

Individuellement, aucun de ces variants n'est directement associé à la MSN ou à des anomalies du système cholinergique. Il se pourrait par contre, qu'en association entre eux ou indirectement par des interactions montrées sur la figure 48, ils jouent un rôle dans ces pathologies. On constate que le variant SCUBE2 semble être plutôt isolé par rapport à CHRM2, CAV3 et CACNA2D2.

De plus, les premiers tests de pathogénicité du variant SCUBE2 en RT-PCR, ne montrent pas d'effet délétère flagrant pour les ARN issus des prélèvements sanguins des 6 membres de la famille. En effet, on constate que les 2 isoformes de SCUBE2 ne s'amplifient pas de la même façon chez les patients testés par rapport au contrôle positif de fibroblastes. Cela suggère peut-être que ce gène n'est pas exprimé dans les lymphocytes (un prélèvement sanguin réalisé sur tube PAXgene® permet d'extraire l'ARN des globules blancs). Ainsi, soit ce gène (SCUBE2) ne s'exprime pas dans le sang et il faudrait donc le tester sur un autre type de prélèvement, du tissu cardiaque par exemple, soit cette mutation n'entraîne pas d'épissage en transcrits matures dans le type cellulaire testé.

.

A l'heure actuelle, seule l'implication directe de CAV3 est connue dans des maladies cardiaques, le syndrome du QT long et les cardiomyopathies

hypertrophiques (Hedley *et al.*, 2013; Taniguchi *et al.*, 2016; Motloch *et al.*, 2017). La prochaine étape consistera à essayer de déterminer la pathogénicité du variant CACNA2D2 identifié dans cette famille.

Perspectives

Les séquençages des exomes de cette famille nous a permis d'avancer des hypothèses, qui répondent bien à l'histoire et aux phénotypes de cette famille. Ce digénisme ou ce trigénisme sont des pistes d'études à approfondir par des tests complémentaires ou par l'apport d'éléments génétiques supplémentaires (autres ADN de la famille, autres familles, …).

Pour ne pas risquer de manquer une autre mutation éventuellement directement impliquée dans la MSN ou dans la surexpression muscarinique, nous allons effectuer un séquençage de tout le génome de certains membres de cette famille. Le but est de vérifier s'il existe une potentielle mutation intronique, qui pourrait entraîner notamment la synthèse de protéines aberrantes, tels que les récepteurs muscariniques par exemple. Cela répondrait peut-être à nos hypothèses. Si l'analyse génomique ne révèle aucun variant d'intérêt, il faudra concentrer les recherches sur les mutations exomiques identifiées par des tests de pathogénicité et des tests fonctionnels sur cultures cellulaires.

Nouvelle famille

Nous avons récemment identifié une nouvelle famille (figure 50) dans laquelle nous allons effectuer les mêmes analyses. Cette famille est constituée d'un couple (mère et père) avec un enfant de moins d'un an, qui a présenté plusieurs malaises sévères idiopathiques (iALTE). Aucune étiologie n'a pour l'instant été identifiée pour ces malaises et l'enfant est toujours vivant. Cette famille a attiré notre attention, car les circonstances des malaises sont très similaires aux malaises présentés par les enfants de la famille précédente avant leur décès suite à ces malaises. De plus,

d'autres cas de MSN ont été recensés dans cette nouvelle famille : 1 du côté du père et 1 autre du côté de la mère.

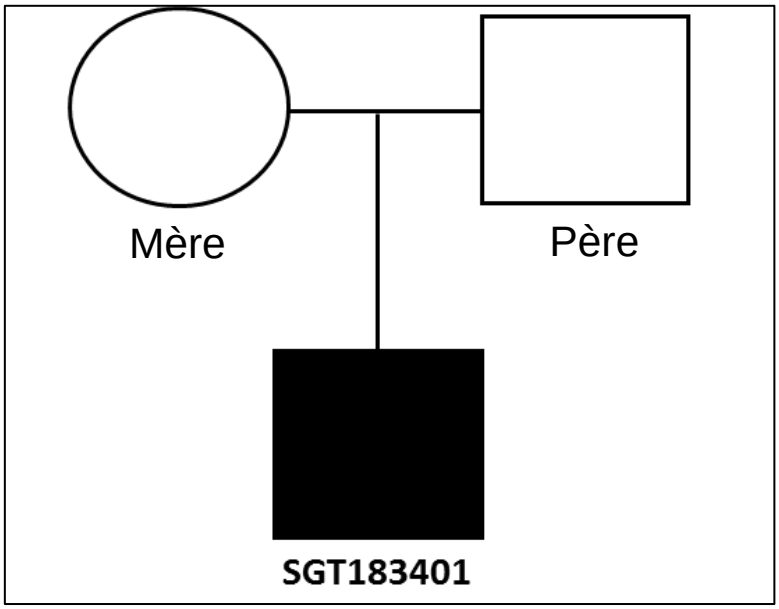


Figure 50. Présentation de la nouvelle famille à l'étude

Nous avons pu récupérer de l'ADN et du sang des parents et de l'enfant. Nous allons prochainement effectuer le séquençage haut débit des exomes de cette famille, ainsi qu'un séquençage du génome de l'enfant en parallèle de ceux effectués dans l'autre famille. A l'heure actuelle, nous avons déjà entrepris quelques analyses préliminaires : expression des ARNm circulants des RM_2 et de l'AchE ainsi qu'une recherche directe des variants CAV3 et CACNA2D2 chez l'enfant.

Expression sanguine des ARNm des RM_2 et de l'AchE

L'analyse de ces paramètres biologiques sanguins a montré une surexpression des RM_2 et de l'AchE chez le père et chez l'enfant. En effet, on constate sur les figures 51 et 52, qu'ils présentent tous les 2 un niveau d'expression de ces ARNm bien supérieur à celui des malades présentant des malaises vagaux (médiane « patients » utilisée comme seuil de surexpression, comme dans la famille précédente). Ainsi, comme dans notre famille « MSN », nous constatons une transmission de ces anomalies génétiques par le père.

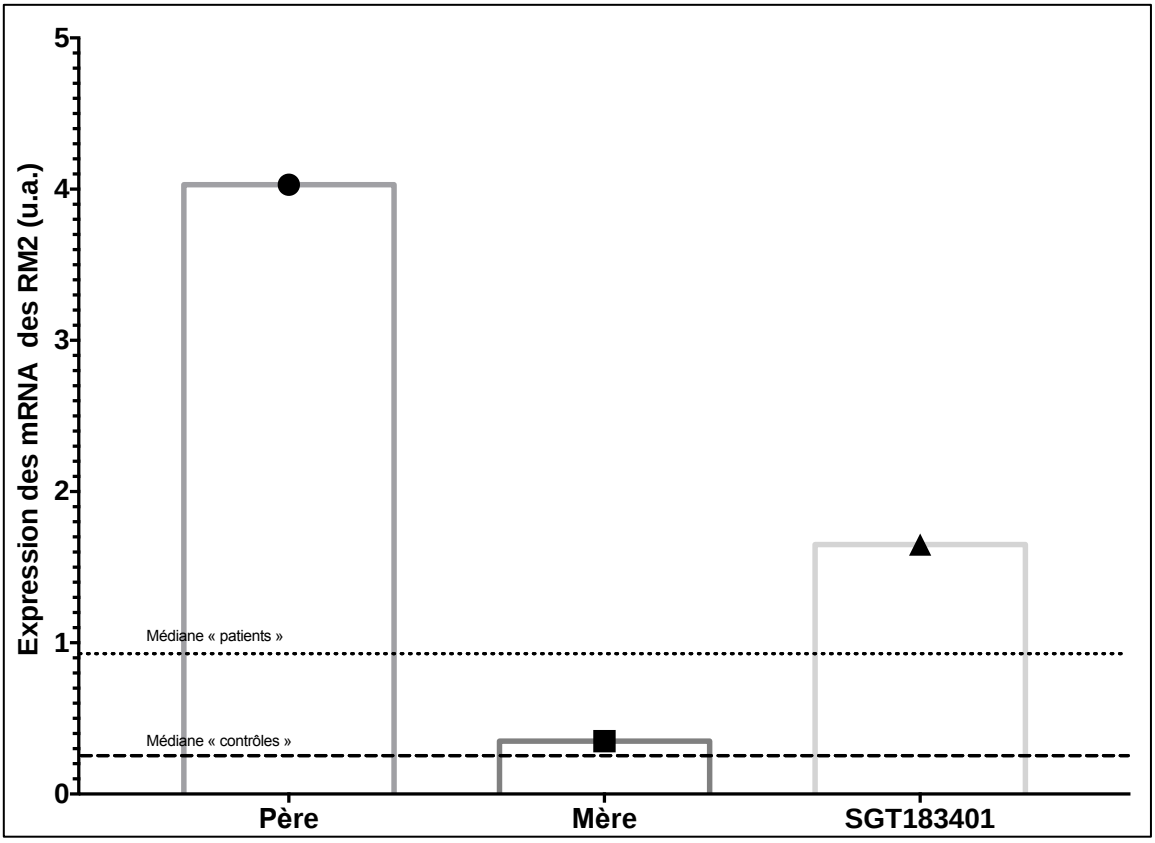


Figure 51. Expression des ARNm circulants des RM_2 dans la nouvelle famille.

