

Université de Montréal

**Caractérisation clinique et génétique des myotonies congénitales classiques et atypiques au Saguenay Lac St-Jean**

Rédigé par

**Elsa Rossignol**

Département de physiologie / sciences neurologiques

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Études supérieures

En vue de l'obtention du grade de maîtrise en Sciences neurologiques

Déposé le 23 décembre 2009

© Elsa Rossignol, 2009

Université de Montréal  
Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé :  
Caractérisation clinique et génétique des myotonies congénitales classiques et  
atypiques au Saguenay Lac St-Jean

Présenté par Elsa Rossignol

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

**John Kalaska**

(Président rapporteur)

**Dr Bernard Brais**

(Directeur de recherche)

**Dr Michel Vanasse**

(Membre du jury)

## **Résumé**

Les syndromes myotoniques congénitaux atypiques dus à des mutations du canal sodé voltage-dépendant Nav1.4 se distinguent des myotonies congénitales classiques (canal chlore ClC-1) par la présence de traits atypiques incluant des myotonies douloureuses aggravées au froid et à l'ingestion de potassium.

La caractérisation clinique et moléculaire de plusieurs familles atteintes de ces conditions rares dans la région du Saguenay-Lac-St-Jean nous a permis de découvrir une nouvelle mutation *SCN4A* à effet fondateur causant un phénotype de myotonies douloureuses aggravées au froid, parfois accompagné de phénomènes dystrophiques ou paralytiques. L'ampleur de notre cohorte nous permet de commenter sur l'hétérogénéité phénotypique observée, sur les traits caractéristiques des syndromes associés au gène *SCN4A*, sur les implications physiologiques probables d'une telle mutation ainsi que sur les facteurs modulant le phénotype observé. Enfin, notre étude nous permet de souligner l'importance du dépistage familial systématique afin de prévenir les complications anesthésiques potentielles associées à ces conditions.

### Mots clés :

Myotonie congénitale, paralysie périodique, canaux voltages-dépendants, *SCN4A*, *CLCN1*

**Summary:**

Congenital myotonic syndromes due to mutations of the voltage-gated sodium channel Nav1.4 differ from those due to mutations of the chloride channel CLC-1 as they tend to present atypical traits including painful myotonias and aggravation of symptoms with cold and potassium ingestion. Indeed, after completing the clinical and molecular characterization of a large cohort of patients affected with these rare conditions in the Saguenay Lac-St-Jean area, we were able to describe a new founder *SCN4A* mutation presenting with painful cold-induced myotonias and occasional dystrophic and paralytic episodes. Our study illustrates the wide phenotypic variability and the typical traits of *SCN4A* mutations. In addition, we were able to speculate on the probable physiological consequences of such mutations. Finally, we conclude by stressing the importance of familial screening in order to reduce the incidence of anesthetic complications associated with these conditions.

**Key Words:**

Congenital myotonia, periodic paralysis, potassium-aggravated myotonia, voltage-gated channels, *SCN4A*, *CLCN1*

**Table des matières :**

Page titre.....	i
Composition du jury.....	ii
Résumé et mots clés.....	iii
Abstract and key-words.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux.....	vii
Liste des abréviations.....	viii
Remerciements.....	ix
Corps de l'ouvrage.....	1-68
Introduction.....	1
Revue de littérature.....	4
Méthodes.....	13
Résultats (Article).....	16
Discussion.....	36
Conclusions et perspectives.....	61
Références.....	64

**Liste des figures :**

Figure 1 : Nouvelle mutation M1476I et conservation.....	23
Figure 2 : Canal sodé Na <sub>v</sub> 1.4 et site des mutations .....	24
Figure 3 : Distribution géographique des mutations.....	25
Figure Supplémentaire E1 : Arbres généalogiques.....	27-29
Figure Supplémentaire E2 : Haplotypes.....	31

**Liste des tableaux :**

Tableau 1 : Caractéristiques cliniques mutation M1476I.....	26
Tableau Supplémentaire E1 : Caractéristiques individuelles.....	30

**Liste des abréviations :**

ARN :	Acide ribonucléique
ADN :	Acide désoxyribonucléique
Cl :	Chlore
CK :	Créatine kinase
DM1 :	Dystrophie myotonique de Steinert's
EMG :	Electromyogramme
HYPP :	Paralysie périodique hyperkaliémique
K :	Potassium
PAM :	Myotonies aggravées par le potassium (Potassium-aggravated myotonia)
SCM :	Myotonies congénitales associées au canal sodé Na <sub>v</sub> 1.4 (Sodium Channel Myotonia)
mV :	Millivolt
Na :	Sodium
SLSJ :	Saguenay Lac-St-Jean

## **REMERCIEMENTS**

Certaines rencontres revêtent un caractère exceptionnel et modifient profondément nos choix ainsi que notre cheminement personnel et professionnel. Il s'agit d'événements rares que l'on compte sur les doigts d'une main. J'aimerais donc profiter de l'occasion qui m'est offerte afin de témoigner de ma gratitude envers mes mentors et amis qui m'ont guidée lors de moments charnières des dernières années.

Dr Brais, la combinaison de sensibilité et de compassion faisant de vous un soignant tant apprécié des patients, jumelée à cette élégance intellectuelle qui caractérise vos quêtes scientifiques m'inspire respect et admiration. Merci de m'avoir soutenue, conseillée et guidée dans mes choix professionnels.

Dr Mathieu, votre accueil, votre grande générosité, ainsi que votre perspicacité clinique m'ont permis d'amorcer cette étude et de découvrir avec émerveillement cette belle région qu'est le Saguenay Lac-St-Jean.

Dr Vanasse, votre sagesse et vos conseils m'ont guidée dès ma sortie des classes de médecine et je vous en suis très reconnaissante. Vous avez éveillé ma curiosité quant aux maladies neuromusculaires de l'enfance et votre legs en ce domaine est des plus précieux.

Aux membres du laboratoire de Dr Brais : merci pour votre accueil, vos conseils à travers les écueils et votre gaieté. Marie-Josée, merci pour ta présence rassurante et ton rire communicatif.

Aux membres de mon comité de maîtrise, Dr J. Kalaska et Dr R. Robitaille, je vous suis reconnaissante pour votre soutien et vos intuitions scientifiques.

Merci également aux membres du département de physiologie qui par leurs enseignements m'ont introduite au monde fascinant des neurosciences.

Merci au personnel soignant de la clinique neuromusculaire de Jonquière ainsi qu'aux patients qui ont accepté de participer à cette étude. Vous avez toute ma reconnaissance.

Enfin, merci à mon père, Serge Rossignol, pionnier des neurosciences au Québec, qui m'a appris si tôt à explorer le monde avec curiosité et à suivre mes intuitions.

Valério, mon compagnon de vie, ton soutien au quotidien et ta joie de vivre m'ont permis de m'épanouir personnellement et professionnellement. Merci.

## **I- INTRODUCTION**

Au cours des dernières années, un intérêt croissant a été dévolu à l'étude des conditions neurologiques génétiques associées aux dysfonctions des canaux ioniques tant au niveau du système nerveux central que du système nerveux périphérique (Zuberi and Hanna, 2001; Kullmann and Hanna, 2002; Kass, 2005). Ces pathologies ont en commun l'apparition de symptômes épisodiques (convulsions, migraines, ataxies épisodiques, myotonies) chez des patients ayant par ailleurs un fonctionnement neurologique normal. Ainsi, au niveau du système nerveux central, plusieurs formes d'épilepsies héréditaires ont été associées récemment à des mutations de divers canaux ioniques tels l'épilepsie myoclonique juvénile (sous-unités du récepteur GABA<sub>A</sub>: *GABRA1* 5q34-q35 et *GABRD* 1p36; sous-unité de canaux calciques *CACNB4* 2q22-q23; et canal chlore *CLCN2* 3q26), le syndrome d'épilepsie généralisée avec convulsions fébriles-plus (GEFS+) (sous-unités alpha des canaux sodés Nav 1.1 et 1.2 et sous-unité beta : *SCN1A* 2q24 , *SCN2A* 2q23 , *SCN1B* 19q13, ainsi qu'une sous-unité gamma du récepteur GABA<sub>A</sub>: *GABRG2* 5q31) de même que les convulsions familiales bénignes néonatales (canaux potassiques K de type M : *KCNQ2* 20q et *KCNQ3* 8q). Ces anomalies génétiques ont en commun de causer une hyperexcitabilité neuronale soit en modifiant les paramètres biophysiques de canaux ioniques requis dans le maintien d'un potentiel membranaire stable (dans le cas des canaux voltage-dépendants Na, Cl ou K), en modifiant les probabilité de relâche de neurotransmetteur (canal calcique voltage-dépendant) ou en modifiant la réponse post-synaptique à un neurotransmetteur donné (récepteur GABA<sub>A</sub>).

