

## Étude génétique et moléculaire des paralysies périodiques dyskaliémiques familiales : un succès de l'approche par gènes candidats

La découverte d'un nombre croissant de gènes humains et la connaissance de la physiopathologie d'affections héréditaires permet de faire des hypothèses sur ce que pourrait être le gène responsable de certaines affections : c'est ce que l'on appelle la stratégie du « gène candidat ». C'est ainsi que l'implication du canal sodium dépendant du voltage a été suggérée dans les paralysies périodiques hyperkaliémiques, une affection autosomique dominante liée au bras long du chromosome 17. Une liaison génétique étroite a d'abord été démontrée entre le gène de la sous-unité  $\alpha$  du canal sodium du muscle squelettique et l'affection, puis deux mutations ponctuelles de ce gène ont été détectées dans trois formes familiales et deux formes sporadiques de la maladie.

---

**Bertrand Fontaine**

---

L'analyse moléculaire des maladies connaît depuis plusieurs dizaines d'années de nombreuses avancées. L'une d'entre elles est représentée par l'application des techniques biochimiques à l'étude des métabolismes pathologiques : cette dernière a permis la mise en évidence du déficit élémentaire responsable d'un certain nombre de syndromes héréditaires. Cette démarche, remontant de la protéine au gène pathologique, est celle de la génétique qualifiée, pour des raisons historiques, de « classique ». Elle a permis de faire de nombreux progrès dans le domaine des maladies métaboliques, c'est-à-dire les maladies pour lesquelles le déficit touche une protéine largement représentée ou un des métabolismes de base du fonctionnement cellulaire.

### La génétique inverse

Les maladies neurologiques de l'adulte, touchant le plus souvent des

populations cellulaires restreintes, ont résisté à ce type d'approche : aucune anomalie biochimique facilement identifiable n'a pu ici servir de point de départ à l'identification d'un gène pathologique. C'est pourquoi une nouvelle stratégie, la « génétique inverse », a été proposée dans les années 50 et réalisée avec succès dans les années 80, grâce aux progrès de la biologie moléculaire, notamment par la découverte d'enzymes bactériennes, les enzymes de restriction, qui permettent de définir des polymorphismes de restriction de l'ADN (RFLP : *restriction fragment length polymorphism*) (références dans [1]).

On peut considérer, en première approximation, que les polymorphismes de l'ADN sont dus à des mutations survenant de façon aléatoire et répartis tout au long du génome humain, au moins de l'ordre de un toutes les quelques dizaines de milliers de paires de bases. L'espacement moyen des gènes étant d'une centaine de milliers de paires de bases, on peut prédire qu'il existe au moins un

#### ADRESSE ET TIRÉS À PART

B. Fontaine : docteur en médecine et docteur ès sciences, interne des hôpitaux de Paris (neurologie). Service de neurologie et de neuropsychologie (Pr F. Chain) et consultation de pathologie neuromusculaire (Pr M. Fardeau), hôpital de la Salpêtrière, 73013 Paris, France.

## RÉFÉRENCES

1. Gusella JF. DNA polymorphism and human diseases. *Ann Rev Biochem* 1986 ; 55 : 831-54.
2. Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, et al. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 1983 ; 306 : 234-8.
3. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) : cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987 ; 50 : 509-17.
4. Monaco A, Neve R, Coletti-Fecner C, Bertelson C, Kurnit D, Kunkel L. Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 1986 ; 323 : 646-50.
5. Cawthon RM, Weiss R, Xu G, et al. A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene : cDNA sequence, genomic structure and point mutations. *Cell* 1990 ; 62 : 193-201.
6. Viskochill D, Burchberg A, Xu G, et al. Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell* 1990 ; 62 : 187-92.
7. Wallace MR, Marchuk DA, Andersen LB, et al. Type 1 neurofibromatosis gene : identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science* 1990 ; 249 : 181-6.
8. Buruma OJS, Schipperheyn JJ. Periodic paralysis. In : Vinken PJ, Bruyn GW, eds. *Handbook of Clinical Neurology*. Amsterdam, New York, Oxford : North Holland Publishing Company, 1979 : 41 : 147-74.
9. Engel AG. Periodic paralysis. In : Engels AG, Bankers BQ, eds. *Myology*. New York : McGraw-Hill (1986) : 1843-70.
10. Rüdcl R. The pathophysiologic basis of the myotonias and the periodic paralysis. In : Engels AG, Bankers BQ, eds. *Myology*. New York : McGraw-Hill, 1986 : 1297-311.
11. Gamstorp I. *Adynamia episodica hereditaria*. *Acta Paediatr* 1956 ; 45 (suppl. 108) : 1-126.
12. Fontaine B. Expression du récepteur de l'acétylcholine (RACH) lors de la myogenèse et de la formation des jonctions neuromusculaires : régulation par le neuropeptide CGRP et détection des transcrits codant pour la sous-unité  $\alpha$  de RACH par hybridation *in situ*. Thèse de doctorat ès sciences, université Paris VII, 1990.
13. Lehmann-Horn F, Küther G, Ricker K, Grafe P, Ballanyi K, Rüdcl R. *Adynamia episodica hereditaria* with myotonia : a non-inactivating sodium current and the effect of extra-cellular pH. *Muscle and Nerve* 1987 ; 10 : 363-74.