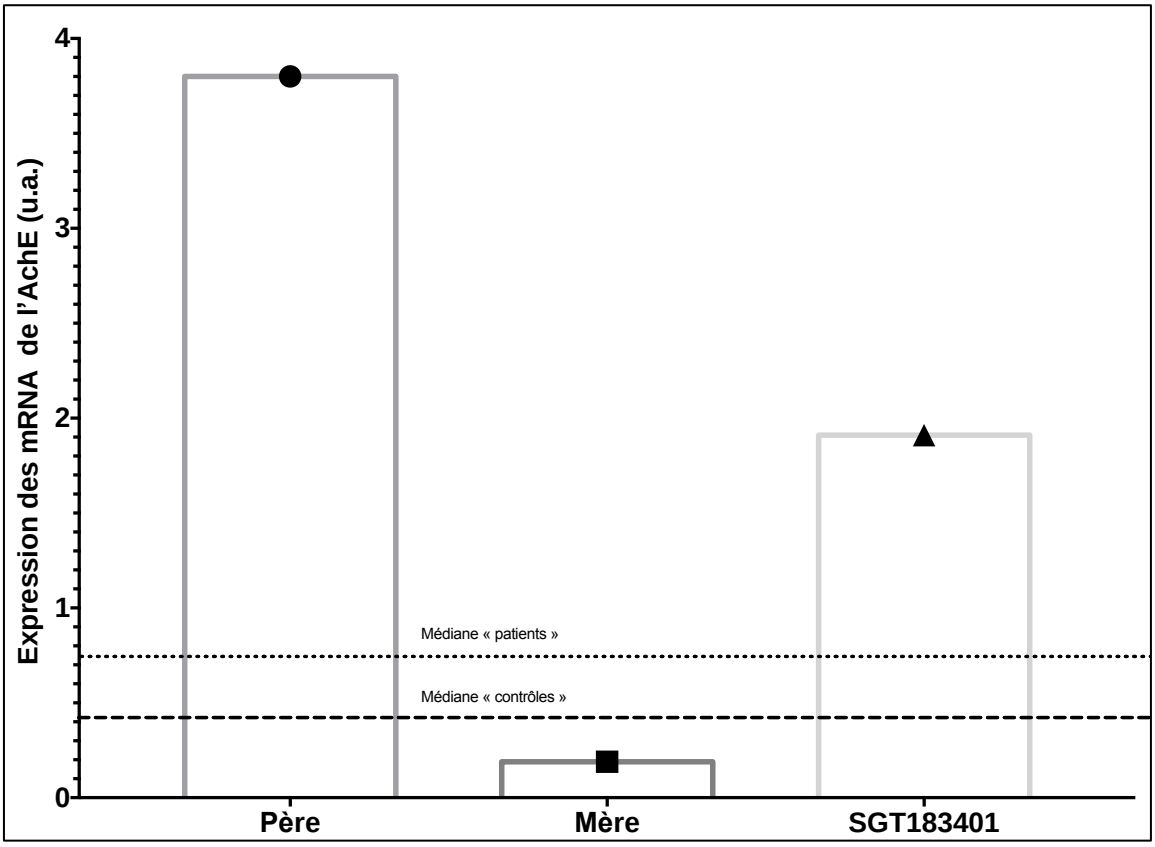


Figure 52. Expression des ARNm circulants de l'AchE dans la nouvelle famille.

Recherche directe des variants CAV3 et CACNA2D2

Avant de réaliser le séquençage haut débit de l'exome, nous avons testé par séquençage SANGER les mutations CAV3 (Cys72Trp) et CACNA2D2 (L1131F) chez l'enfant de cette nouvelle famille.

Nous constatons une absence des mutations connues dans les gènes candidats CAV3 et CACNA2D2 chez cet enfant (figure 53). En effet, on remarque que les séquences de nucléotides de l'enfant (2ème ligne en couleur) sont identiques à celles de référence (1ère ligne en noire).

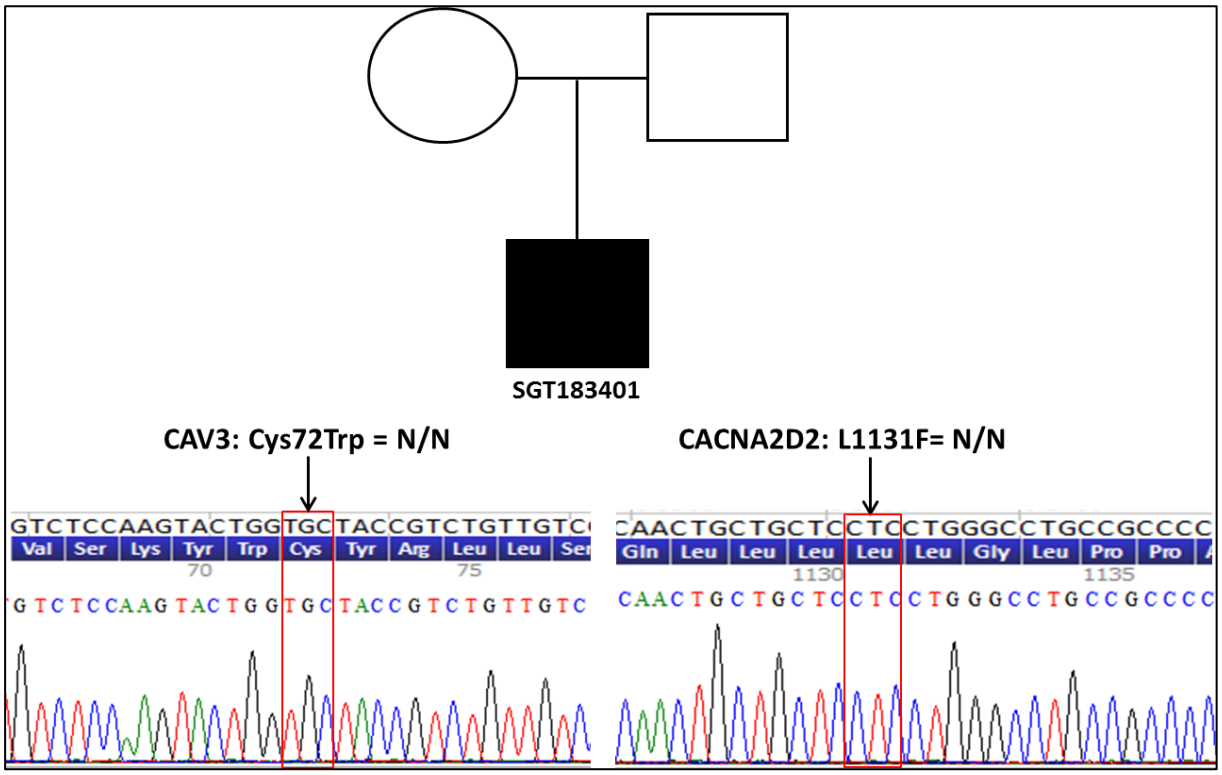


Figure 53. Recherche des variants CAV3 et CACNA2D2 chez l'enfant de la nouvelle famille.

Ces premiers résultats génétiques ne renforcent pas notre hypothèse. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure la présence de mutations différentes dans ces 2 gènes candidats CAV3 et CACNA2D2. Les prochaines analyses sur les exomes et les génomes vont peut-être nous apporter de nouvelles pistes à étudier.

DISCUSSION GENERALE

Les résultats sont discutés dans chaque partie correspondante. Dans cette partie « discussion générale », nous soulignerons donc principalement les points qui n'ont pas été abordés précédemment, notamment ceux qui concernent les méthodes expérimentales.

Les résultats globaux de ces travaux sont cohérents avec ceux observés dans les précédentes études chez le lapin et dans les cœurs de MSN (Livolsi *et al.*, 2010a, 2010b). En effet, nous constations les mêmes anomalies du système cholinergique que celles qui ont été observées dans tous les groupes étudiés : chez des adultes et des enfants présentant des malaises vagaux, chez des nourrissons présentant des malaises sévères idiopathiques et chez des enfants décédés de MSN. Ces résultats suggèrent que l'activité exagérée du système vagal pourrait être impliquée dans ces pathologies. Toutefois, malgré des situations cliniques apparemment bien définies, on constate une grande variabilité interindividuelle de l'expression des RM_2 et de l'AchE. Des patients présentant l'une de ces pathologies n'ont pas toujours une surexpression des paramètres biologiques analysés, et inversement. Cela rend pour le moment difficile la définition d'un seuil de positivité (surexpression), ainsi que la validation de ces paramètres biologiques en tant que « marqueur » (de risque) d'hyperactivité vagale. En effet, un tel marqueur doit d'être spécifique et sensible pour une pathologie, or pour des situations cliniques données, notamment les malaises vagaux ; la grande variabilité de l'expression des RM_2 limite son utilisation en tant que marqueur. Des études ultérieures devront viser à caractériser plus précisément les malades pour tenter de limiter cette variabilité interindividuelle. Néanmoins, ce paramètre biologique pourrait dans certains cas aider au diagnostic du malaise, lorsque les tests cliniques n'apportent pas de réponses précises. Cela est encore plus vrai dans les cas de iALTE, pour lesquels aucune étiologie n'est identifiée, et ainsi ce dosage permettrait une orientation diagnostique vers un dysfonctionnement du système vagal.

Une surexpression des ARNm circulants n'est pas toujours le reflet d'une augmentation de la synthèse de leurs protéines. Ainsi, la question est de savoir si la surexpression des RM_2 observée dans le sang de nos patients est associée à une augmentation de la densité de ces récepteurs dans le cœur notamment. Nos hypothèses se basent sur les résultats précédemment obtenus chez les lapins

et dans les tissus cardiaques des MSN. En effet, ces études ont montré une corrélation directe entre l'expression lymphocytaire des ARNm et la densité myocardique des RM_2. Ne pouvant pas réaliser de tests de liaison spécifique sur des tissus cardiaques chez les sujets de nos études (biopsie cardiaque proscrite), nous avons extrapolé ces observations à nos études actuelles. Nous considérons donc, que la surexpression observée dans le sang est le reflet d'une surexpression cardiaque.

Les premières observations de l'augmentation d'activité et de la surexpression de l'AchE ont permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle il s'agit d'un mécanisme de compensation de la surexpression muscarinique. Dans les études présentées dans cette thèse, nous constatons également une surexpression de l'AchE associée, dans la plupart des cas, à la surexpression des RM_2. Cependant, il est difficile de savoir si la surexpression de l'AchE est vraiment secondaire à celle des RM_2, ou si elle est présente physiologiquement. Or, en analysant les rapports d'expression RM_2/AchE, on constate que chez les patients ces rapports sont significativement en faveur des RM_2. On peut donc supposer que la surexpression de l'AchE semble être insuffisante ou incomplète dans certains cas pour éviter la survenue de malaises vagaux ou de iALTE.

L'extraction des ARNm à partir des prélèvements sanguins sur tubes PAXgene® a été effectuée de manière automatique, à l'aide du QIAcube® (Qiagen®). Cette méthode permet une extraction rapide, fiable et reproductible avec un biais lié à l'expérimentation assez faible. Nous constatons, sur l'exemple de dosage des ARNm par le Nanodrop 2000® (figure 21), que les quantités d'ARNm extraites sont importantes avec une bonne pureté, évaluée par l'analyse des ratios d'absorption 260/280 et 260/230. Sur cet exemple, nous voyons un pic d'absorption à 260nm qui reflète bien la présence d'ARN, sans pic à 280nm définissant la présence d'ADN. Les ratios d'absorption entre 260nm (ARN) et 280nm (ADN) « ratio 260/280 » sont tous supérieurs à 2 (figure 21), ce qui valide la pureté de l'extraction d'ARN sans présence d'ADN (Bastard *et al.*, 2002). Les ratios d'absorption entre 260nm et 230nm (260/230) ne sont pas très satisfaisants (inférieur à 1,8) pour tous les échantillons, ce qui reflète une contamination des extraits par des agents co-purifiés, tels que des solvants, des sels ou des contaminants

organiques (Bastard *et al.,* 2002). Cela pourrait être dû à la solution tampon présente dans les tubes PAXgene®, mais ne semble pas interférer dans les dosages des ARNm. En effet, lorsque l'on regarde les courbes de fusion des qPCR, nous ne constatons qu'un seul pic, reflet de l'amplification d'un seul élément lors de l'expérience, à savoir de l'ARN. Cette courbe de fusion permet de valider le fait que seul de l'ARN a été amplifié et non les contaminants constatés au Nanodrop®.