Des phénomènes similaires peuvent survenir également au niveau du système nerveux périphérique et de l'appareil neuromusculaire. Tout comme les cellules nerveuses du système nerveux central, les fibres musculaires dépendent de la présence de canaux ioniques au fonctionnement étroitement régulé afin de maintenir un potentiel membranaire stable et de générer une contraction musculaire adaptée au mouvement visé. Lorsque cet équilibre est perturbé, des manifestations neurologiques épisodiques telles des myotonies ou des paralysies périodiques peuvent survenir selon que la fibre musculaire réagisse excessivement ou trop peu à

un influx nerveux afférent. Ainsi, plusieurs canaux ioniques voltage-dépendants ont été impliqués dans la pathogénèse de conditions musculaires héréditaires. Les myotonies congénitales classiques de Thomsen (autosomique dominante, OMIM #160800) et de Becker (autosomique récessive, OMIM# 255700) sont attribuables à des mutations du canal chlore CIC-1 (gène *CLCN1*, chromosome 7q35). Les myotonies héréditaires atypiques (aggravées par le potassium : PAM [OMIM #608390], ou SCM : sodium channel myotonia) sont quant à elles dues à des mutations au niveau de la sous-unité alpha du canal sodé Nav1.4 (gène *SCN4A*, chromosome 17q23-q25). D'autres mutations de ce même gène sont responsable de la paramyotonie congénitale (PMC [OMIM #168300] et de la paralysie périodique hyperkaliémique (HYPP [OMIM #170500]). La paralysie périodique hypokaliémique est attribuable à des mutations de la sous-unité alpha du canal calcique Cav1.1 (dihydropyridine, gène *CACNA1S*) de même qu'à des mutations d'une unité accessoire MiRP2 du canal potassique Kv3.4 (gène *KCNE3*).

Ces pathologies musculaires héréditaires demeurent des conditions rares et un nombre restreint de patients a été décrit dans chaque cas. La présence d'effets fondateurs génétiques dans certaines régions géographiques mène parfois à l'apparition de vastes groupes de patients porteurs d'un nombre restreint de mutations causant une condition rare ce qui permet d'en explorer l'étendue phénotypique. Ainsi, nous avons eu le privilège d'étudier une des plus grandes cohortes de patients atteints de myotonie congénitale issue d'un effet fondateur dans la région du Saguenay-Lac-St-Jean (SLSJ). En effet, un dépistage régional méticuleux pour la dystrophie myotonique de Steinert (DM1), dont la prévalence est élevée dans cette région, avait permis au cours des dernières années de déceler des myotonies cliniques et électromyographiques chez plusieurs patients sans atteinte dystrophique et non porteurs de la mutation de la DM1. Ces patients étant globalement beaucoup moins sévèrement atteints et ne nécessitant pas pour la majorité de suivi neurologique régulier n'avaient pas été caractérisés de façon systématique sur les plans cliniques et moléculaires. Nous avons donc entrepris l'étude actuelle afin de compléter la caractérisation clinique et moléculaires de ces patients en poursuivant les objectifs suivants : déterminer l'étendue phénotypique de

cette condition rare, rechercher de nouvelles mutations à effet fondateur et déterminer s'il y a présence d'une corrélation phénotype-génotype dans cette condition. Enfin, nous désirions profiter de cette occasion unique pour compléter l'enseignement aux patients quant à l'évolution attendue ainsi qu'attirer leur attention sur la pertinence de procéder à des dépistages familiaux afin de faciliter la prévention des complications anesthésiques.

Les myotonies congénitales non dystrophiques demeurent des conditions rares et nous aimerions donc débiter ce mémoire par la description des connaissances actuelles sur le sujet en abordant l'historique des recherches antérieures sur ce sujet, les descriptions des présentations cliniques et des anomalies paracliniques (biochimique et électrophysiologiques) associées ainsi qu'un aperçu des données moléculaires connues.

## II- REVUE DE LITTÉRATURE

### II-1) Perspective historique: myotonies congénitales classiques et homéostasie chlorique

Les myotonies congénitales ont été décrites il y a plus d'un siècle et ont, de longue date, intrigué les électrophysiologistes par leur signature électrophysiologique. En étudiant les membres de sa famille élargie, le médecin danois Julius Thomsen offrit la première description des myotonies congénitales dominantes en 1876 (Johnson, 1968). Il décrivit les phénomènes myotoniques et leur amélioration à l'effort répété (« warm-up »). Il nota la grande variabilité phénotypique intra-familiale de cette condition : alors que lui-même et sa mère étaient peu symptomatiques, son jeune frère et sa sœur étaient tous deux très symptomatiques. Un rapport subséquent identifia 64 personnes atteintes sur 7 générations au sein de cette même famille et souligna à nouveau la grande variabilité phénotypique de cette condition (Thomassen, 1948). Une seconde grande famille fut décrite en 1908 à Montréal par Birt, également atteint de la condition, avec un pedigree démontrant une pénétrance réduite avec épargne de générations (Birt, 1908). Par la suite, Becker décrivit l'existence d'une forme récessive de la maladie présentant un phénotype mitoyen entre celui de la forme dominante légère et celui, plus sévère, de la dystrophie myotonique de Steinert's. Il reconnut toutefois l'épargne des autres organes (yeux, cœur, système digestif), permettant ainsi de différencier les myotonies héréditaires des dystrophies myotoniques (Becker, 1979). Il proposa une classification des myotonies héréditaires en cinq classes incluant la forme dominante de Thomsen, puis quatre autres formes avec des présentations atypiques de sensibilité au froid, de crampes douloureuses, et de fluctuations épisodiques.

L'historique des travaux portant sur les myotonies congénitales illustre bien la complémentarité des études cliniques descriptives minutieuses, des évaluations fonctionnelles électrophysiologiques et biochimiques, et des études moléculaires afin d'élucider les mécanismes physiopathologiques sous-tendant les maladies neurologiques héréditaires. Ainsi, en 1904, White et Plaskett décrivent une souche

naturelle de chèvres (les « fainting goats ») présentant des épisodes de rigidité musculaire diffuse lors de mouvements forcés rapides (White and Plaskett, 1904). Ces chèvres présentaient alors des chutes avec extension soutenue de la nuque et des membres d'une durée de 5-20 secondes. Clark reconnu dès 1939 ces manifestations comme étant similaires à celles des myotonies héréditaires chez l'humain (Clark et al., 1939). Par une série d'études menées entre 1966 et 1971, Bryant démontra une réduction de la perméabilité membranaire au chlore dans les muscles intercostaux de ces chèvres puis d'humains atteints de myotonie héréditaires (Lipicky and Bryant, 1966; Lipicky et al., 1971). Puis, au début des années 1980, deux groupes décrivent des souches spontanées de souris présentant des épisodes de raideurs : la souris *adr* (« arrested development of righting response ») (Watkins and Watts, 1984) et la souris *mto* (« myotonic ») (Heller et al., 1982). L'association de ces manifestations à une diminution de conductance au chlore de la membrane sarcoplasmique put alors être étoffée grâce à l'identification chez la souris *adr* d'une mutation (insertion de rétroposon) dans le gène codant pour le canal chlore CIC-1 (Steinmeyer et al., 1991b). Par la suite, les études moléculaires révélèrent l'ajout d'un codon d'arrêt (« stop codon ») dans le même gène chez la souris *mto*, provoquant la troncation du terminus N du canal chlore CIC-1 (Gronemeier et al., 1994). Le gène *CLCN1* fut cloné chez l'humain en 1992 ce qui permit de rechercher des mutations dans ce gène chez les patients atteints de phénotypes myotoniques congénitaux (Koch et al., 1992). Depuis, plus de 80 mutations dans le gène *CLCN1* ont été décrites chez l'humain. Par ailleurs, plusieurs familles présentant des phénotypes myotoniques atypiques (accompagnés de douleurs ou d'aggravation au froid ou au potassium) testés négativement pour des mutations du gène *CLCN1* furent par la suite liées à des mutations du gène *SCN4A* codant pour la sous-unité alpha du canal sodé  $Na_v1.4$  (Ptacek et al., 1992; Heine et al., 1993).