polymorphisme de l'ADN, notamment de restriction, proche de chaque gène. On a donc proposé de localiser les maladies génétiques humaines en recherchant la coségrégation de la maladie et d'un polymorphisme de restriction pour le locus étudié au sein d'une famille (références dans [1]).

En 1983, l'équipe de J.F. Gusella [2] a localisé le gène de la chorée de Huntington près de la sonde G8 sur le chromosome 4. Ce premier travail peut être considéré comme l'acte de naissance de la génétique inverse et, par là-même, de la neurogénétique moderne. On proposa alors de passer à l'étape suivante, qui est d'isoler un gène grâce à sa seule localisation sur le génome, par une liaison génétique avec un marqueur donné. Cette approche, qui nécessite un énorme travail d'isolement de fragments chromosomiques à partir du marqueur connu jusqu'au gène

d'intérêt, a été réalisée avec succès pour un certain nombre de maladies neurologiques : la myopathie de Duchenne [3, 4] et la neurofibromatose de type 1 — plus connue sous le nom de maladie de von Recklinghausen [5-7].

## Gènes candidats

La séparation entre génétique classique et inverse est importante sur le plan historique. Cependant, actuellement, en fonction de la plus ou moins grande connaissance physiopathologique d'une maladie, les deux types d'approche peuvent être combinés : c'est l'approche par gènes candidats. En effet, chaque jour, de nouveaux gènes sont isolés et caractérisés, disséquant de façon de plus en plus précise les différents métabolismes cellulaires. On peut donc proposer de sélectionner un certain nombre de gènes qui, raisonnablement,