Nous avons évalué l'expression des ARNm des RM_2 et de l'AchE par RT-qPCR en utilisant une gamme « standard », constituée d'un mélange d'ARN de 70 individus, représentant la population générale adulte et enfant. La solution mère D1 a été diluée au 1/5ème en cascade, de D1 (1,00) à D6 (0,00032) afin d'obtenir cette gamme de dilution pour permettre la quantification des ARNm étudiés. Nous obtenons une quantité « relative » d'ARN par rapport à cet échantillon « standard ». Nous avons utilisé la même gamme pour l'ensemble des études car nous avons considéré qu'elle était le reflet de la population globale. Néanmoins, compte tenu des variations d'expression de l'ARN circulant en fonction de l'âge notamment, il serait judicieux de constituer une gamme standard pour les jeunes enfants, surtout pour les moins d'un an. Ainsi, il faudrait prélever un grand nombre de nourrissons témoins mais cela constitue une étude à part entière.

Pour réaliser cette quantification par PCR, nous avons utilisé des amorces réalisées à partir des séquences spécifiques pour les gènes à l'étude, CHMR2 pour les RM_2, ACHE pour l'AchE et 18S ribosomal (SIGMA®). Ces amorces ont une bonne efficacité, comme nous pouvons le voir sur la figure 22, avec une pente de 3,4, qui correspond à une efficacité de 97% (E = 1,968). Durant toutes les expériences, cette efficacité a varié de 80 à 100% pour les 3 gènes.

Le dosage des paramètres biologiques (ARNm circulants des RM_2 et de l'AchE) a été pondéré par l'expression du gène de ménage 18S. Cela nous permet de nous affranchir des variations interindividuelles de la quantité d'ARN totale extraite des prélèvements sanguins (Livak and Schmittgen, 2001; Azarpeykan and Dittmer, 2016). En effet, la quantité d'ARN dans le sang varie entre les sujets et chez un même sujet en fonction de l'âge (Chomczynski *et al.*, 2016). Le gène de ménage est le reflet de cette variation, notamment du nombre de cellules sanguines

exprimant ces ARN. Ainsi, pour pouvoir comparer l'expression des gènes cibles (CHRM2 et ACHE) entre les individus à l'étude, il était important de nous affranchir de cette variation interindividuelle en normalisant les dosages par le niveau d'expression du gène de ménage.

Dans nos études nous avons utilisé le gène de ménage ribosomal 18S pour normaliser nos dosages. Ce gène est reconnu pour sa stabilité par rapport à l'expression des ARNm dans les cellules sanguines, notamment les lymphocytes (Bas *et al.*, 2004; Bustin, 2002; Suzuki *et al.*, 2000). Le choix de ce gène de ménage était donc logique dès le début des études dans le domaine de l'hyperactivité vagale ainsi que dans nos travaux récents, afin de pouvoir comparer nos résultats à ceux des autres études.

Le protocole établi pour évaluer l'expression des ARNm circulants a permis d'effectuer des expériences reproductibles et de bonne qualité. Nous avons pu facilement comparer les résultats entre les différentes études et réaliser des analyses croisées (médiane « patients » de l'étude malaises vagaux utilisée comme seuil de surexpression pour l'étude génétique, par exemple). Des petites modifications pourront toutefois être apportées afin d'améliorer ces dosages, telle que la création d'une gamme standard mieux adaptée aux enfants de moins d'un an, voire aux nouveau-nés.

Nous avons validé le dosage des ARNm dans le sang humain, ce qui était la première interrogation avant ces travaux. De plus, il s'avère que ces analyses sont possibles et fiables chez les adultes et les enfants, mêmes chez les moins d'un an. Néanmoins, la question persiste pour les dosages chez des nouveau-nés âgés de moins d'un mois et chez les nourrissons décédés de MSN, avec un prélèvement post-mortem, pour lesquels nous n'avons pas de références.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons donc pu valider plusieurs hypothèses durant ces travaux, notamment celle évoquant l'hyperactivité vagale, exprimée biologiquement par une surexpression des RM_2 sanguins, comme élément physiopathologique commun à plusieurs pathologies : les malaises vagaux, les malaises inexpliqués de l'enfant de moins d'un an (iALTE) et la MSN. En effet, dans les 3 parties de cette thèse, nous avons pu confirmer l'existence de cette anomalie biologique dans ces 3 groupes de patients.

L'hypothèse de l'implication de cette hyperactivité vagale dans certains cas de MSN a été évoquée depuis le début des années 2000 au cours de différentes études, nous avons pu étendre des résultats obtenus chez le lapin aux nourrissons. Les travaux et résultats d'aujourd'hui sont le fruit d'un projet de recherche translationnelle. Néanmoins, nous ne sommes pourtant encore qu'au début de la validation d'un possible marqueur d'hyperactivité vagale et/ou iALTE/MSN. Les prochaines études concerneront principalement les enfants de moins d'un an, population à risque d'iALTE ou de MSN. L'étude « iALTE », en cours, constitue la première étape de ces futurs projets de recherche.

Afin d'adapter au mieux ces analyses à la prise en charge hospitalière de ces nourrissons, nous allons également travailler à la mise au point d'une nouvelle méthode de dosage de ces paramètres biologiques à partir d'un prélèvement sanguin standard sur tube EDTA (4mL) ou microEDTA (0,4mL) pour les plus jeunes enfants. Cette technique permettrait l'analyse de l'expression des microARN plasmatiques des RM_2 et de l'AchE. Cette méthode est notamment déjà beaucoup utilisée en cancérologie pour le diagnostic et le suivi thérapeutique.

Enfin, l'aspect génétique pourrait être un axe majeur de nos futures recherches dans la MSN. En effet, avec les avancées importantes dans ce domaine, il est aujourd'hui très facile d'accéder à des techniques de pointe, qui permettraient probablement de répondre à beaucoup de questions sur cette pathologie. En plus des séquençages des génomes déjà en cours, nous avons également amendé le protocole « iALTE » afin de pouvoir repérer et analyser génétiquement des familles présentant plusieurs cas d'iALTE ou de MSN, dans le but d'identifier enfin une ou plusieurs mutation(s) impliquée(s) dans ces pathologies ou pouvant expliquer les anomalies biologiques associés à l'hyperactivité vagale.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ackerman M, Atkins DL, and Triedman JK (2016) Sudden cardiac death in the young. *Circulation* 133:1006.

2. Adamopoulos C, Greney H, Beutelstetter M, Bousquet P, and Livolsi A (2016) Expression of Circulating Muscarinic Receptors in Infants With Severe Idiopathic Life-Threatening Events. *JAMA Pediatr* 170:707–708.

3. Alboni P, Alboni M, and Bertorelle G (2008) The origin of vasovagal syncope: to protect the heart or to escape predation? *Clin Auton Res* 18:170.

4. Alexander SPH, Mathie A, and Peters JA (2009) Guide to Receptors and Channels, 2nd edition (2007 Revision). *British Journal of Pharmacology* 150:S1–S1.

5. Almquist A, Gornick C, Benson W, Dunnigan A, and Benditt DG (1985) Carotid sinus hypersensitivity: evaluation of the vasodepressor component. *Circulation* 71:927–936.

6. American Academy of Pediatrics AAP Task Force on Infant Positioning and SIDS: Positioning and SIDS (1992). *Pediatrics* 89:1120–1126.

7. Anderson HR, and Cook DG (1997) Passive smoking and sudden infant death syndrome: review of the epidemiological evidence. *Thorax* 52:1003–1009.

8. Arthur W, and Kaye GC (2000) The pathophysiology of common causes of syncope. *Postgrad Med J* 76:750–753.

9. Azarpeykan S, and Dittmer KE (2016) Evaluation of housekeeping genes for quantitative gene expression analysis in the equine kidney. Journal of Equine Science 27:165.

10. Bany U, Ryzewski J, and Maśliński W (1999) Relative amounts of mRNA encoding four subtypes of muscarinic receptors (m2-m5) in human peripheral blood mononuclear cells. *J Neuroimmunol* 97:191–195.

11. Bas A, Forsberg G, Hammarström S, and Hammarström M-L (2004) Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. Scand J Immunol 59:566–573.

12. Bastard J, Chambert S, Ceppa F, Coude M, Grapez E, Loric S, Muzeau F, Spyratos F, Poirier K, Copois V, Tse C, and Bienvenu T (2002) Les méthodes d'extraction et de purification des ARN. *Ann Biol Clin* 60(5):513-23.

13. Beal S (1989) Sudden infant death syndrome in twins. *Pediatrics* 84:1038–1044.

14. Beal S, and Porter C (1991) Sudden infant death syndrome related to climate. *Acta Paediatr Scand* 80:278–287.

15. Béchir M, Binggeli C, Corti R, Chenevard R, Spieker L, Ruschitzka F, Lüscher TF, and Noll G (2003) Dysfunctional Baroreflex Regulation of Sympathetic Nerve Activity in Patients With Vasovagal Syncope. *Circulation* 107:1620–1625.

16. Beckwith JB (1973) The sudden infant death syndrome. *Curr Probl Pediatr* 3:1–36.

17. Benchimol M, and Oliveira-Souza R (2008) Diagnostic relevance of the carotid sinus massage during a head up tilt table test (HUTT). *Arq Bras Cardiol* 90:264–267.

18. Benditt DG, Fabian W, Iskos D, and Lurie KG (1998) Review article: heart rate and blood pressure control in vasovagal syncope. *J Interv Card Electrophysiol* 2:25–32.

19. Bergman AB (1970) Synthesis. In: Sudden infant death syndrome. Eds Bergman AB, Beckwith JB, Ray CG. *Seattle: University of Washington Press*, p. 210-21.

20. Bergström L, Lagercrantz H, and Terenius L (1984) Post-mortem analyses of neuropeptides in brains from sudden infant death victims. *Brain Res* 323:279–285.

21. Berntson GG, Bigger JT, Eckberg DL, Grossman P, Kaufmann PG, Malik M, Nagaraja HN, Porges SW, Saul JP, Stone PH, and Molen MWVD (1997) Heart rate variability: Origins, methods, and interpretive caveats. *Psychophysiology* 34:623–648.

22. Bevegård BS, and Shepherd JT (1966) Circulatory effects of stimulating the carotid arterial stretch receptors in man at rest and during exercise. *J Clin Invest* 45:132–142.

23. Bharati S, Krongrad E, and Lev M (1985) Study of the conduction system in a population of patients with sudden infant death syndrome. *Pediatr Cardiol* 6:29–40.

24. Blair PS, Sidebotham P, Berry PJ, Evans M, and Fleming PJ (2006) Major epidemiological changes in sudden infant death syndrome: a 20-year population-based study in the UK. *Lancet* 367:314–319.

25. Blair PS, Sidebotham P, Pease A, and Fleming PJ (2014) Bed-sharing in the absence of hazardous circumstances: is there a risk of sudden infant death syndrome? An analysis from two case-control studies conducted in the UK. *PLoS ONE* 9:e107799.