## II-2) Présentation clinique des myotonies congénitales classiques et variantes atypiques:

Les critères diagnostiques utilisés pour classer les syndromes de myotonies congénitales classiques (associées aux mutations du canal chlore CIC-1) incluent la

présence de myotonies sous forme de contractions musculaires involontaires qui surviennent lors d'un mouvement brusque ou d'un effort soutenu, qui sont améliorées par une activité répétée (« warm-up »), sans épisodes de faiblesse franche, de paralysie, ni d'aggravation au froid ou au potassium, et qui s'accompagnent de myotonies perceptibles à l'examen clinique (percussion) ou à l'électromyographie (EMG) (Streib, 1987b). Toute dérogation à ces critères doit faire penser aux syndromes de myotonies atypiques (PAM : Potassium-aggravated myotonia ou SCM : Sodium-channel myotonia) lorsque les myotonies demeurent le symptôme principal. De plus, une aggravation des myotonies à l'effort (absence de warm-up) ou des épisodes de faiblesse et une exacerbation au froid sont caractéristiques des paramyotonies (PMC : Paramyotonia Congenita), alors que la présence d'épisode de paralysie doit faire évoquer les syndromes de paralysie périodiques (incluant les HYPP : Hyperkaliemic Periodic Paralysis et les HOKPP : Hypokaliemic Periodic Paralysis, bien que les symptômes myotoniques soient infréquents chez ces dernières.)

Le symptôme de myotonie, bien que plus ou moins prédominant dans le tableau clinique selon l'entité diagnostique, demeure un élément central du diagnostic (Engel and Franzini-Armstrong, 2004; Colding-Jorgensen, 2005; Jurkat-Rott and Lehmann-Horn, 2005). Dans les syndromes de myotonies congénitales classiques, on note la présence de myotonies spontanées, généralement allégées par des exercices répétés (phénomène de « warm-up ») et ne s'accompagnant pas de phénomène paralytiques francs, ni d'atteintes multisystémiques telles que retrouvées dans la dystrophie myotonique de Steinert. Les myotonies se présentent sous forme de contractions musculaires involontaires soutenues, et se caractérisent à l'électromyogramme par des décharges de potentiel d'action répétées avec fluctuation de la fréquence et de l'amplitude (« myotonic bursts »). Elles surviennent habituellement lors d'un effort volontaire tel une préhension forcée, ou lors d'un mouvement brusque, principalement après une période de repos d'une dizaine de minutes. Elles sont habituellement de courte durée (quelques secondes à 3 minutes) et touchent principalement les mains (flexion soutenue des doigts), les jambes, les orteils, et parfois le cou et la musculature faciale (masseters, orbiculaires). Il arrive

occasionnellement qu'elles soient suivies d'une faiblesse transitoire, principalement lorsqu'elles surviennent dans le contexte d'un effort considérable. Dans les formes sévères avec myotonies soutenues, cette activité musculaire excessive donne parfois lieu à un certain degré d'hypertrophie musculaire.

L'évolution des syndromes de myotonies congénitales classiques dépend en grande partie de l'hérédité et des mutations pathogènes impliquées (Engel and Franzini-Armstrong, 2004; Colding-Jorgensen, 2005; Jurkat-Rott and Lehmann-Horn, 2005). Ainsi, on retrouve deux formes de myotonies congénitales classiques attribuées à des dysfonctions du canal chlore CIC-1: la forme autosomique dominante de Thomsen et la forme récessive de Becker. La forme dominante se caractérise par des myotonies d'apparition précoce durant l'enfance ou l'adolescence, de sévérité légère à modérée, affectant principalement les mains et les jambes. Cette forme est relativement stable au fil des ans. Les patients sont souvent si peu symptomatiques qu'ils consultent rarement pour leurs symptômes. À l'inverse, la forme récessive tend à survenir durant l'enfance avec des myotonies plus sévères parfois même incapacitantes. Les myotonies débutent généralement dans les jambes, et peuvent évoluer pour impliquer les bras puis la musculature faciale. Ceci s'accompagne parfois d'un certain degré d'hypertrophie musculaire, ainsi que de faiblesses transitoires lors de mouvements brusques ou suivant un effort soutenu. Les myotonies des membres inférieurs peuvent être si intenses aux mouvements brusques qu'elles causent des chutes. On note qu'un quart à un tiers des cas récessifs rapportés développe un phénotype plus sévère de type dystrophique après plusieurs années d'évolution (Colding-Jorgensen, 2005), avec élévation des enzymes musculaires (CK) et atrophie des muscles distaux des membres et du cou. On observe alors des changements dystrophiques au niveau de la biopsie musculaire sous forme d'une fibrose diffuse et d'un remplacement graisseux des fibres musculaires de type 2. La sévérité des manifestations phénotypiques peut varier grandement au sein d'une même famille. On reconnaît une forme très discrète voir même asymptomatique de myotonie dominante surnommée Myotonia Levior et pouvant co-exister avec des formes plus sévères de la condition chez d'autres membres de la famille (Lehmann-Horn et al., 1995). Chez certains patients, les myotonies surviennent de façon

intermittente avec de longs intervalles libres (Mailander et al., 1996; Wagner et al., 1998), et parfois principalement durant les grossesses (Wu et al., 2002). Enfin, certaines mutations semblent causer des formes dominantes à pénétrance réduite et la présence de myotonies à l'EMG chez des parents asymptomatiques est parfois considérée comme la manifestation d'un état de porteur (Becker, 1979; Deymeer et al., 1999), bien qu'une forme dominante légère ne peut être entièrement exclue dans certains cas (Zellweger et al., 1980).

Plusieurs patients initialement inclus dans les cohortes de myotonies congénitales classiques dominantes mais présentant certains traits atypiques ont par la suite été classifiés comme souffrant de myotonies aggravées par le potassium (PAM : potassium-aggravated myotonia) (Heine et al., 1993) et on a démontré chez eux des mutations au niveau de la sous-unité alpha du canal sodé voltage-dépendant Nav1.4 (gène SCN4A, chromosome 17q23-25) (Ptacek et al., 1992; Ptacek et al., 1994; Ricker et al., 1994). À l'histoire, les patients décrivent des myotonies sévères, parfois douloureuses, survenant à retardement 5-20 minutes suite à un effort significatif (Ricker et al., 1994). Ces myotonies peuvent aussi être déclenchées par une hyperkaliémie ou une période de jeûne (Trudell et al., 1987), par des médicaments à effet dépolarisant (anesthésie) ou par une exposition au froid (Orrell et al., 1998). Les patients présentent toutefois un phénomène de « warm-up », et n'ont généralement pas de faiblesse franche suite à l'exposition au froid, ce qui les distingue des paramyotonies qui sont aggravées par des efforts répétés et qui s'accompagnent de faiblesse marquée au froid. Encore une fois, la gravité des myotonies dans cette condition suit un spectre de sévérité allant d'une forme légère (myotonia fluctuans) à une forme sévère avec myotonies soutenues et hypertrophie marquée (myotonia permanens). Les muscles des membres, du cou et du visage peuvent tous être touchés dans cette condition. Les phénomènes douloureux associés aux myotonies sont parfois prédominants (Orrell et al., 1998). Par ailleurs, l'histoire clinique d'aggravation des myotonies par ingestion de potassium ou leur apparition retardée suite à un exercice n'est pas toujours aisée à obtenir. Dans ces cas, il est parfois difficile de départager cliniquement les myotonies héréditaires classiques de celles liés aux canaux sodés, et une étude moléculaire est alors requise pour poser le

diagnostic définitif.