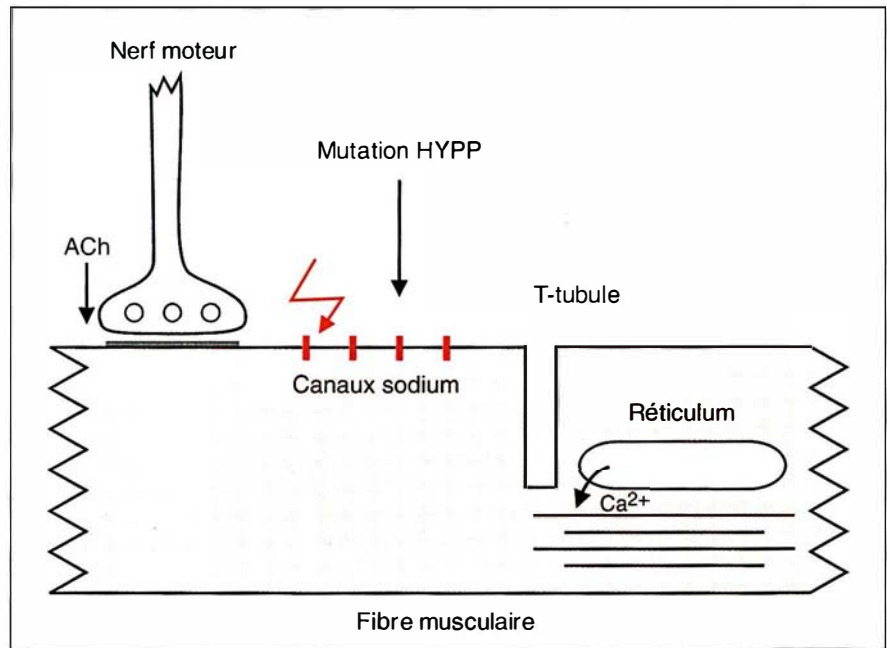


Figure 1. **Mécanismes moléculaires de la contraction des muscles striés.** Le nerf moteur entraîne la libération d'un neuromédiateur, l'acétylcholine (ACh), au niveau de la plaque motrice. Celui-ci se fixe sur des récepteurs spécifiques dont l'activation provoque la formation d'un potentiel de plaque. Le potentiel de plaque, quand il atteint un certain seuil, active les canaux sodium situés le long de la membrane musculaire, qui sont responsables de la formation du potentiel d'action. Ce dernier, envahissant les tubules T, provoque la libération du calcium contenu dans le réticulum sarcoplasmique, qui induit alors le raccourcissement des protéines contractiles. Dans la paralysie périodique familiale hyperkaliémique (HYPP), nous proposons que la mutation réside dans le gène codant pour la sous-unité  $\alpha$  du canal sodium, perturbant la double propriété d'ouverture et de fermeture des canaux sodium. Ce serait là la cause du maintien d'une dépolarisation musculaire prolongée.

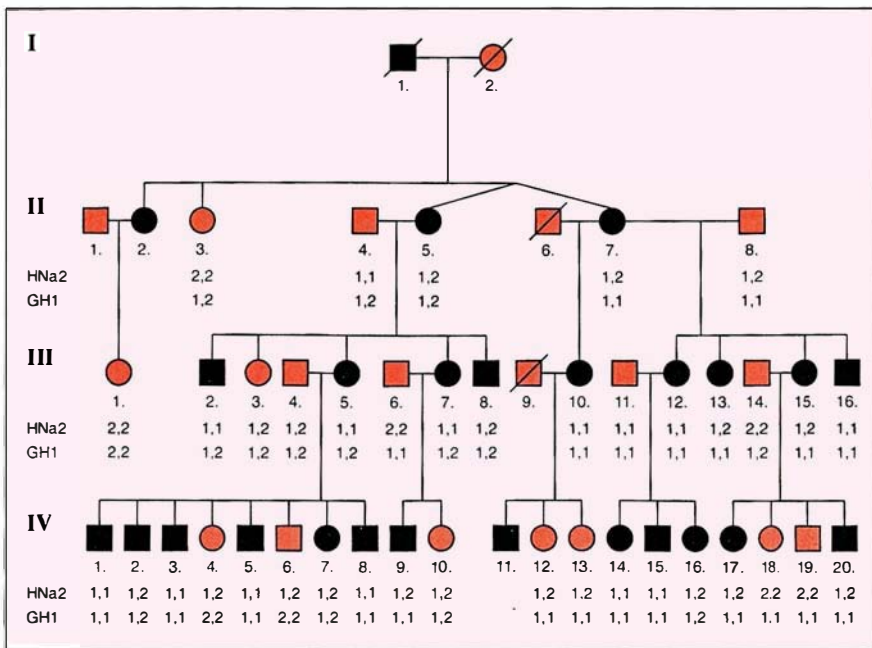


Figure 2. **Arbre généalogique de la famille atteinte par la maladie de Gamstorp que nous avons observée.** Les individus atteints sont figurés en noir. Les carrés désignent les hommes et les cercles, les femmes. Les individus barrés sont décédés. Le sexe de certains individus a été changé pour préserver l'anonymat. Les génotypes sont indiqués pour le canal sodium (HNa2) et l'hormone de croissance (GH1). La maladie est transmise conjointement avec l'allèle 1 de HNa2 et l'allèle 1 de GH1.

en fonction de la physiopathologie supposée de la maladie, peuvent en être le défaut primaire, et de pratiquer une étude de liaison génétique avec ces gènes candidats. L'avantage de cette méthode est, en cas de résultat positif, de déboucher sur la caractérisation directe du gène pathologique, en court-circuitant le travail d'isolement et de décryptage de toute la région chromosomique contenant le gène pathologique. Nous allons l'illustrer par une étude personnelle sur les paralysies périodiques dyskaliémiques.