26. Bogdan C (2011) Regulation of lymphocytes by nitric oxide. *Methods Mol Biol* 677:375–393.

27. Bonner TI, Young AC, Brann MR, and Buckley NJ (1988) Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron* 1:403–410.

28. Brignole M, Moya A, de Lange FJ, Deharo J-C, Elliott PM, Fanciulli A, Fedorowski A, Furlan R, Kenny RA, Martiın A, Probst V, Reed MJ, Rice CP, Sutton R, Ungar A, and van Dijk JG (2018) [2018 ESC Guidelines for the diagnosis and management of syncope]. *Kardiol Pol* 76:1119–1198.

29. Broadbelt KG, Paterson DS, Belliveau RA, Trachtenberg FL, Haas EA, Stanley C, Krous HF, and Kinney HC (2011) Decreased GABAA receptor binding in the medullary serotonergic system in the sudden infant death syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 70:799–810.

30. Brooks JG (1992) Apparent life-threatening events and apnea of infancy. *Clin Perinatol* 19:809–838.

31. Brownstein CA, Poduri A, Goldstein RD, and Holm IA (2018) The Genetics of Sudden Infant Death Syndrome, in *SIDS Sudden Infant and Early Childhood Death: The Past, the Present and the Future* (Duncan JR, and Byard RW eds) p, University of Adelaide Press, Adelaide (AU).

32. Buckley NJ, Bonner TI, and Brann MR (1988) Localization of a family of muscarinic receptor mRNAs in rat brain. *J Neurosci* 8:4646–4652.

33. Bustin SA (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. J Mol Endocrinol 29:23–39.

34. Byard RW (1991) Possible mechanisms responsible for the sudden infant death syndrome. *J Paediatr Child Health* 27:147–157.

35. Byard RW, and Moore L (1993) Gastroesophageal reflux and sudden infant death syndrome. *Pediatr Pathol* 13:53–57.

36. Byard RW (1995) Sudden infant death syndrome - a “diagnosis” in search of a disease. *J Clin Forensic Med* 2:121–128.

37. Byard RW, and Krous HF (2003) Sudden infant death syndrome: overview and update. *Pediatr Dev Pathol* 6:112–127.

38. Byard RW (2018) Sudden Infant Death Syndrome: Definitions, in *SIDS Sudden Infant and Early Childhood Death: The Past, the Present and the Future* (Duncan JR, and Byard RW eds) p, University of Adelaide Press, Adelaide (AU).

39. Carod-Artal FJ (2018) Infectious diseases causing autonomic dysfunction. *Clin Auton Res* 28:67–81.

40. Caulfield MP (1993) Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther* 58:319–379.

41. Caulfield MP, and Birdsall NJM (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Pharmacol Rev* 50:279–290.

42. Chapleau MW, and Sabharwal R (2011) Methods of assessing vagus nerve activity and reflexes. *Heart Fail Rev* 16:109–127.

43. Chen Y, Barajas-Martinez H, Zhu D, Wang X, Chen C, Zhuang R, Shi J, Wu X, Tao Y, Jin W, Wang X, and Hu D (2017) Novel trigenic CACNA1C/DES/MYPN mutations in a family of hypertrophic cardiomyopathy with early repolarization and short QT syndrome. *J Transl Med* 15:78.

44. Chomczynski P, Wilfinger WW, Eghbalnia HR, Kennedy A, Rymaszewski M, and Mackey K (2016) Inter-Individual Differences in RNA Levels in Human Peripheral Blood. PLoS ONE 11:e0148260.

45. Chong A, Murphy N, and Matthews T (2000) Effect of prone sleeping on circulatory control in infants. *Arch Dis Child* 82:253–256.

46. Colman N, Nahm K, Ganzeboom KS, Shen WK, Reitsma J, Linzer M, Wieling W, and Kaufmann H (2004) Epidemiology of reflex syncope. *Clin Auton Res* 14:i9–i17.

47. Combrinck M, and Byard RW (2011) Infant asphyxia, soft mattresses, and the “trough” effect. *Am J Forensic Med Pathol* 32:213–214.

48. Coombs RRA, McLaughlan P (1983) The modified anaphylactic hypothesis for sudden infant death syndrome. In: Sudden infant death syndrome. Eds Tildon JA, Roeder LM, Steinschneider A. *New York: Academic Press*, p. 531-8.).

49. Cooper R, Potter A, Watson L, and Yelland J (1995) Co-sleeping in infancy. *J Paediatr Child Health* 31:60–61.

50. Courts C, and Madea B (2010) Genetics of the sudden infant death syndrome. Forensic Sci Int 15;203(1-3):25-33.

51. Davies DP, and Gantley M (1994) Ethnicity and the aetiology of sudden infant death syndrome. *Arch Dis Child* 70:349–353.

52. Denoroy L, Gay N, Gilly R, Tayot J, Pasquier B, and Kopp N (1987) Catecholamine synthesizing enzyme activity in brainstem areas from victims of sudden infant death syndrome. *Neuropediatrics* 18:187–190.

53. Dick A, and Ford R (2009) Cholinergic and oxidative stress mechanisms in sudden infant death syndrome. *Acta Paediatr* 98:1768–1775.

54. Duncan JR, Garland M, Myers MM, Fifer WP, Yang M, Kinney HC, and Stark RI (2009) Prenatal nicotine-exposure alters fetal autonomic activity and medullary neurotransmitter receptors: implications for sudden infant death syndrome. *J Appl Physiol* 107:1579–1590.

55. Duncan JR, Paterson DS, Hoffman JM, Mokler DJ, Borenstein NS, Belliveau RA, Krous HF, Haas EA, Stanley C, Nattie EE, Trachtenberg FL, and Kinney HC (2010) Brainstem serotonergic deficiency in sudden infant death syndrome. *JAMA* 303:430–437.

56. Duncan JR, and Byard RW (2018) Sudden Infant Death Syndrome: An Overview, in *SIDS Sudden Infant and Early Childhood Death: The Past, the Present and the Future* (Duncan JR, and Byard RW eds) p, University of Adelaide Press, Adelaide (AU).

57. Durand DJ, Espinoza AM, and Nickerson BG (1990) Association between prenatal cocaine exposure and sudden infant death syndrome. *J Pediatr* 117:909–911.

58. Dwyer T, Ponsonby AL, Gibbons LE, and Newman NM (1991) Prone sleeping position and SIDS: evidence from recent case-control and cohort studies in Tasmania. *J Paediatr Child Health* 27:340–343.

59. Eva C, Ferrero P, Rocca P, Funaro A, Bergamasco B, Ravizza L, and Genazzani E (1989) [3H]N-methylscopolamine binding to muscarinic receptors in human peripheral blood lymphocytes: characterization, localization on T-lymphocyte subsets and age-dependent changes. *Neuropharmacology* 28:719–726.

60. Evans RG, Ludbrook J, and Van Leeuwen AF (1989) Role of central opiate receptor subtypes in the circulatory responses of awake rabbits to graded caval occlusions. *J Physiol (Lond)* 419:15–31.

61. Ferrante L, Rognum TO, Vege Å, Nygård S, and Opdal SH (2016) Altered gene expression and possible immunodeficiency in cases of sudden infant death syndrome. *Pediatr* Res 80:77–84.

62. Ferrero P, Rocca P, Eva C, Benna P, Rebaudengo N, Ravizza L, Genazzani E, and Bergamasco B (1991) An analysis of lymphocyte 3H-N-methyl-scopolamine binding in neurological patients. Evidence of altered binding in Alzheimer's disease. *Brain* 114 (Pt 4):1759–1770.

63. Fifer WP, Fingers ST, Youngman M, Gomez-Gribben E, and Myers MM (2009) Effects of alcohol and smoking during pregnancy on infant autonomic control. *Dev Psychobiol* 51:234–242.

64. Filiano JJ, and Kinney HC (1992) Arcuate nucleus hypoplasia in the sudden infant death syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 51:394–403.

65. Filiano JJ, and Kinney HC (1994) A perspective on neuropathologic findings in victims of the sudden infant death syndrome: the triple-risk model. *Biol Neonate* 65:194–197.

66. Fleming P, and Blair PS (2007) Sudden Infant Death Syndrome and parental smoking. *Early Hum Dev* 83:721–725.

67. Fleming PJ, Gilbert R, Azaz Y, Berry PJ, Rudd PT, Stewart A, and Hall E (1990) Interaction between bedding and sleeping position in the sudden infant death syndrome: a population based case-control study. *BMJ* 301:85–89.

68. Fleming PJ, Blair PS, and Pease A (2015) Sudden unexpected death in infancy: aetiology, pathophysiology, epidemiology and prevention in 2015. *Arch Dis Child* 100:984–988.

69. Forsyth KD, Weeks SC, Koh L, Skinner J, and Bradley J (1989) Lung immunoglobulins in the sudden infant death syndrome. *BMJ* 298:23–26.

70. Franken C, Remy S, Lambrechts N, Hollanders K, Den Hond E, and Schoeters G (2016) Peripheral blood collection: the first step towards gene expression profiling. Biomarkers 21:458–465.

71. Fujii T, Tsuchiya T, Yamada S, Fujimoto K, Suzuki T, Kasahara T, and Kawashima K (1996) Localization and synthesis of acetylcholine in human leukemic T cell lines. *J Neurosci Res* 44:66–72.

72. Fujii T, Tajima S, Yamada S, Watanabe Y, Sato KZ, Matsui M, Misawa H, Kasahara T, and Kawashima K (1999) Constitutive expression of mRNA for the same choline acetyltransferase as that in the nervous system, an acetylcholine-synthesizing enzyme, in human leukemic T-cell lines. *Neurosci Lett* 259:71–74.

73. Fujii T, and Kawashima K (2000) YM905, a novel M3 antagonist, inhibits Ca2+ signaling and c-fos gene expression mediated via muscarinic receptors in human T cells. *Gen Pharmacol* 35:71–75.

74. Fujii T, Watanabe Y, Inoue T, and Kawashima K (2003) Upregulation of mRNA encoding the M5 muscarinic acetylcholine receptor in human T- and B-lymphocytes during immunological responses. *Neurochem Res* 28:423–429.

75. Fujino H, Uehara T, Murayama T, Okuma Y, Ariga H, and Nomura Y (2000) Extracellular signal regulated protein kinase and c-jun N-terminal kinase are involved in ml muscarinic receptor-enhanced interleukin-2 production pathway in Jurkat cells. *Biol Pharm Bull* 23:1198–1205.