### II-3) Évaluation clinique et paraclinique des myotonies classiques et des myotonies atypiques:

L'examen clinique est souvent superposable pour les myotonies congénitales classiques et les myotonies atypiques (Engel and Franzini-Armstrong, 2004). Ainsi, il est généralement possible de démontrer des myotonies à la préhension ou à la percussion des courts abducteurs du pouce et parfois à la percussion d'autres muscles au niveau des avant-bras, des cuisses ou de la langue. On peut à l'occasion observer des myotonies des paupières (lid-lag) après un effort soutenu du regard vers le haut. L'examen révèle également une hypertrophie musculaire plus ou moins prononcée, souvent mieux définie au niveau des membres inférieurs. Certains patients présentent également une faiblesse discrète distale des membres supérieurs ou proximale des membres inférieurs (phénotype dystrophique chez certains patients avec forme sévère de Becker). Les réflexes ostéotendineux sont habituellement intacts. Enfin, dans les cas très légers, l'examen physique peut être entièrement normal et seul l'électromyogramme révèle des décharges myotoniques.

Les examens paracliniques biochimiques sont généralement normaux. Toutefois, les enzymes musculaires (CK) peuvent s'élever discrètement jusqu'à deux ou trois fois la normale. Ceci ne s'accompagne généralement pas de rhabdomyolyse franche ni d'atteinte rénale. Néanmoins, une élévation significative des enzymes musculaires jusqu'à 1670-2170 U/L a été rapportée dans certains cas de myotonies sévères soutenues (myotonia permanens) (Orrell et al., 1998). De même, une élévation transitoire des CK jusqu'à 3800 U/L a été notée chez certains patients ayant développé des complications anesthésiques avec réactions myotoniques diffuses (Farbu et al., 2003; Schoser et al., 2007).

Les études électrophysiologiques démontrent quant à elles des décharges myotoniques. Ces décharges spontanées sont caractérisées par une fluctuation de l'amplitude et de la fréquence des potentiels enregistrés, et sont habituellement brèves avec un début et une fin abrupte. De telles décharges peuvent également être enregistrées chez les porteurs asymptomatiques (Deymeer et al., 1999), mais sont

alors généralement plus brèves et de faible amplitude. Deymeer a pu démontrer une telle activité chez 67% des parents testés dans 18 familles récessives (24% des mères et 71% des pères), pour lesquels l'état de porteur était confirmé au niveau moléculaire (Deymeer et al., 1999). Il est par ailleurs assez fréquent d'enregistrer une activité musculaire spontanée anormale non spécifique sous forme de brèves décharges de complexes répétés, d'ondes pointues positives, ou d'une activité d'insertion excessive. Il est toutefois important de ne pas sur-interpréter de telles décharges car elles peuvent être attribuables uniquement au mouvement de l'aiguille provoquant une irritation musculaire durant l'enregistrement EMG (Streib and Sun, 1982).

#### II-4) Génétique des myotonies congénitales et corrélations génotypes-phénotypes :

La prévalence mondiale des myotonies héréditaires classiques est estimée à environ 1 : 100 000 (Emery, 1991). Certains pays démontrent une prévalence plus élevée avec phénomènes d'effets fondateurs tels que les pays de la Scandinavie où la prévalence est estimée à environ 1 : 10 000 (Papponen et al., 1999). Bien que les pedigrees récessifs soient habituellement plus fréquents, ils comptent souvent moins de membres atteints. La prévalence des myotonies congénitales atypiques (PAM/SCM) n'est pas connue.

Depuis l'association des myotonies congénitales classiques aux mutations du gène *CLCN1* codant pour le canal chlore voltage-dépendant ClC-1, plus de 80 mutations pathogènes ont été décrites dans ce gène (Colding-Jorgensen, 2005). Le gène *CLCN1* est situé sur le chromosome 7q34. *CLCN1* est composé de 23 exons qui s'étalent sur 139,4Mb et son ARNm contient 3093 nucléotides. Ce gène comprend plusieurs sites de liaison consensuels pour des facteurs de transcription myogéniques et deux élément régulateurs (Lorenz et al., 1994). Il code pour une protéine comptant 988 acides aminés. On considère habituellement que les mutations récessives causent une perte de fonction du canal, alors que les mutations dominantes causent un effet de dominance négative (et contaminent la sous-unité intacte) soit par effet sur les propriétés d'inactivation commune, de sélectivité ionique ou de dimérisation (Barchi, 1998; Colding-Jorgensen, 2005)

Les corrélations génotypes-phénotypes des mutations de *CLCN1* ont été récemment révisées (Colding-Jorgensen, 2005). On note plusieurs mutations dominantes avec pénétrance complète (M128V, I290M, S132C, E193K, T268M, V286A, R338Q, S471F, P480L, fs872X), et d'autres avec pénétrance réduite (L198V, A218T, L283F, F307S, A313T, R317Q, G482R, F708L). Par ailleurs, plusieurs mutations dominantes avec phénotypes atypiques ont été répertoriées. Ainsi, certaines mutations se caractérisent par des symptômes intermittents avec de longues périodes asymptomatiques (G200R (Mailander et al., 1996; Wagner et al., 1998), Q522R, T310M (Wu et al., 2002)). Par ailleurs, certains patients voient leurs symptômes aggravés principalement durant les grossesses (G200R (Mailander et al., 1996; Wagner et al., 1998), T310M (Wu et al., 2002)). De son côté la mutation F428S cause un phénotype similaire aux paramyotonies congénitales avec des myotonies transitoires des mains, parfois douloureuses, souvent exacerbées au froid et à l'exercice tel que démontré à l'EMG et accompagnées d'épisodes de faiblesse transitoire (Bouhours et al., 2005). Enfin, un patient porteur de la mutation P932L a été décrit comme présentant un phénotype dystrophique précoce s'accompagnant d'une agénésie du muscle pectoral, de pieds bots, de myotonies des paupières, et d'une atrophie musculaire distale (Nagamitsu et al., 2000). Notons toutefois qu'une autre condition telle la dystrophie myotonique de type II (DM2) pourrait être responsable de ce phénotype puisque les études *in vitro* de la mutation P932L n'ont pu démontrer d'anomalies physiologiques significatives (Simpson et al., 2004). Dans les cas de myotonies congénitales récessives de Becker, la plupart des mutations rapportées causent une troncation de la protéine (Q68X, Q74X, E193X, fs231X, fs258X, fs289X, R300X, fs387X, fs249X, fs433X, Q445X, C481X, fs503X, Q658X, E717X, fs793X, Q807X, fs840X). Une trentaine de mutations ponctuelles faux-sens ont été rapportées, de même que quelques délétions et quelques variations d'épissage. De plus, plusieurs cas d'hétérozygotes composés ont été observés et jusqu'à trois mutations différentes ont été décrites dans un même pedigree récessif. Enfin, certaines mutations ont été rapportées tant dans des pedigrees dominants que récessifs (M128V, G230E, F307S, R317Q, R338Q, A531V, R894X, P932L). Cette particularité s'explique en partie par une pénétrance réduite de mutations

dominantes, des effets fondateurs avec la possibilité d'hétérozygotes composés non détectés dans les populations à fort taux de porteurs, et une expression allélique différentielle.

Les myotonies atypiques (PAM ou SCM) sont quant à elles dues à des mutations dominantes du gène *SCN4A* codant pour la sous-unité alpha du canal sodé voltage-dépendant  $Na_v1.4$ . Le gène *SCN4A* est situé sur le chromosome 17q23-q25 et contient 24 exons répartis sur 62,4Mb. La protéine est composée de 1836 acides aminés. Les six mutations décrites à ce jour sont situées au niveau de la boucle d'inactivation rapide ou du site accepteur de cette boucle, et causent un effet de gain de fonction dominant (Cannon, 1997). La mutation V1589M provoque des myotonies aggravées au froid et à l'exposition au potassium (Heine et al., 1993; Orrell et al., 1998). La mutation G1306A se présente avec des myotonies fluctuantes de sévérité variable, parfois douloureuses, un phénomène de warm-up, et une aggravation au potassium et à l'exercice sans sensibilité au froid (Fournier et al., 2006). La mutation V445M se caractérise par des myotonies douloureuses exacerbées au froid et répondant à la flecainide (Trip et al., 2007). Un phénotype similaire est observé pour la mutation A1481D (Schoser et al., 2007). Enfin, la mutation I1160V cause des myotonies de sévérité variable répondant à l'acétazolamide (Ptacek et al., 1994; Richmond et al., 1997).