### **Paralysies périodiques dyskaliémiques et physiologie de la contraction musculaire**

Les paralysies périodiques familiales sont caractérisées par des accès de paralysie musculaire. Ces épisodes, totalement régressifs en quelques heures voire en quelques jours, sont accompagnés de légères modifications de la kaliémie. Celle-ci est augmentée dans la forme hyperkaliémique ou maladie de Gamstorp (HYPP) et diminuée dans la forme hypokaliémique (HOPP) [8, 9]. Ces maladies sont

de transmission autosomique dominante. Sur le plan électrophysiologique, la persistance anormale d'une dépolarisation musculature rend compte de la paralysie musculaire (revue dans [10]).

Nous nous sommes particulièrement intéressés à la HYPP, encore appelée maladie de Gamstorp ou *adynamia episodica hereditaria* [11]. Cette affection débute le plus souvent dans la première décennie par des attaques de paralysie musculaire provoquée par le froid, le repos après l'effort, la diète et l'ingestion de potassium, ce dernier étant utilisé comme test diagnostique.

La contraction des muscles striés est le fruit de l'interaction entre le nerf moteur et le muscle (figure 1). L'influx nerveux se propage le long de l'axone moteur et déclenche la libération d'un neuromédiateur, l'acétylcholine, dans la fente synaptique. L'acétylcholine se fixe sur des sites récepteurs situés sur la membrane post-synaptique musculaire. Ceux-ci contiennent un canal ionique qui, en s'ouvrant, provoque un flux entrant de sodium, source d'un potentiel de plaque motrice. Ce potentiel, quand il atteint un certain seuil, ouvre les canaux sodium situés

tout le long de la membrane musculaire. Ces derniers sont ainsi responsables de la conduction des potentiels d'action le long de la membrane musculaire. Les potentiels d'action se propagent jusqu'à des replis de la membrane musculaire appelés tubules. Ils induisent alors la libération du calcium contenu dans un compartiment intracellulaire, le réticulum sarcoplasmique. Ce brusque flux de calcium à l'intérieur de la fibre musculaire provoque le raccourcissement des fibres musculaires par la contraction des protéines contractiles (références dans [12]). Il est clair que, pour qu'une contraction musculaire adaptée à l'ordre moteur se développe, il faut que les canaux sodium s'ouvrent pour un potentiel donné et se ferment pour que la contraction s'éteigne avant de recevoir un nouvel ordre contractile. Comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant, nous proposons que, dans la HYPP, cette double propriété d'ouverture et de fermeture des canaux sodium soit perturbée. Ce serait là la cause du maintien d'une dépolarisation musculaire prolongée.

### **Implication du canal sodium dans la paralysie périodique hyperkaliémique**

On peut reproduire *in vitro* un certain nombre des mécanismes qui induisent l'ouverture et la fermeture des canaux sodium. Des études électrophysiologiques ont été réalisées à partir de fibres des muscles intercostaux de patients présentant une HYPP, et maintenues vivantes dans un milieu physiologique dont la concentration en potassium peut varier. En augmentant progressivement la concentration en potassium, on a pu montrer que les cellules musculaires se dépolarisaient de façon prolongée pour une concentration qui, normalement, n'était pas suffisante pour induire l'ouverture des canaux sodium [13]. On observait alors un courant sodique anormal qui pouvait être bloqué par la tétrodothine, agent pharmacologique inhibant spécifiquement les canaux sodium. Ces résultats suggéraient que, dans la HYPP, le gène anormal était soit le canal sodium lui-même, soit un gène codant pour une protéine régulatrice du canal sodium. Afin de trancher entre ces deux possibilités, nous