76. Fuster V, Rydén LE, Asinger RW, Cannom DS, Crijns HJ, Frye RL, Halperin JL, Kay GN, Klein WW, Lévy S, McNamara RL, Prystowsky EN, Wann LS, Wyse

DG, Gibbons RJ, Antman EM, Alpert JS, Faxon DP, Fuster V, Gregoratos G, Hiratzka LF, Jacobs AK, Russell RO, Smith SC, Klein WW, Alonso-Garcia A, Blomström-Lundqvist C, de Backer G, Flather M, Hradec J, Oto A, Parkhomenko A, Silber S, Torbicki A, American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines and Policy Conferences (Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation), and North American Society of Pacing and Electrophysiology (2001) ACC/AHA/ESC Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation: Executive Summary A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines and Policy Conferences (Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation) Developed in Collaboration With the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation* 104:2118–2150.

77. Galland BC, Taylor BJ, and Bolton DPG (2002) Prone versus supine sleep position: a review of the physiological studies in SIDS research. *J Paediatr Child Health* 38:332–338.

78. Ganzeboom KS, Colman N, Reitsma JB, Shen WK, and Wieling W (2003) Prevalence and triggers of syncope in medical students. *Am J Cardiol* 91:1006–1008, A8.

79. Ganzeboom KS, Mairuhu G, Reitsma JB, Linzer M, Wieling W, and van Dijk N (2006) Lifetime cumulative incidence of syncope in the general population: a study of 549 Dutch subjects aged 35-60 years. *J Cardiovasc Electrophysiol* 17:1172–1176.

80. Goldstein RD, Trachtenberg FL, Sens MA, Harty BJ, and Kinney HC (2016) Overall Postneonatal Mortality and Rates of SIDS. *Pediatrics* 137.

81. Goldwater PN (2017) Infection: the neglected paradigm in SIDS research. *Arch Dis Child* 102:767–772.

82. Grether JK, Schulman J, and Croen LA (1990) Sudden infant death syndrome among Asians in California. *J Pediatr* 116:525–528.

83. Grimaldi Capitello T, Fiorilli C, Placidi S, Vallone R, Drago F, and Gentile S (2016) What factors influence parents' perception of the quality of life of children and adolescents with neurocardiogenic syncope? *Health Qual Life Outcomes* 14:79.

84. Grimm DR (1997) Neurally mediated syncope: a review of cardiac and arterial receptors. *J Clin Neurophysiol* 14:170–182.

85. Grubb BP, Gerard G, Wolfe DA, Samoil D, Davenport CW, Homan RW, and Temesy-Armos P (1992) Syncope and seizures of psychogenic origin: identification with head-upright tilt table testing. *Clin Cardiol* 15:839–842.

86. Grubb BP, Wolfe DA, Samoil D, Temesy-Armos P, Hahn H, and Elliott L (1993) Usefulness of fluoxetine hydrochloride for prevention of resistant upright tilt induced syncope. *Pacing Clin Electrophysiol* 16:458–464.

87. Guilleminault C, Ariagno RL, Forno LS, Nagel L, Baldwin R, and Owen M (1979) Obstructive sleep apnea and near miss for SIDS: I. Report of an infant with sudden death. *Pediatrics* 63:837–843.

88. Hakeem GF, Oddy L, Holcroft CA, and Abenhaim HA (2015) Incidence and determinants of sudden infant death syndrome: a population-based study on 37 million births. *World J Pediatr* 11:41–47.

89. Hauck FR, Herman SM, Donovan M, Iyasu S, Merrick Moore C, Donoghue E, Kirschner RH, and Willinger M (2003) Sleep environment and the risk of sudden infant death syndrome in an urban population: the Chicago Infant Mortality Study. *Pediatrics* 111:1207–1214.

90. Hauck FR, and Tanabe KO (2008) International trends in sudden infant death syndrome: stabilization of rates requires further action. *Pediatrics* 122:660–666.

91. Hedley PL, Kanters JK, Dembic M, Jespersen T, Skibsbye L, Aidt FH, Eschen O, Graff C, Behr ER, Schlamowitz S, Corfield V, McKenna WJ, and Christiansen M (2013) The role of CAV3 in long-QT syndrome: clinical and functional assessment of a caveolin-3/Kv11.1 double heterozygote versus caveolin-3 single heterozygote. *Circ Cardiovasc Genet* 6:452–461.

92. Hellström-Lindahl E, and Nordberg A (1996) Muscarinic receptor subtypes in subpopulations of human blood mononuclear cells as analyzed by RT-PCR technique. *J Neuroimmunol* 68:139–144.

93. Horne RS, Ferens D, Watts AM, Vitkovic J, Lacey B, Andrew S, Cranage SM, Chau B, and Adamson TM (2001) The prone sleeping position impairs arousability in term infants. *J Pediatr* 138:811–816.

94. Hulme EC, Birdsall NJ, and Buckley NJ (1990) Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30:633–673.

95. Hunt CE (2005) Gene-environment interactions: implications for sudden unexpected deaths in infancy*. Arch Dis Child* 90:48–53.

96. Irgens LM, Markestad T, Baste V, Schreuder P, Skjaerven R, and Oyen N (1995) Sleeping position and sudden infant death syndrome in Norway 1967-91. *Arch Dis Child* 72:478–482.

97. Iyer A, and Appleton R (2013) Management of reflex anoxic seizures in children. *Archives of Disease in Childhood* 98:714–717.

98. Jensen LL, Banner J, and Byard RW (2014) Does β-APP staining of the brain in infant bed-sharing deaths differentiate these cases from sudden infant death syndrome? *J Forensic Leg Med* 27:46–49.

99. Jolley SG, Halpern LM, Tunell WP, Johnson DG, and Sterling CE (1991) The risk of sudden infant death from gastroesophageal reflux. *J Pediatr Surg* 26:691–696.

100. Jonville-Béra AP, Autret-Leca E, Barbeillon F, Paris-Llado J, and French Reference Centers for SIDS (2001) Sudden unexpected death in infants under 3 months of age and vaccination status- -a case-control study. *Br J Clin Pharmacol* 51:271–276.

101. Jørgensen T, Biering-Sørensen F, and Hilden J (1979) Sudden infant death in Copenhagen 1956--1971. III. Perinatal and perimortal factors. *Acta Paediatr Scand* 68:11–22.

102. Joulia F, Coulange M, Desplantes A, Barberon B, Kipson N, Gerolami V, Jammes Y, Kerbaul F, Née L, Fromonot J, Bruzzese L, Michelet P, Boussuges A, Brignole M, Deharo J-C, and Guieu R (2014) Purinergic profile of fainting divers is different from patients with vasovagal syncope. *Int J Cardiol* 174:741–743.

103. Joulia F, Coulange M, Lemaitre F, Costalat G, Franceschi F, Gariboldi V, Nee L, Fromonot J, Bruzzese L, Gravier G, Kipson N, Jammes Y, Boussuges A, Brignole M, Deharo JC, and Guieu R (2013) Plasma adenosine release is associated with bradycardia and transient loss of consciousness during experimental breath-hold diving. *Int J Cardiol* 168:e138-141.

104. Kadhim H, Sébire G, Khalifa M, Evrard P, Groswasser J, Franco P, and Kahn A (2005) Incongruent cerebral growth in sudden infant death syndrome. *J Child Neurol* 20:244–246.

105. Kahn A, Blum D, Hennart P, Sellens C, Samson-Dollfus D, Tayot J, Gilly R, Dutruge J, Flores R, and Sternberg B (1984) A critical comparison of the history of sudden-death infants and infants hospitalised for near-miss for SIDS. *Eur J Pediatr* 143:103–107.

106. Kamimura Y, Fujii T, Kojima H, Nagano T, and Kawashima K (2003) Nitric oxide (NO) synthase mRNA expression and NO production via muscarinic acetylcholine receptor-mediated pathways in the CEM, human leukemic T-cell line. *Life Sci* 72:2151–2154.

107. Kandall SR, Gaines J, Habel L, Davidson G, and Jessop D (1993) Relationship of maternal substance abuse to subsequent sudden infant death syndrome in offspring. *J Pediatr* 123:120–126.

108. Kapoor WN (1992) Evaluation and management of the patient with syncope. *JAMA* 268:2553–2560.

109. Kawashima K, and Fujii T (2003) The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sci* 74:675–696.

110. Kawashima K, Fujii T, Watanabe Y, and Misawa H (1998) Acetylcholine synthesis and muscarinic receptor subtype mRNA expression in T-lymphocytes. *Life Sci* 62:1701–1705.

111. Kelly DH, Pathak A, and Meny R (1991) Sudden severe bradycardia in infancy. *Pediatr Pulmonol* 10:199–204.

112. Kenny RA, Richardson DA, Steen N, Bexton RS, Shaw FE, and Bond J (2001) Carotid sinus syndrome: a modifiable risk factor for nonaccidental falls in older adults (SAFE PACE). *J Am Coll Cardiol* 38:1491–1496.

113. Kenny RA, Brignole M, Dan G-A, Deharo JC, Dijk V, Gert J, Doherty C, Hamdan M, Moya A, Parry SW, Sutton R, Ungar A, Wieling W, Asgari M, Baron-Esquivias G, Blanc J-J, Casagranda I, Cunnigham C, Fedorowski A, Furlan R, Gall N, Lange D, J F, Mcmahon G, Mitro P, Pietrucha A, Podoleanu C, Raviele A, Benditt D, Krahn A, Morillo CA, Olshansky B, Raj S, Sheldon R, Shen WK, Sun B, Hachul D, Abe H, Furukawa T, Gorenek B, Lip GYH, Glikson

M, Ritter P, Hurwitz J, Macfadyen R, Rankin A, Mont L, Svendsen J, Kusumoto F, Cohen M, and Savelieva I (2015) Syncope Unit: rationale and requirement – the European Heart Rhythm Association position statement endorsed by the Heart Rhythm Society. *Europace* 17:1325–1340.

114. Kiechl-Kohlendorfer U, Hof D, Peglow UP, Traweger-Ravanelli B, and Kiechl S (2005) Epidemiology of apparent life threatening events. *Arch Dis Child* 90:297–300.

115. Kinney HC, Filiano JJ, Sleeper LA, Mandell F, Valdes-Dapena M, and White WF (1995) Decreased muscarinic receptor binding in the arcuate nucleus in sudden infant death syndrome. *Science* 269:1446–1450.

116. Kinney HC, and Thach BT (2009) The sudden infant death syndrome. *N Engl J Med* 361:795–805.

117. Kleemann WJ, Schlaud M, Poets CF, Rothämel T, and Tröger HD (1996) Hyperthermia in sudden infant death. *Int J Legal Med* 109:139–142.

118. Klonoff-Cohen HS, Edelstein SL, Lefkowitz ES, Srinivasan IP, Kaegi D, Chang JC, and Wiley KJ (1995) The effect of passive smoking and tobacco exposure through breast milk on sudden infant death syndrome. *JAMA* 273:795–798.

119. Knight BH (1975) The significance of the postmortem discovery of gastric contents in the air passages. *Forensic Sci* 6:229–234.

120. Kopel E, and Hill WC (2013) The effect of abused substances on antenatal and intrapartum fetal testing and well-being. *Clin Obstet Gynecol* 56:154–165.