Bien que plusieurs cohortes de patients avec myotonies congénitales classiques ou atypiques aient déjà été rapportées à travers le monde, nous avons entrepris l'étude actuelle afin de bénéficier de la présence d'effets fondateurs potentiels au Saguenay-Lac-St-Jean nous permettant de recruter une large cohorte de patients partageant possiblement un nombre restreint de mutations. Cette opportunité nous permettrait alors d'explorer en détail l'éventail phénotypique associé à certaines mutations communes au Québec et possiblement d'identifier de nouvelles mutations pathogènes.

### **III- Méthodes**

#### **III-1) Collecte de données cliniques et prélèvements sanguins:**

Nous avons revus les dossiers de 99 patients provenant de 20 familles et ayant été évalués à la clinique neuromusculaire de Jonquière au cours des vingt dernières années. Nous avons recruté 17 familles (comprenant 66 individus atteints), trois familles n'ayant pas pu être contactées ou ayant décliné de participer à notre étude. Les données médicales touchant l'âge du début des symptômes, l'évolution clinique, les facteurs aggravants (froid, exercice, repas, médication, grossesses) et la présence d'autres symptômes neurologiques (faiblesse transitoire vs persistante) ont été recueillies. Le questionnaire incluait également l'exploration de l'histoire familiale pour confirmer le patron de transmission génétique et permettre le dépistage d'autres membres atteints. Un examen neurologique a été complété auprès de chaque individu recruté afin de documenter la présence d'hypertrophie musculaire, de myotonies au niveau du visage et des membres (spontanées, à l'effort et à la percussion), de faiblesse, ou d'autres signes neurologiques. Les données électrophysiologiques (EMG standard) ont été résumées à partir des dossiers médicaux. Les niveaux biochimiques de créatine kinase et de potassium furent notés lorsque disponibles au dossier. L'exclusion d'autres conditions sous-jacentes expliquant la présence de myotonies (dystrophie myotonique, hypothyroïdie) a été confirmée en notant le dépistage génétique de dystrophie myotonique de Steinert's et les évaluations ophtalmologiques et électrocardiographiques, ainsi que le statut thyroïdien lorsque disponible. Un échantillon sanguin fut prélevé de façon stérile pour un à deux individus atteints par famille (N=32) et 12 individus non-atteints apparentés.

Tous les patients recrutés ont donné un consentement éclairé permettant l'étude génétique de leur échantillon sanguin. La confidentialité des renseignements obtenus a été assurée en accordant à chaque patient un numéro de code conservé de façon confidentielle dans un dossier séparé en la possession du Dr B. Brais.

### III-2) Recherche de mutations par séquençage des gènes *CLCN1* et *SCN4A*

Nous avons débuté l'évaluation génétique des échantillons obtenus en recherchant les mutations des gènes *CLCN1* et *SCN4A* déjà connues dans la population québécoise. Pour ce faire, nous avons séquençé les exons 8, 12 et 13 du gène *CLCN1* et l'exon 12 du gène *SCN4A* chez un patient de chaque famille. Advenant l'identification d'une mutation, celle-ci était recherchée par séquençage ciblé chez les autres membres de la même famille. Les mutations W433R (exon 12) et M485V (exon 13) du gène *CLCN1* ont été retrouvées chez 6 familles (15 patients). Nous avons donc poursuivi l'évaluation des familles restantes en séquençant les 20 autres exons du gène *CLCN1*. Outre plusieurs polymorphismes non pathogènes, aucune autre mutation pathologique ne fut retrouvée. Nous avons donc poursuivi l'investigation en séquençant les exons 9, 22 et 24 du gène *SCN4A* au sein desquelles se retrouvent la majorité des mutations rapportées dans la littérature. Une nouvelle mutation à transmission dominante (M1476I) a ainsi été identifiée dans l'exon 24 du gène *SCN4A* chez 11 familles (comptant 44 individus atteints). Cette mutation n'était pas présente chez les 15 patients avec mutation du gène *CLCN1* et elle fut exclue chez 102 contrôles canadiens-français connus pour dystrophie oculopharyngée.

Les séquençages décrits ci-haut ont été effectués après extraction de l'ADN génomique par les méthodes usuelles incluant la collecte de leucocytes après centrifugation du sang complet, lyse cellulaire, précipitation de l'ADN, purification par lavages successifs avec phénol et chloroforme puis précipitation de l'ADN. Chaque exon fut par la suite amplifié par PCR. Les amorces utilisées ont été générées à l'aide des logiciels Exon Primer et Primer 3 et obtenus auprès d'Invitrogen. Le séquençage fut effectué en employant un séquenceur ABI (Applied Biosystem International) au Centre d'Innovation de Génome Québec et de l'Université McGill. Les séquences furent évaluées à l'aide du programme Seqman 3 (DNA Star). Les modifications de séquences retrouvées furent comparées aux bases de données relatant les mutations et les polymorphismes connus (The Human Gene Mutation Database of the Institute of Medical Genetics in Cardiff [www.hgmd.cf.ac.uk](http://www.hgmd.cf.ac.uk), Single Nucleotide Polymorphism Database of NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP)). Lorsqu'une nouvelle modification était

retrouvée, celle-ci était recherchée dans l'ensemble de notre cohorte (incluant les apparentés non atteints) afin de déterminer s'il s'agissait d'un polymorphisme probable ou d'une nouvelle mutation. S'il s'agissait d'une nouvelle mutation probable, celle-ci était recherchée chez un groupe contrôle de 102 Canadiens français. Enfin, la documentation d'un effet fondateur pour la nouvelle mutation identifiée dans le gène *SCN4A* a été effectuée par haplotypage des familles porteuses à l'aide des marqueurs D17S794, D17S944, D17S1874, D17S181 situés à proximité du gène *SCN4A*.

### III-3) Enseignement auprès des familles recrutées et dépistage familial

Lors des rencontres de recrutement, les patients ont été informés quant aux risques anesthésiques potentiels sous forme de réactions myotoniques diffuses lors d'anesthésie générale avec induction à la succinylcholine. Bien que ces complications soient rares, moins d'une dizaine de cas ayant été rapportés dans la littérature, la combinaison de rigidité diffuse avec spasmes des masséters peut entraîner des complications ventilatoires avec désaturation et occasionnellement des phénomènes de tachycardie, d'hypertension et une augmentation des enzymes musculaires (Lehmann-Horn and Iaizzo, 1990; McClatchey et al., 1992; Vita et al., 1995; Farbu et al., 2003; Veyckemans, 2005). Dans la majorité des cas, ces symptômes s'estompent rapidement avec l'arrêt de l'anesthésie et un réchauffement systémique. Toutefois, un cas de réaction sévère fatale a été rapporté chez un enfant de cinq ans connu pour myotonie congénitale de Thomsen (Veyckemans, 2005). Puisque ces complications tendent à survenir chez des patients par ailleurs peu symptomatiques et n'ayant pas de diagnostic préliminaire d'anomalie musculaire, une vigilance accrue est indiquée lors du traitement de porteurs potentiels. Pour cette raison, un dépistage familial clinique et électrophysiologique fut systématiquement suggéré aux familles recrutées. Ce dépistage est en cours actuellement. De plus, l'instauration d'un traitement à la mexilétine fut proposée aux patients présentant des symptômes myotoniques significatifs.

#### **IV) Résultats**

L'article qui suit a été publié (Neurology 2007;69: 1937-1941) et rend compte des résultats de notre étude. L'éditeur du journal ainsi que chaque co-auteur a fourni son accord écrit afin de permettre l'inclusion de cet article au sein de ce mémoire.

La contribution de chaque co-auteur à ce travail est décrite ci-bas.

**E. Rossignol** : révision de la littérature, recrutement des patients, questionnaire médical et examen neurologique, recrutement des membres de la famille étendue pour chaque cas, révision des données paracliniques (EMG, biochimie), prélèvements sanguins, extraction de l'ADN génomique, production d'amorces spécifiques, amplification génomique par PCR pour chaque exon testé, analyse des séquences génomiques, interprétation des résultats, rédaction de l'article et du mémoire.

**J Mathieu** : neurologue traitant ayant diagnostiqué et suivi les familles au fil des ans.

**I. Thiffault et M. Tétreault**: Étude d'haplotypes. Conseils techniques (PCR)

**M. -J. Dicaire**: Support technique et aide pour l'extraction d'ADN.

**N. Chrestian, N. Dupré, et J. Puymirat**: ont effectué une étude parallèle investiguant les caractéristiques EMG de diverses mutations dans la population québécoise.