## RÉFÉRENCES

14. Kallen RG, Sheng ZH, Yang J, Chen L, Rogart RB, Barchi RL. Primary structure and functional expression of a sodium channel characteristic of denervated and immature rat skeletal muscle. *Neuron* 1990 ; 4 : 233-42.
15. Noda M, Ikeda T, Kayano T, *et al.* Existence of distinct sodium channel messenger RNAs in rat brain. *Nature* 1986 ; 320 : 188-92.
16. Trimmer JS, Cooperman SS, Tomiko SA, *et al.* Primary structure and expression of a mammalian skeletal muscle sodium channel. *Neuron* 1989 ; 3 : 33-49.
17. Fontaine B, Khurana TS, Hoffman EP, *et al.* Hyperkalemic periodic paralysis and the adult muscle sodium channel  $\alpha$ -subunit gene. *Science* 1990 ; 250 : 1000-2.
18. Rojas CV, Wang J, Schwartz LS, Hoffman EP, Powell BR, Brown RH. A Met-to-Val mutation in the skeletal muscle Na<sup>+</sup> channel  $\alpha$ -subunit in hyperkalemic periodic paralysis. *Nature* 1991 ; 354 : 387-9.
19. Dryja TP. Deficiencies in sight with the candidate gene approach, *Nature* 1990 ; 347 : 614-5.
20. Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, *et al.* Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage Dutch type. *Science* 1990 ; 248 : 1124-6.
21. Van Broeckhoven C, Haan J, Bakker E, *et al.* Amyloid  $\beta$ -protein precursor gene and hereditary cerebral hemorrhage with amyloid (dutch). *Science* 1990 ; 248 : 1120-1.
22. La Spada A, Wilson E, Lubahn D, Harding A, Fischbeck K. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 1991 ; 352 : 77-8.
23. Ptáček LJ, George AL, Griggs RC, *et al.* Identification of a mutation in the gene causing hyperkalemic periodic paralysis. *Cell* 1991 ; 67 : 1021-7.

\* Une autre mutation Thr  $\rightarrow$  Met vient d'être décrite dans trois familles, non reliée, par Ptáček *et al.* (Salt Lake City, UT ; Philadelphie, PA ; Rochester, NY, USA) [23]. Elle est localisée dans le cinquième segment transmembranaire du domaine 2 du canal sodium, du muscle squelettique. Cette mutation semble associée à une forme clinique particulière avec faiblesse musculaire permanente.

\*\* Le syndrome de Kennedy associe une amyotrophie spinale et bulbaire à une gynécomastie et une infertilité de transmission liée à l'X.

avons décidé d'isoler le canal sodium humain et de réaliser une étude de liaison génétique dans une famille présentant la HYPP, en utilisant la stratégie des gènes candidats.

La famille que nous avons étudiée (figure 2, p. 43) est originaire de Cape Cod, une presqu'île au sud de l'État du Massachusetts et d'ascendance anglo-saxonne (si l'on se fie au nom de famille : McK.). Des prélèvements sanguins pour la préparation d'ADN ont été effectués chez tous les membres de la famille qui acceptèrent de collaborer à notre étude. En utilisant la séquence de l'ADNc du canal sodium du rat [14-16], nous avons isolé, par une technique d'amplification génique, l'ADNc codant par le canal sodium humain (HNa2) [17]. Nous avons pu vérifier *a posteriori* la conservation à

90 % des séquences du canal sodium entre l'homme et le rat. Nous avons décrit un polymorphisme de restriction (RFLP) du canal sodium pour l'enzyme BglII et montré la co-ségrégation systématique de l'allèle 1 de ce polymorphisme et de la maladie dans notre famille (figure 2). Nous avons par la suite localisé le gène du canal sodium sur le bras long du chromosome 17 (figure 3), télomérique au locus de la neurofibromatose de type 1, et se confondant génétiquement avec le locus de l'hormone de croissance (GH1). En conséquence, nous avons pu utiliser le locus de l'hormone de croissance (GH1) pour confirmer la liaison génétique et l'intégrer dans notre analyse statistique. Le *lod-score* — qui est appelé dans ce cas précis un *location-score*, car il prend en compte non seulement les données obtenues en utilisant le gène du canal sodium mais également celles de l'hormone de croissance — est de 7,00 et est maximal pour la fraction de recombinaison de 0,00. Il nous permet d'affirmer la liaison génétique sans recombinaisons entre le canal sodium et la HYPP avec une chance sur dix millions de nous tromper [17].