121. Krous HF, Beckwith JB, Byard RW, Rognum TO, Bajanowski T, Corey T, Cutz E, Hanzlick R, Keens TG, and Mitchell EA (2004) Sudden infant death syndrome and unclassified sudden infant deaths: a definitional and diagnostic approach. *Pediatrics* 114:234–238.

122. Kubera M, Skowron-Cendrzak A, Mazur-Kolecka B, Bubak-Satora M, Basta-Kaim A, Laskowska-Bozek H, and Ryzewski J (1992) Stress-induced changes in muscarinic and beta-adrenergic binding sites on rat thymocytes and lymphocytes. *J Neuroimmunol* 37:229–235.

123. Kubo T, Fukuda K, Mikami A, Maeda A, Takahashi H, Mishina M, Haga T, Haga K, Ichiyama A, and Kangawa K (1986) Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 323:411–416.

124. Kuzmin E, VanderSluis B, Wang W, Tan G, Deshpande R, Chen Y, Usaj M, Balint A, Mattiazzi Usaj M, van Leeuwen J, Koch EN, Pons C, Dagilis AJ, Pryszlak M, Wang JZY, Hanchard J, Riggi M, Xu K, Heydari H, San Luis B-J, Shuteriqi E, Zhu H, Van Dyk N, Sharifpoor S, Costanzo M, Loewith R, Caudy A, Bolnick D, Brown GW, Andrews BJ, Boone C, and Myers CL (2018) Systematic analysis of complex genetic interactions. *Science* 360.

125. Langebrake C, Günther K, Lauber J, and Reinhardt D (2007) Preanalytical mRNA stabilization of whole bone marrow samples. Clin Chem 53:587–593.

126. Leape LL, Holder TM, Franklin JD, Amoury RA, and Ashcraft KW (1977) Respiratory arrest in infants secondary to gastroesophageal reflux. *Pediatrics* 60:924–928.

127. Lelonek M, Pietrucha T, Matyjaszczyk M, and Goch JH (2008) Mutation T/C,Ile 131 of the gene encoding the alfa subunit of the human Gs protein and predisposition to vasovagal syncope. *Circ J* 72:558–562.

128. Li D-K, Petitti DB, Willinger M, McMahon R, Odouli R, Vu H, and Hoffman HJ (2003) Infant sleeping position and the risk of sudden infant death syndrome in California, 1997-2000. *Am J Epidemiol* 157:446–455.

129. Lin Y-C, Liu C-Y, Kannagi R, and Yang R-B (2018) Inhibition of Endothelial SCUBE2 (Signal Peptide-CUB-EGF Domain-Containing Protein 2), a Novel VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) Coreceptor, Suppresses Tumor Angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38:1202–1215.

130. Livak KJ, and Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. Methods 25:402–408.

131. Livolsi A, Feldman J, Feingold J, Weiss L, Alembik Y, Sharifah-Anion IM, Fischbach M, Messer J, and Bousquet P (2002) First Model of Spontaneous Vagal Hyperreactivity and Its Mode of Genetic Transmission. *Circulation* 106:2301–2304.

132. Livolsi A, Niederhoffer N, Dali-Youcef N, Mokni W, Olexa-Zorn C, Gies J-P, Marcellin L, Feldman J, and Bousquet P (2010) Constitutive Overexpression of Muscarinic Receptors Leads to Vagal Hyperreactivity. *PLoS One* 5.

133. Livolsi A, Niederhoffer N, Dali-Youcef N, Rambaud C, Olexa C, Mokni W, Gies J-P, and Bousquet P (2010) Cardiac muscarinic receptor overexpression in sudden infant death syndrome. *PLoS ONE* 5:e9464.

134. Lucet V, Bethmann O de, and Denjoy I (2000) Paroxysmal Vagal Overactivity, Apparent Life-Threatening Event and Sudden Infant Death. *NEO* 78:1–7.

135. Lurie KG, and Benditt D (1996) Syncope and the autonomic nervous system. *J Cardiovasc Electrophysiol* 7:760–776.

136. Machaalani R, and Waters KA (2014) Neurochemical abnormalities in the brainstem of the Sudden Infant Death Syndrome (SIDS). *Paediatr Respir Rev* 15:293–300.

137. Machaalani R, Say M, and Waters KA (2011) Effects of cigarette smoke exposure on nicotinic acetylcholine receptor subunits α7 and β2 in the sudden infant death syndrome (SIDS) brainstem. *Toxicol Appl Pharmacol* 257:396–404.

138. Madrid AH, Ortega J, Rebollo JG, Manzano JG, Segovia JG, Sánchez A, Peña G, and Moro C (2001) Lack of efficacy of atenolol for the prevention of neurally mediated syncope in a highly symptomatic population: a prospective, double-blind, randomized and placebo-controlled study. *J Am Coll Cardiol* 37:554–559.

139. Mahanonda N, Bhuripanyo K, Kangkagate C, Wansanit K, Kulchot B, Nademanee K, and Chaithiraphan S (1995) Randomized double-blind, placebo-controlled trial of oral atenolol in patients with unexplained syncope and positive upright tilt table test results. *Am Heart J* 130:1250–1253.

140. Malloy MH (2004) SIDS--a syndrome in search of a cause. *N Engl J Med* 351:957–959.

141. Malloy MH, and MacDorman M (2005) Changes in the classification of sudden unexpected infant deaths: United States, 1992-2001. *Pediatrics* 115:1247–1253.

142. Mark AL (1983) The Bezold-Jarisch reflex revisited: clinical implications of inhibitory reflexes originating in the heart. *J Am Coll Cardiol* 1:90–102.

143. Márquez MF, Hernández-Pacheco G, Hermosillo AG, Gómez JR, Cárdenas M, and Vargas-Alarcón G (2007) The Arg389Gly beta1-adrenergic receptor gene polymorphism and susceptibility to faint during head-up tilt test. *Europace* 9:585–588.

144. Massoulié J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, and Vallette FM (1993) Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol* 41:31–91.

145. Massoulié J, Sussman J, Bon S, and Silman I (1993) Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Prog Brain Res* 98:139–146.

146. Massoulié J, Perrier N, Noureddine H, Liang D, and Bon S (2008) Old and new questions about cholinesterases. *Chem Biol Interact* 175:30–44.

147. Matthews TJ, and MacDorman MF (2013) Infant mortality statistics from the 2010 period linked birth/infant death data set. *Natl Vital Stat Rep* 62:1–26.

148. McGovern MC, and Smith MBH (2004) Causes of apparent life threatening events in infants: a systematic review. *Archives of Disease in Childhood* 89:1043–1048.

149. Mereu R, Taraborrelli P, Sau A, Di Toro A, Halim S, Hayat S, Bernardi L, Francis DP, Sutton R, and Lim PB (2016) Diagnostic role of head-up tilt test in patients with cough syncope. *Europace* 18:1273–1279.

150. Mitchell EA, Thach BT, Thompson JM, and Williams S (1999) Changing infants' sleep position increases risk of sudden infant death syndrome. New Zealand Cot Death Study. *Arch Pediatr Adolesc Med* 153:1136–1141.

151. Mitchell EA, and Milerad J (2006) Smoking and the sudden infant death syndrome. *Rev Environ Health* 21:81–103.

152. Mitchell EA, Freemantle J, Young J, and Byard RW (2012) Scientific consensus forum to review the evidence underpinning the recommendations of the Australian SIDS and Kids Safe Sleeping Health Promotion Programme--October 2010. *J Paediatr Child Health* 48:626–633.

153. Moon RY, Horne RS, and Hauck FR (2007) Sudden infant death syndrome. *The Lancet* 370:1578–1587.

154. Moore SS, and Watemberg N (2016) Syncope is a frequently under-diagnosed condition in infants and toddlers and has similar features to those seen in adolescents and adults. *Acta Paediatrica* 105:1083–1087.

155. Motloch LJ, Larbig R, Darabi T, Reda S, Motloch KA, Wernly B, Lichtenauer M, Gebing T, Schwaiger A, Zagidullin N, Wolny M, and Hoppe UC (2017) Long-QT syndrome-associated caveolin-3 mutations differentially regulate the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channel 4. *Physiol Int* 104:130–138.

156. Narita N, Narita M, Takashima S, Nakayama M, Nagai T, and Okado N (2001) Serotonin transporter gene variation is a risk factor for sudden infant death syndrome in the Japanese population. *Pediatrics* 107:690–692.

157. Naud J (2015) [Apparent life-threatening events and sudden unexpected death in infancy: Two different entities]. *Arch Pediatr* 22:1000–1004.

158. Neubauer J, Lecca MR, Russo G, Bartsch C, Medeiros-Domingo A, Berger W, and Haas C (2017) Post-mortem whole-exome analysis in a large sudden infant death syndrome cohort with a focus on cardiovascular and metabolic genetic diseases. *Eur J Hum Genet* 25:404–409.

159. Neumann S, Razen M, Habermehl P, Meyer CU, Zepp F, Kirkpatrick CJ, and Wessler I (2007) The non-neuronal cholinergic system in peripheral blood cells: effects of nicotinic and muscarinic receptor antagonists on phagocytosis, respiratory burst and migration. *Life Sci* 80:2361–2364.

160. Nolan T, Hands RE, and Bustin SA (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 1:1559–1582.

161. Nomura J, Hosoi T, Okuma Y, and Nomura Y (2003) The presence and functions of muscarinic receptors in human T cells: the involvement in IL-2 and IL-2 receptor system. *Life Sci* 72:2121–2126.

162. O'Kusky JR, and Norman MG (1992) Sudden infant death syndrome: postnatal changes in the numerical density and total number of neurons in the hypoglossal nucleus. *J Neuropathol Exp Neurol* 51:577–584.

163. Ogawa H, Fujii T, Watanabe Y, and Kawashima K (2003) Expression of multiple mRNA species for choline acetyltransferase in human T-lymphocytes. *Life Sci* 72:2127–2130.

164. Okuma Y, and Nomura Y (2001) Roles of muscarinic acetylcholine receptors in interleukin-2 synthesis in lymphocytes. *Jpn J Pharmacol* 85:16–19.

165. Opdal SH, and Rognum TO (2011) Gene variants predisposing to SIDS: current knowledge. *Forensic Sci Med Pathol* 7:26–36.

166. Paterson DS, Trachtenberg FL, Thompson EG, Belliveau RA, Beggs AH, Darnall R, Chadwick AE, Krous HF, and Kinney HC (2006) Multiple serotonergic brainstem abnormalities in sudden infant death syndrome. *JAMA* 296:2124–2132.

167. Peralta EG, Ashkenazi A, Winslow JW, Smith DH, Ramachandran J, and Capon DJ (1987) Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. *EMBO J* 6:3923–3929.

168. Pippucci T, Parmeggiani A, Palombo F, Maresca A, Angius A, Crisponi L, Cucca F, Liguori R, Valentino ML, Seri M, and Carelli V (2013) A novel null homozygous mutation confirms CACNA2D2 as a gene mutated in epileptic encephalopathy. *PLoS ONE* 8:e82154.