**B.Brais** : Supervision et conseils.

NEUROLOGY 2007;69:1937-1941

## **A novel founder *SCN4A* mutation causes painful cold-induced myotonia in French-Canadians**

**E. Rossignol, MD, J. Mathieu, MD, MSc, I. Thiffault, MSc, M. Tétreault, MSc, M. -J. Dicaire, BSc, N. Chrestian, N. Dupré, MD, MSc, J. Puymirat, MD, PhD and B. Brais, MD, MPhil, PhD**

From the Laboratory of Neurogenetics of Motion (E.R., I.T., M.T., M.-J.D., B.B.), Centre for the Study of Brain Diseases, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Université de Montréal; Clinique des Maladies Neuromusculaires (J.M., B.B.), Carrefour de Santé de Jonquière, Saguenay; Service de Neurologie (N.C., N.D.), Centre Hospitalier Affilié Universitaire de Québec, Hôpital Enfant-Jésus, Université Laval; and Laboratoire de Génétique Humaine (J.P.), Centre Hospitalier Universitaire de Québec, pavillon CHUL, Québec, Canada.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Bernard Brais, Laboratoire de Neurogénétique, M4211-L3 Hôpital Notre-Dame-CHUM, 1560 Sherbrooke est, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1

## **Abstract**

**Background:** Myotonia is observed in classic congenital myotonia caused by *CLCN1* mutations and in sodium-channel myotonia (SCM) due to *SCN4A* mutations.

**Methods:** We assessed 66 electrically proven cases of myotonia belonging to 17 French-Canadian families living in the Saguenay-Lac-St-Jean area of Quebec, a region well known for its genetic founder effects. The *CLCN1* gene was sequenced in one affected member of each family. *SCN4A* exons with known SCM mutations were subsequently sequenced in families where no *CLCN1* mutations were found.

**Results:** Six families, 33% of cases (22/66), presenting classic congenital myotonia phenotypes were found to carry two previously identified *CLCN1* mutations. In the other 11 families comprising 66% of cases (44/66), a new dominant *SCN4A* mutation in exon 24 (M1476I) was uncovered and segregated with a variable SCM phenotype. Although all carriers of this novel mutation had electrical myotonia, some were asymptomatic (25%) and age at onset was variable in the others (5 to 67, mean 21). Cold aggravated myotonia was observed in 41% of cases and painful myotonia in 18%. Additional features observed include aggravation of symptoms with pregnancies (7%), localized muscle swelling (2%), myotonic reactions to anesthesia (2%), and food-induced paralysis (2%).

**Conclusions:** This cohort is the largest described with a variable sodium-channel myotonia phenotype caused by a single *SCN4A* mutation. The clinical variability observed in this cohort underlines the phenotypic heterogeneity of *SCN4A* mutations and suggests that variants in other genes likely modulate clinical expression.

**GLOSSARY:** **DM1** = myotonic dystrophy type I; **HYPP** = hyperkaliemic periodic paralysis; **PMC** = paramyotonia congenita; **SCM** = sodium-channel myotonia; **SLSJ** = Saguenay-Lac Saint-Jean.

## **Introduction**

Myotonia represents delayed relaxation of striated muscles following voluntary contraction and is attributed to sarcolemmal hyperexcitability<sup>1,2</sup> EMG reveals spontaneous repetitive discharges with waxing and waning amplitudes and frequencies. Myotonia may occur in toxic, metabolic, and inflammatory myopathies, as well as in hereditary muscle diseases such as classic congenital myotonia, sodium channelopathies (sodium channel myotonias [SCM],<sup>3</sup> paramyotonia congenita [PMC],<sup>4-6</sup> and hyperkaliemic periodic paralysis [HYPP]<sup>7</sup>) and myotonic dystrophy.

The classic congenital myotonias are due to *CLCN1* mutations causing loss of function of the muscle voltage-gated chloride channel.<sup>8</sup> The dominant form of Thomsen<sup>9</sup> is characterized by non-painful myotonia which may be intermittent<sup>10,11</sup> and exacerbated by pregnancies,<sup>12</sup> stress, cold, hunger, and emotional upset The recessive form of Becker<sup>13</sup> presents earlier and is more diffuse. Similar phenotypes may occur with mutations in the muscle sodium channel alpha-subunit gene *SCN4A* (17q23-25).<sup>14</sup> These include potassium-aggravated myotonias,<sup>15</sup> myotonia permanens, myotonia fluctuans,<sup>16,17</sup> and acetazolamide-responsive myotonias,<sup>18,19</sup> collectively labeled SCM.

The founder effect for myotonic dystrophy type I (DM1) in the French-Canadian population of Saguenay-Lac Saint-Jean (SLSJ) has been extensively studied.<sup>20</sup> In the process, a large number of patients presenting myotonia without DM1 were identified. In order to characterize these patients on a clinical and molecular level, we reviewed the charts of 66 patients belonging to 17 families, and recruited 32 affected patients for genetic analysis. We established that two *CLCN1* mutations and one new *SCN4A* mutation are responsible for all cases of congenital myotonic phenotypes in this region. We hereby present the clinical manifestations and phenotypic heterogeneity of this new *SCN4A* mutation.

## **Methods**

*Patients.* French-Canadian families living in SLSJ and presenting electrical myotonia on EMG were identified through the clinical databases of the Neuromuscular Clinic of the Carrefour de Santé de Jonquière (SLSJ area). All families had been clinically evaluated by the same neurologist (J.M.) during the past 20 years and standard EMG had been performed. Patients were not taking any known myotonia-inducing drugs such as statin, chloroquine, or fibric acid derivatives at the time of the initial evaluation and EMG. Myotonic dystrophy type 1 (DM1, MIM #160900) was excluded in all families by molecular testing. Records from 66 familial cases were reviewed and two or more affected cases per family were selected for genetic testing. An informed consent approved by the institutional ethics committee of the Centre Hospitalier Universitaire de Québec was signed by all participants.

*Procedure.* Genomic DNA was extracted from blood samples according to previously described methods.<sup>21</sup> The 23 exons with 100 bp flanking intronic regions of the *CLCN1* gene were amplified by PCR and sequenced in one affected member of each family on an ABI prism automated DNA 3730 sequencer (Applied Biosystem International) at the Genome Quebec Innovation Centre, McGill University. Sequences were analyzed with SeqMan 4.03 (DNA Star, WI) and compared to reference genomic sequence (hg17 NM\_000083, May 2004, UCSC). In families where no *CLCN1* mutations were found, exons 9, 12, 22, and 24 with previously described SCM mutations in the *SCN4A* gene<sup>22</sup> were sequenced. Sequences were compared with reference sequence (hg 17 NM\_000334, May 2004, UCSC). The primers used to amplify exon 24 of *SCN4A* where the novel mutation was uncovered are forward 5'- GAGCAGAGCCACACCAGG-3' and reverse 5'- GGTTCCCTGCAGGGTGTC-3'. The new *SCN4A* mutation was excluded in 102 unrelated French-Canadian controls without myotonia. In order to document a founder effect for this mutation, families were genotyped using markers D17S794, D17S944, D17S1874, D17S1816 located in close proximity to the *SCN4A* gene. Haplotypes were deduced based on family structures.

## **Results:**

*Recruitment and genotyping.* A total of 17 families including 66 affected cases with EMG-confirmed myotonia and no DM1 mutations were identified. We recruited 32 affected patients and 12 non-affected relatives for clinical evaluations and DNA sampling.

Sequencing the *CLCN1* gene revealed two known mutations in six families. Their phenotypes were concordant with descriptions of classic congenital myotonia.<sup>23</sup> In the remaining 11 families (figure E-1, p27-29), the presence of frequent cold aggravated myotonia raised the possibility that they carried a *SCN4A* mutation. Sequencing of *SCN4A* exons with previously described mutations revealed a new dominant missense mutation in exon 24: *c.4428G>A* (M1476I) (figure 1, p23). This mutation segregated with the phenotype in the remaining 11 families and was excluded in a panel of 102 unrelated French-Canadian controls without myotonia (204 chromosomes). This mutation is the most common non-DM1 myotonia mutation in the SLSJ region: it was found in 65% of recruited families and 66% of identified cases (44/66). Although the families carrying this mutation are found in all parts of the SLSJ region, a large cluster of families is found around St-Félicien in the less populated northwestern part of the region (figure 2, p24). All families carrying this mutation share a common cosegregating four markers haplotype which confirms that there is a founder effect for this mutation in SLSJ (figure E-2, p31). This new *SCN4A* mutation causes an amino acid substitution of methionine for isoleucine at residue 1476. The 1476 methionine is a conserved amino acid in all species and is located on the S4-5 cytoplasmic loop of domain IV (figure 3, p25).