La combinaison des observations électrophysiologiques et génétiques remplit toutes les conditions postulées lors de la présentation de l'approche par gènes candidats. Elle nous autorise donc à proposer que la mutation HYPP réside dans le gène du canal sodium [17] (*m/s n° 1, vol. 7, p. 79*). La preuve définitive de l'existence d'une mutation dans le canal sodium vient juste d'être apportée par C.V. Rojas *et al.* (Pittsburgh, PA ; Portland, OR ; Charlestown, MA, USA). Les patients atteints de la famille représentée dans la figure 2 ont une mutation A  $\rightarrow$  G entraînant un changement Met-Val dans le domaine transmembranaire S [18]. Cette mutation n'est pas un polymorphisme, et est également détectée dans une forme sporadique de la maladie, mais pas dans cinq autres cas familiaux pourtant étroitement liés au gène HYPP. Il existe donc très probablement un polymorphisme moléculaire\* de cette affection, peut-être associé à un polymorphisme symptomatique. La paramyotomie congénitale (*Paramyotonia congenita*), affection dominante associée à des contractures musculaires lors de l'exposition au froid, est en effet étroit-

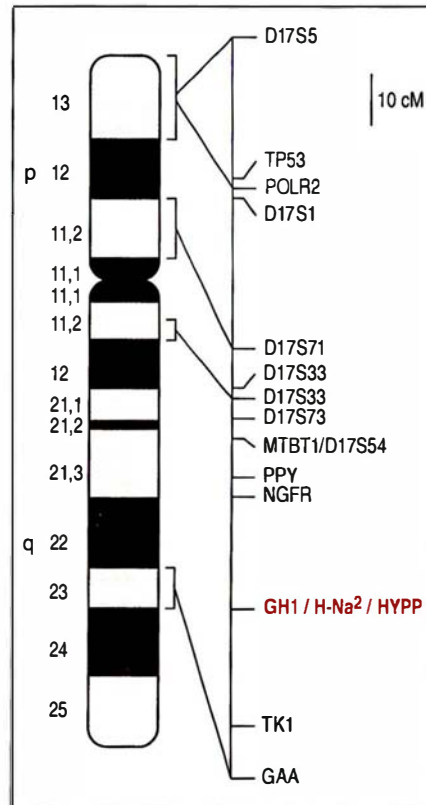


Figure 3. Carte génétique du chromosome 17 humain. p : bras court, q : bras long. Les bandes chromosomiques sont numérotées selon la nomenclature internationale (colonne à gauche du chromosome). Les différents loci (nomenclature internationale) et les distances génétiques sont donnés sur l'échelle à droite du chromosome. Le locus de la maladie de Gamstorp coïncide avec celui du canal sodium (HNa2) et de l'hormone de croissance (GH1).

tement liée génétiquement au gène de la sous-unité  $\alpha$  du canal sodium et pourrait être allélique à la paralysie périodique hyperkaliémique [18].

La stratégie des gènes candidats a également fait récemment ses preuves dans l'étude d'autres affections — comme, par exemple : les rétinites pigmentaires (revue dans [19]), l'angiopathie amyloïde familiale [20, 21] et le syndrome de Kennedy\*\* [22] — et est, à notre avis, appelée à un grand avenir dans la recherche biomédicale en raison des progrès continus dans la connaissance du génome humain ■

## Summary

### Genetic and molecular study of familial dyskalemic periodic paralysis : a success of the candidate gene approach

Identifying the cause of a genetic defect in humans has been first possible in diseases for which the accumulation of an abnormal product could be demonstrated in tissues. From this starting point, the pathological metabolism, and subsequently the pathological gene could be characterized. This approach has been called for historical reasons « classical genetics ». In the 80's, progress in molecular biology enabled geneticists to propose to isolate a gene based only on the knowledge of its precise chromosomal location, a method termed « reverse genetics ». In the recent years, the quantity of information about the human genome has grown so quickly, that it is now possible to combine the former strategies in the so-called « candidate gene approach ». We illustrate this new approach by a study of hyperkalemic periodic paralysis (HYPP), an autosomal dominant genetic disorders in which patients present with acute accesses of muscle paralysis. As muscle paralysis is due to an abnormal depolarization of the muscle membrane, we defined a linkage strategy based on the testing of muscle ionic channels. We finally found linkage between HYPP and the adult  $\alpha$ -subunit of the muscle sodium channel. A mutation of this gene has finally been detected in a familial and a sporadic observation.