169. Pongou R (2013) Why is infant mortality higher in boys than in girls? A new hypothesis based on preconception environment and evidence from a large sample of twins. *Demography* 50:421–444.

170. Ponsonby AL, Dwyer T, Gibbons LE, Cochrane JA, and Wang YG (1993) Factors potentiating the risk of sudden infant death syndrome associated with the prone position. *N Engl J Med* 329:377–382.

171. Puggioni E, Guiducci V, Brignole M, Menozzi C, Oddone D, Donateo P, Croci F, Solano A, Lolli G, Tomasi C, and Bottoni N (2002) Results and complications of the carotid sinus massage performed according to the “method of symptoms.” *Am J Cardiol* 89:599–601.

172. Rabey JM, Shenkman L, and Gilad GM (1986) Cholinergic muscarinic binding by human lymphocytes: changes with aging, antagonist treatment, and senile dementia of the Alzheimer type. *Ann Neurol* 20:628–631.

173. Rainen L, Oelmueller U, Jurgensen S, Wyrich R, Ballas C, Schram J, Herdman C, Bankaitis-Davis D, Nicholls N, Trollinger D, and Tryon V (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin Chem 48:1883–1890.

174. Read DJ (1978) The aetiology of the sudden infant death syndrome: current ideas on breathing and sleep and possible links to deranged thiamine neurochemistry. *Aust N Z J Med* 8:322–336.

175. Rechtman LR, Colvin JD, Blair PS, and Moon RY (2014) Sofas and infant mortality. *Pediatrics* 134:e1293-1300.

176. Ricci A, Amenta F, Bronzetti E, Mannino F, Mariotta S, and Tayebati SK (2002) Expression of peripheral blood lymphocyte muscarinic cholinergic receptor subtypes in airway hyperresponsiveness. *J Neuroimmunol* 129:178–185.

177. Ricci A, Mariotta S, Amenta F, Tayebati SK, and Terzano C (2008) Changes in muscarinic cholinergic receptor expression in human peripheral blood lymphocytes in allergic rhinitis patients. *Pulm Pharmacol Ther* 21:79–87.

178. Rinner I, Kawashima K, and Schauenstein K (1998) Rat lymphocytes produce and secrete acetylcholine in dependence of differentiation and activation. *J Neuroimmunol* 81:31–37.

179. Salomonis N (2014) Systems-level perspective of sudden infant death syndrome. *Pediatr Res* 76:220–229.

180. Sapoznikov D, Backenroth R, and Rubinger D (2010) Baroreflex sensitivity and sympatho-vagal balance during intradialytic hypotensive episodes: *Journal of Hypertension* 28:314–324.

181. Sato KZ, Fujii T, Watanabe Y, Yamada S, Ando T, Kazuko F, and Kawashima K (1999) Diversity of mRNA expression for muscarinic acetylcholine receptor subtypes and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in human mononuclear leukocytes and leukemic cell lines. *Neurosci Lett* 266:17–20.

182. Sawnani H, Jackson T, Murphy T, Beckerman R, and Simakajornboon N (2004) The effect of maternal smoking on respiratory and arousal patterns in preterm infants during sleep. *Am J Respir Crit Care Med* 169:733–738.

183. Schwartz PJ, Stramba-Badiale M, Segantini A, Austoni P, Bosi G, Giorgetti R, Grancini F, Marni ED, Perticone F, Rosti D, and Salice P (1998) Prolongation of the QT interval and the sudden infant death syndrome. *N Engl J Med* 338:1709–1714.

184. Shapiro-Mendoza CK, Parks S, Lambert AE, Camperlengo L, Cottengim C, and Olson C (2018) The Epidemiology of Sudden Infant Death Syndrome and Sudden Unexpected Infant Deaths: Diagnostic Shift and other Temporal Changes, in *SIDS Sudden Infant and Early Childhood Death: The Past, the Present and the Future* (Duncan JR, and Byard RW eds) p, University of Adelaide Press, Adelaide (AU).

185. Shen WK, Decker WW, Smars PA, Goyal DG, Walker AE, Hodge DO, Trusty JM, Brekke KM, Jahangir A, Brady PA, Munger TM, Gersh BJ, Hammill SC, and Frye RL (2004) Syncope Evaluation in the Emergency Department Study (SEEDS): a multidisciplinary approach to syncope management. *Circulation* 110:3636–3645.

186. Shen WK, Hammill SC, Munger TM, Stanton MS, Packer DL, Osborn MJ, Wood DL, Bailey KR, Low PA, and Gersh BJ (1996) Adenosine: potential modulator for vasovagal syncope. *J Am Coll Cardiol* 28:146–154.

187. Shi H, Wang H, and Wang Z (1999) Identification and characterization of multiple subtypes of muscarinic acetylcholine receptors and their physiological functions in canine hearts. *Mol Pharmacol* 55:497–507.

188. Shojaei-Brosseau T, Bonaïti-Pellie C, Lyonnet S, Feingold J, and Lucet V (2003) Vagal overactivity: a risk factor of sudden infant death syndrome? *Arch Dis Child* 88:88.

189. Southall DP, Richards JM, Stebbens V, Wilson AJ, Taylor V, and Alexander JR (1986) Cardiorespiratory function in 16 full-term infants with sudden infant death syndrome. *Pediatrics* 78:787–796.

190. Spinelli J, Collins-Praino L, Van Den Heuvel C, and Byard RW (2017) Evolution and significance of the triple risk model in sudden infant death syndrome. *J Paediatr Child Health* 53:112–115.

191. Sridhar R, Thach BT, Kelly DH, and Henslee JA (2003) Characterization of successful and failed autoresuscitation in human infants, including those dying of SIDS. *Pediatr Pulmonol* 36:113–122.

192. Standfast SJ, Jereb S, Aliferis D, Janerich DT (1983) Epidemiology of SIDS in upstate New York. In: Sudden infant death syndrome. Eds Tildon JA, Roeder LM, Steinschneider A. *New York: Academic Press*, p. 145-59).

193. Strandberg-Larsen K (2014) Maternal alcohol-use disorder is associated with increased risk of sudden infant death syndrome and infant death from other causes. *Evid Based Nurs* 17:46–47.

194. Strom A, Superti-Furga A (2016) Le séquençage de l'exome en pédiatrie. *Paediatrica* 2:27.

195. Sutton R, Dijk N van, and Wieling W (2014) Clinical history in management of suspected syncope: A powerful diagnostic tool. *Cardiology Journal* 21:651–657.

196. Suzuki T, Higgins PJ, and Crawford DR (2000) Control selection for RNA quantitation. BioTechniques 29:332–337.

197. Szelényi JG, Bartha E, and Hollán SR (1982) Acetylcholinesterase activity of lymphocytes: an enzyme characteristic of T-cells. *Br J Haematol* 50:241–245.

198. Sztajzel J, Jung M, and Bayes de Luna A (2008) Reproducibility and gender-related differences of heart rate variability during all-day activity in young men and women. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 13:270–277.

199. Taniguchi T, Maruyama N, Ogata T, Kasahara T, Nakanishi N, Miyagawa K, Naito D, Hamaoka T, Nishi M, Matoba S, and Ueyama T (2016) PTRF/Cavin-1 Deficiency Causes Cardiac Dysfunction Accompanied by Cardiomyocyte Hypertrophy and Cardiac Fibrosis. *PLoS ONE* 11:e0162513.

200. Tappin D, Ecob R, and Brooke H (2005) Bedsharing, roomsharing, and sudden infant death syndrome in Scotland: a case-control study. *J Pediatr* 147:32–37.

201. Tayebati SK, Codini M, Gallai V, Mannino F, Parnetti L, Ricci A, Sarchielli P, and Amenta F (1999) Radioligand binding assay of M1-M5 muscarinic cholinergic receptor subtypes in human peripheral blood lymphocytes. *J Neuroimmunol* 99:224–229.

202. Tayebati SK, El-Assouad D, Ricci A, and Amenta F (2002) Immunochemical and immunocytochemical characterization of cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes. *J Neuroimmunol* 132:147–155.

203. Taylor JA, and Lipsitz LA (1997) Heart rate variability standards. *Circulation* 95:280–281.

204. Tildon JT, Chacon MA, Blair JD (1983) Changes in hypothalamic-endocrine function as possible factor(s) in SIDS. In: Sudden infant death syndrome. Eds Tildon JA, Roeder LM, Steinschneider A. *New York: Academic Press*, p. 211-19.

205. Trachtenberg FL, Haas EA, Kinney HC, Stanley C, and Krous HF (2012) Risk factor changes for sudden infant death syndrome after initiation of Back-to-Sleep campaign. *Pediatrics* 129:630–638.

206. Treyster Z, and Gitterman B (2011) Second hand smoke exposure in children: environmental factors, physiological effects, and interventions within pediatrics. *Rev Environ Health* 26:187–195.

207. Vaddadi G, Lambert E, Corcoran SJ, and Esler MD (2007) Postural syncope: mechanisms and management. *Med J Aust* 187:299–304.

208. van Dijk N, Quartieri F, Blanc J-J, Garcia-Civera R, Brignole M, Moya A, Wieling W, and PC-Trial Investigators (2006) Effectiveness of physical counterpressure maneuvers in preventing vasovagal syncope: the Physical Counterpressure Manoeuvres Trial (PC-Trial). *J Am Coll Cardiol* 48:1652–1657.

209. Wallbridge DR, MacIntyre HE, Gray CE, Denvir MA, Oldroyd KG, Rae AP, and Cobbe SM (1994) Increase in plasma beta endorphins precedes vasodepressor syncope. *Br Heart J* 71:446–448.

210. Wang H, Han H, Zhang L, Shi H, Schram G, Nattel S, and Wang Z (2001) Expression of multiple subtypes of muscarinic receptors and cellular distribution in the human heart. *Mol Pharmacol* 59:1029–1036.

211. Warren NM, Piggott MA, Perry EK, and Burn DJ (2005) Cholinergic systems in progressive supranuclear palsy. *Brain* 128:239–249.

212. Weese-Mayer DE, Berry-Kravis EM, Maher BS, Silvestri JM, Curran ME, and Marazita ML (2003) Sudden infant death syndrome: association with a promoter

polymorphism of the serotonin transporter gene. *Am J Med Genet* A 117A:268–274.