*Clinical characteristics of cases carrying the novel *SCN4A* M1476I mutation.* Significant clinical variability was observed in this cohort despite the fact that all patients shared the same mutation and a founder *SCN4A* haplotype (table 1, p26, and table E-1, p30). Mean age at symptoms onset was 21 years (range 5 to 67), and mean age at diagnosis was 42 years (range 5 to 86). A quarter of carriers were asymptomatic (25%, 11/44), despite having myotonic discharges on EMG. Most

cases had mild symptoms (61%, 27/44). Only 14% (6/44) of cases had moderate to severe symptoms causing significant discomfort or requiring medication. A minority of patients (5%, 2/44) developed permanent proximal weakness. The most constant features were cold-aggravated myotonia in 41% (18/44) or 55% of symptomatic individuals (18/33) and painful myotonia in 18% (8/44) or 24% of symptomatic individuals (8/33). Additional rarer manifestations were noted in eight patients including aggravation of myotonia with pregnancy in three patients; generalized rigidity with anesthesia, which occurred in one patient; and rhabdomyolysis with aggravated myotonia and elevated CK to 5,000 U, which followed a viral infection in one patient. One patient developed persistent localized swelling of her brachialis muscle following intense exercise. Finally, one patient developed proximal leg weakness with aging and experienced three episodes of meal-induced paralysis lasting 30 minutes after age 60 years. Most patients had stable symptoms over 10 to 20 years of observation but three developed more severe generalized myotonia.

Potassium challenge was not conducted during the evaluation of our patients. When administered, the following medications were not beneficial: quinidine, quinine, phenytoin, carbamazepine, amitriptyline, and gabapentin. Acetazolamide was tried in one case and found ineffective. The identification of *SCN4A* mutation in this cohort led to initiation of mexiletine in one patient at a dose of 200 mg twice a day with considerable improvement of his myotonia. Other symptomatic patients will be offered this treatment and therapeutic response will be monitored over the next few years. In addition, thorough electromyographic evaluation of these patients with exercise and cold provocation has been undertaken and will be the object of a subsequent report.

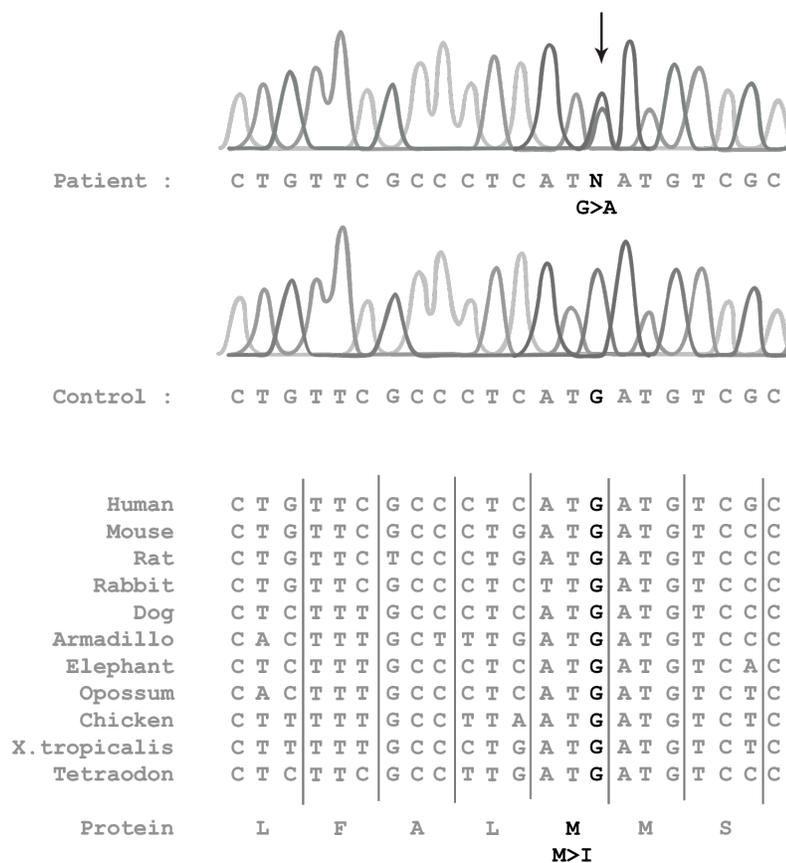


Figure 1 :

The new M1467I mutation in *SCN4A* causes substitution of a highly conserved amino acid.

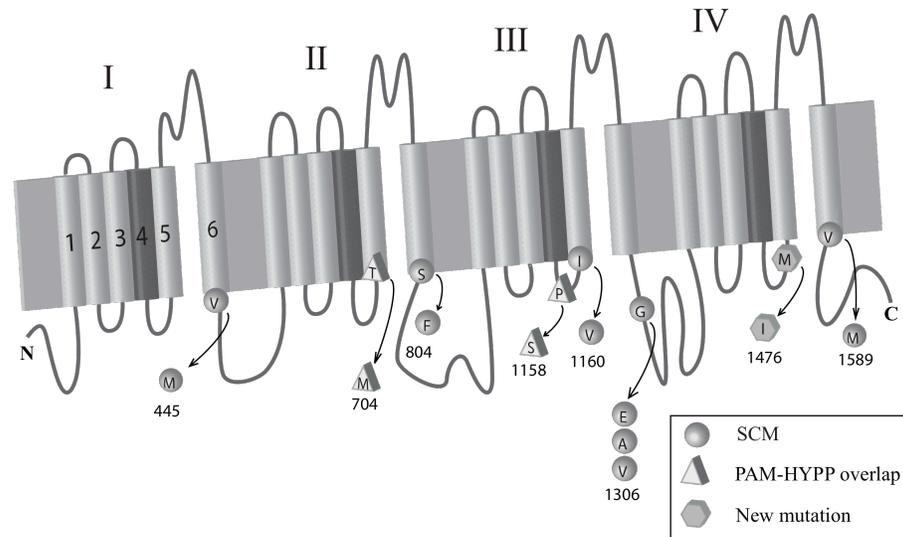


Figure 2 :

Structure of Nav1.4 sodium muscle channel *SCN4A* and positions of known SCM mutations and PAM-HYPP overlap mutations. Note that all other SCM mutations are located on III-IV linker (inactivation gate) or on its presumed acceptor sites on cytoplasmic portions of segments S5, S6 or S4-5 linkers.