213. Wei JW, and Sulakhe PV (1978) Regional and subcellular distribution of myocardial muscarinic cholinergic receptors. *Eur J Pharmacol* 52:235–238.
214. Wennergren G, Milerad J, Lagercrantz H, Karlberg P, Svenningsen NW, Sedin G, Andersson D, Grögaard J, and Bjure J (1987) The Epidemiology of Sudden Infant Death Syndrome and Attacks of Lifelessness in Sweden. *Acta Paediatrica* 76:898–906.
215. Whaley K, Lappin D, and Barkas T (1981) C2 synthesis by human monocytes is modulated by a nicotinic cholinergic receptor. *Nature* 293:580–583.
216. Wilde AAM, and Wieling W (2007) Vasovagal syncope or ventricular fibrillation. Your diagnosis better be accurate. *Clin Auton Res* 17:203–205.
217. Willinger M, James LS, and Catz C (1991) Defining the sudden infant death syndrome (SIDS): deliberations of an expert panel convened by the National Institute of Child Health and Human Development. *Pediatr Pathol* 11:677–684.
218. Willinger M, Hoffman HJ, and Hartford RB (1994) Infant sleep position and risk for sudden infant death syndrome: report of meeting held January 13 and 14, 1994, National Institutes of Health, Bethesda, MD. *Pediatrics* 93:814–819.
219. Yang J, Chen Y, Lu J, Wang X, Wang L, Liang J, and Sun ZS (2018) Identification and characterization of novel fusion genes in prostate cancer by targeted RNA capture and next-generation sequencing. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, doi: 10.1093/abbs/gmy112.
220. Yao Y, Shi R, Wong T, Zheng L, Chen W, Yang L, Huang W, Bao J, and Zhang S (2012) Endocardial autonomic denervation of the left atrium to treat vasovagal syncope: an early experience in humans. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 5:279–286.
221. Zimring JC, Kapp LM, Yamada M, Wess J, and Kapp JA (2005) Regulation of CD8+ cytolytic T lymphocyte differentiation by a cholinergic pathway. *J Neuroimmunol* 164:66–75.

TRAVAUX PUBLIES

PUBLICATIONS

2019 :

Beutelstetter M, Livolsi A, Greney H *et al.* 2016. Increased expression of blood muscarinic receptors in patients with reflex syncope. *Soumis - PlosOne*

2016 :

Adamopoulos C, Greney H, **Beutelstetter M**, Bousquet P, Livolsi A. 2016. Expression of circulating muscarinic receptors in infants with severe idiopathic life-threatening events. *JAMA Pediatr.* 170(7):707-708.

COMMUNICATIONS

2018 :

Helms P, **Beutelstetter M** *et al.* 2018. Expression of muscarinic receptors in adults and children with severe vagal syncope. Présentation orale aux 28èmes Journées Européennes de la Société Française de Cardiologie, Paris, France. Résumé publié dans *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements*, Volume 10, Page 78.

2017 :

Beutelstetter M, Bousquet P, Livolsi A. 2017. Expression of circulating muscarinic receptors in infants with severe idiopathic life-threatening events: from rabbits to humans. Présentation orale et affichée au *5th Annual European Conference on Clinical and Translational Sciences (EUSTM-2017),* Berlin, Germany. Résumé disponible dans le *New Horizons in Translational Medicine (NHTM) Journal*.

Beutelstetter M *et al.* 2017. MJ2-25 – Expression of muscarinic receptors in children with severe vagal syncope. Présentation orale au 14ème Congrès Médico-Chirurgical de la FCPC - Filiale de Cardiologie Pédiatrique et Congénitale, Montpellier. Résumé publié dans *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements*, Volume 9, Pages 272-276.

⇨ ***Prix "Jeunes Chercheurs" de la meilleure communication orale.***

Beutelstetter M, Bousquet P, Livolsi A. 2017. Expression des récepteurs muscariniques circulants chez les enfants présentant des malaises sévères idiopathiques. Présentation orale aux 5èmes journées scientifiques de la Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS).

2016 :

Beutelstetter M, Bousquet P, Livolsi A. 2016. Expression des récepteurs muscariniques circulants chez les enfants présentant des malaises sévères idiopathiques. Présentation orale à la 2ème Journée Scientifique GIRCI Est - CGE "Recherche & Pédiatrie".

CONTRIBUTIONS PERSONNELLES

- ❖ Analyse des marqueurs sanguins à l'étude : ARN messagers des récepteurs muscariniques M_2 et de l'acétylcholinestérase (extraction, RT-qPCR), dans les différents groupes à l'étude.

- ❖ Étude clinique « iALTE », HUS n°6432.
  - Rédaction du protocole en collaboration avec toutes les équipes (pédiatres, méthodologistes, chercheurs, chef de projet).
  - Soumission à l'appel à projet « jeunes chercheurs » *(AAPJC 2015) du GIRCI-Est ;* projet retenu et financé
  - Soumissions réglementaires : comité d'éthique, CPP, ANSM, CNIL, CCTIRS.
  - Création du cahier d'observation électronique pour le recueil des données.
  - Rédaction des documents réglementaires (consentement, notice d'information) et pratiques (consignes de prélèvement, de stockage, circuit des échantillons).
  - Mise en place de l'étude dans les centres recruteurs (Strasbourg, Nancy, Reims et Besançon).
  - Coordination pratique de l'étude en cours de recrutement.

- ❖ Étude génétique familiale :
  - Rédaction du protocole de recherche en collaboration avec l'équipe du laboratoire de génétique médicale, U1112, du Pr Dollfus.
  - Soumission à l'appel à projet : « Aide à la recherche par équipe 2016, cardiopathies de l'enfant » de la Fédération Française de Cardiologie ; projet retenu et financé.
  - Interprétation des données du séquençage des exomes en collaboration avec les bio-informaticiens.

- ❖ Présentations orales et affichées des résultats en congrès scientifiques nationaux et internationaux.

- ❖ Rédaction de 2 publications scientifiques : article paru dans JAMA Pediatrics et article actuellement soumis à PlosOne.

Maxime BEUTELSTETTER

EXPRESSION DES RECEPTEURS MUSCARINIQUES M2, MALAISES VAGAUX ET MORT SUBITE DU NOURRISSON

La mort subite du nourrisson (MSN) est un phénomène imprévisible et mal compris. Elle est définie par « le décès d'un nourrisson âgé de moins d'un an dont les causes restent inexpliquées malgré des investigations approfondies, incluant une autopsie et un examen de la scène du décès ». Si l'incidence est en décroissance depuis 1994 et le début des campagnes de prévention, la MSN reste la première cause de décès post-néonatale. La MSN est un phénomène multifactoriel qui survient préférentiellement chez des enfants vulnérables exposés à des facteurs de risques environnementaux. Ainsi, le fait d'identifier ces enfants à risque est un enjeu majeur dans la prévention de cette pathologie. La réponse vagale exacerbée, exprimée biologiquement par une surexpression des récepteurs muscariniques de sous-types M2 (RM_2), pourrait être un facteur de risque de MSN. Nous avons déjà constaté cette anomalie biologique dans notre modèle animal d'hyperréactivité vagale et dans des cœurs de nourrissons décédés de MSN. Le but de ces travaux est d'analyser l'expression sanguine des RM_2 en tant que paramètre biologique reflétant une hyperactivité vagale chez l'Homme, dans des cas de malaises vagaux et de malaises sévères inexpliqués du nourrisson. L'implication de la génétique a également été étudiée dans une famille présentant plusieurs cas de MSN.

Une surexpression des RM_2 a été observée chez des patients présentant des malaises vagaux. Pour la première fois, des anomalies biologiques ont été identifiées dans cette pathologie. Si l'on parvenait à valider ce paramètre biologique en tant que marqueur de risque, cela pourrait permettre d'aider au diagnostic différentiel et à la prise en charge thérapeutique de ces syncopes vagales.

Les mêmes anomalies ont été observées chez des enfants de moins d'un an présentant des malaises sévères idiopathiques.

Après une première analyse des données du séquençage haut débit d'exomes issus d'une famille présentant plusieurs cas de MSN, nous avons pu identifier 3 gènes pouvant être impliqués dans la MSN. Néanmoins, le scénario et le mode de transmission sont difficiles à définir. Les premières hypothèses s'orientent vers un digénisme ou même un trigénisme. La surexpression des RM_2 chez les 2 parents et chez certains enfants est un premier élément suggérant la transmission du caractère « hyperactivité vagale » chez l'Homme.

Nos travaux ont permis de mettre en évidence une anomalie biologique commune entre les malaises vagaux, les malaises inexpliqués du jeune enfant et la MSN, à savoir la surexpression des RM_2. Ce paramètre, facilement dosable dans le sang, pourrait être un élément complémentaire dans le diagnostic différentiel et la prise en charge de ces pathologies, notamment chez les jeunes enfants pour lesquels ces malaises peuvent être très délétères. L'avancée dans le séquençage du génome permettra peut-être l'identification de facteurs de risque génétiques impliqués dans les malaises inexpliqués ou les MSN.

Mots-clés : Mort subite du nourrisson (MSN) ; récepteurs muscariniques ; hyperactivité vagale ; malaises vagaux ; acétylcholinestérase.

Sudden Infant Death Syndrome (SIDS) is an unpredictable and poorly understood phenomenon. It is defined as the "sudden unexpected death of a child younger than one year during sleep that cannot be explained after a postmortem evaluation including autopsy, a thorough history, and scene evaluation". Although the incidence has been decreasing since 1994 and the start of prevention campaigns, SIDS remains the leading cause of post-neonatal death. SIDS is a multifactorial phenomenon that occurs preferentially in vulnerable infants exposed to environmental risk factors. Thus, identifying these children at risk is a major challenge in the prevention of this pathology. The exacerbated vagal response, biologically expressed by overexpression of muscarinic M2 receptors (M_2R), may be a risk factor for SIDS. We have already observed this biological abnormality in our animal model of vagal hyperreactivity and in hearts of SIDS. The aim of this work is to analyze the blood expression of M_2R as a biological parameter reflecting vagal hyperreactivity in humans, in cases of reflex syncope and idiopathic apparent life-threatening events (iALTE) of infants. The involvement of genetics has also been studied in a family with several cases of SIDS (SIDS family).

Overexpression of M_2R has been observed in patients with reflex syncope. For the first time, biological abnormalities have been identified in this pathology. If this biological parameter could be validated as a risk marker, it could help for differentially diagnosis and treatment of these vagal syncopes. The same abnormalities were observed in children under one year old with iALTE.

After a first analysis of the data of the "next generation sequencing" of the exomes of our "SIDS family", we were able to identify 3 genes that could be involved in SIDS. However, the scenario and the mode of transmission are difficult to define. The first hypotheses are oriented towards a digenism or even a trigenism. The overexpression of M_2R in both parents is a first element suggesting the genetic transmission of the character "vagal hyperactivity" in humans.

Our work highlights a biological abnormality which is common to reflex syncope, iALTE and SIDS, namely the overexpression of M_2R. These results confirm the hypothesis of the involvement of the vagal system overactivity in these pathologies. This parameter, easily measurable in the blood, could be a complementary assessment useful in the differential diagnosis and the management of these pathologies, in particular in infants for whom syncope can be very harmful. The development of the sequencing of human genome will probably allow the identification of genetic risk factors involved in iALTE or SIDS.

Keywords: Sudden infant death syndrome (SIDS); muscarinic receptors; vagal hyperactivity; reflex syncope; acetylcholinesterase;