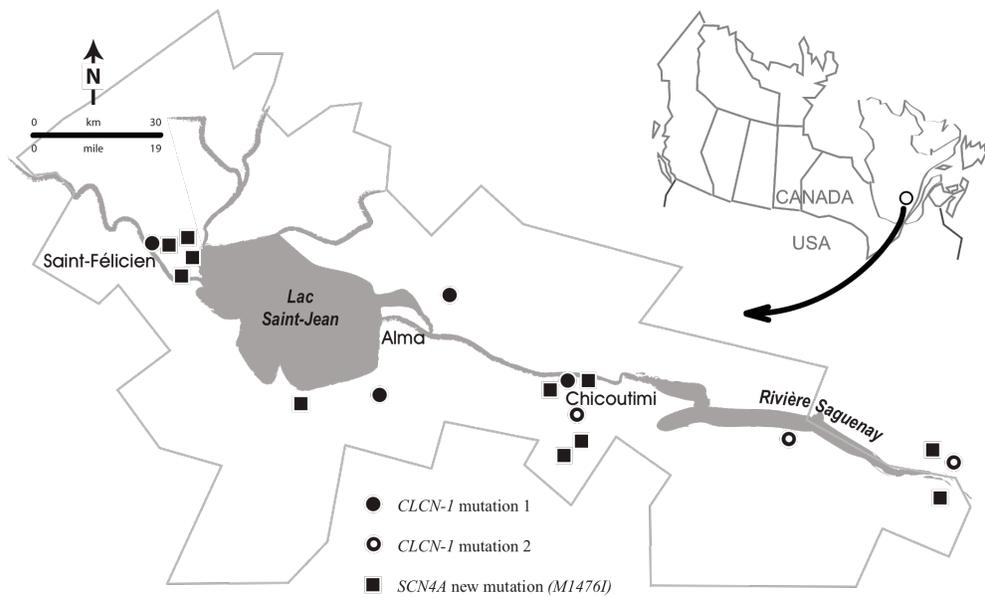


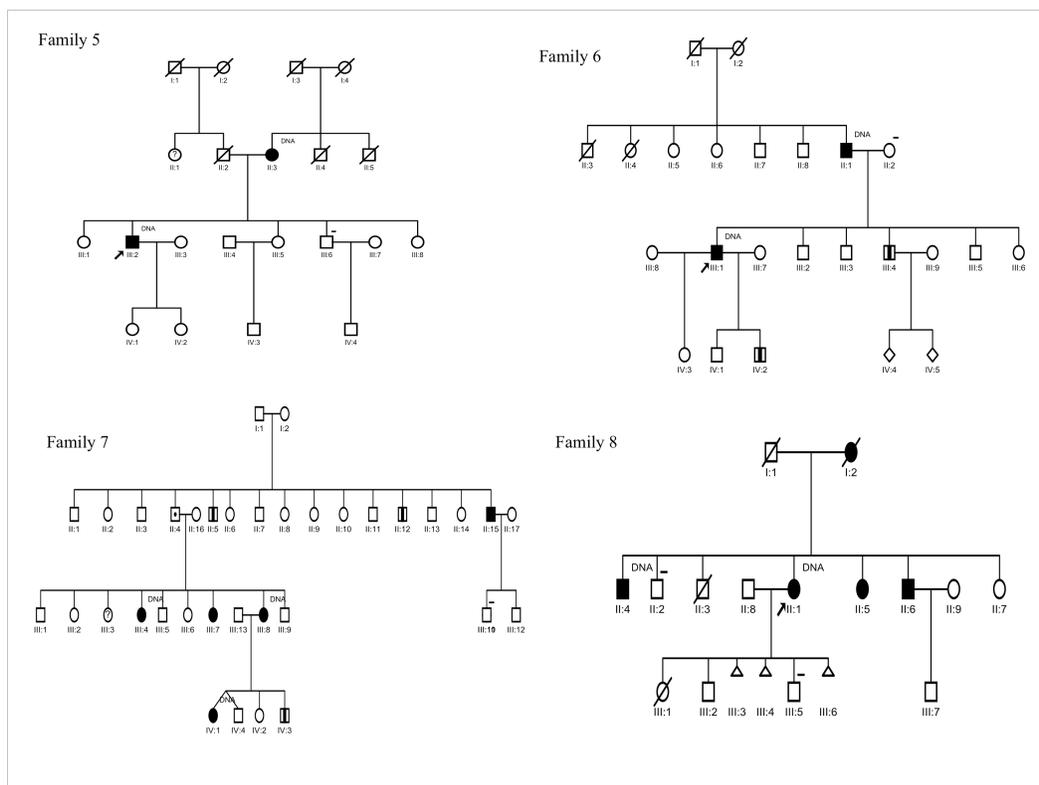
Figure 3 :  
Geographic distribution of families carrying the new *SCN4A* mutation with notable clustering around Saint-Félicien in the Saguenay-Lac Saint-Jean region ( SLSJ)

Table Clinical characteristics of affected patients in families carrying the novel <i>SCN4A</i> mutation (M1476I)	
No. of affected patients	44
Age at symptom onset in symptomatic patients, y	21 (5-67)
Age at diagnosis, y	42 (5-86)
Severity of symptoms	
Asymptomatic	11 (25%)
Mild symptoms	27 (61%)
Severe symptoms (requiring treatments or impairing activities)	4 (9%)
Severe symptoms and persistent proximal weakness	2 (5%)
Common associated features	
Cold aggravation	18 (41%)
Painful myotonia	8 (18%)
Rare associated features	
Aggravation with pregnancy	3 (7%)
Anesthetic complications	1 (2%)
Paralytic episodes	1 (2%)
Rhabdomyolysis	1 (2%)
Localized persistent swelling	1 (2%)

Table 1:

Summary of clinical characteristics of affected patients carrying the novel M1476I *SCN4A* mutation. Note that although the majority of patients had mild symptoms, severity range varied significantly. Cold aggravation and presence of painful myotonias were frequent.





Supplementary Figure 1b :

Family trees for recruited families (#5-8) carrying the new M1476I mutation. Confirmed affected members are depicted in black, suspected affected members (from collected information) in grey, unaffected in white.



PATIENT	FAMILY #	SEX	AGE AT ONSET	AGE AT DX	SEVERITY	MYOTONIA	COLD	PAIN	PERS. WEAKNESS	ASSOCIATED FEATURES	TX
IV:6	1	F	13	26	MILD	H					
III:7	1	M	13	42	MILD	LL, H					
III:4	1	F	13	44	MILD	LL, UL					
II:10	2	F	35	67	MILD	LL, H					
II:9	2	F	67	68	MILD	F					
III:7	2	F	41	42	SEVERE	UL, N	YES				PHT, QUININE
III:1	2	M	ASX	43	ASX	ASX					
III:2	2	M	ASX	42	ASX	ASX					
IV:2	2	M	13	18	MILD	LL, H					
IV:1	2	F	13	16	MILD	LL, H					
IV:10	3	F	15	29	MILD	LL, H, J				PREGNANCY: AGGRAVATION SX	
V:3	3	F	5	5	MILD	LL, H	YES	YES			
V:2	3	M	5	12	MILD	H, J, E	YES				
III:11	3	F	6	44	MILD	LL, H					
III:6	3	F	6	53	SEVERE	LL, H, E, T		YES		PREGNANCY: AGGRAVATION SX	
IV:12	3	F	15	25	MILD	F, H, E	YES				
IV:16	3	F	13	34	MILD	F, H	YES				
IV:19	3	F	12	28	SEVERE	LL, H, N, T	YES	YES		PREGNANCY: AGGRAVATION SX	QUINIDINE, CBZ, PHT, AMT, ACZ, GPT
III:22	3	M	35	54	MILD	H	YES				
IV:17	3	M	13	22	MILD	F, H, E	YES				
IV:20	3	M	20	23	MILD	LL, H	YES				
III:21	3	M	40	59	MILD	H	YES				
III:3	4	M	30	40	MILD	H, F	YES				
III:1	4	F	20	40	SEVERE	LL, H, N, J	YES	YES			
III:2	5	M	ASX	44	ASX	ASX					
II:3	5	F	ASX	86	ASX	ASX					
II:1	6	M	ASX	64	ASX	ASX					
III:1	6	M	6	40	MILD	LL, UL	YES			ANESTHETIC RIGIDITY	
II:15	7	M	ASX	47	ASX	ASX					
III:7	7	F	6	38	MILD	ASX					
III:4	7	F	13	46	MILD	LL, H					
IV:1	7	F	14	17	SEVERE +WEAK	LL, H, N	YES	YES	PROX LL	RHABDOMYOLYSIS (CK 5000)	QUININE
III:8	7	F	13	40	MILD	H	YES				
II:4	8	M	ASX	50	ASX	ASX					
III:1	8	F	6	43	MILD	LL, H, J	YES	YES			
II:6	8	M	ASX	40	ASX	ASX					
I:2	8	F	ASX	69	ASX	ASX					
II:5	8	F	ASX	42	ASX	ASX					
IV:2	9	F	ASX	69	ASX	ASX					
V:1	9	F	28	38	MILD	LL, H	YES	YES			
III:1	10	M	13	54	SEVERE +WEAK	LL, UL	YES	YES	PROX LL AND UL	3 MEAL-INDUCED PARALYTIC EPISODES	
IV:1	11	F	45	44	MILD	H					
III:1	11	M	60	79	MILD	H					
IV:5	11	F	35	55	MILD	F					

Supplementary E-table 1:

Clinical characteristics for individual patients. Proband in family 5 had fortuitous diagnosis of myotonia on an EMG for carpal tunnel syndrome. His relatives were screened subsequently.

Abbreviations: M (male), F (female), ASX (asymptomatic), LL (lower limbs), UL (upper limbs), F (feet), H (hands), N (neck), J (jaws), SEVERE + WEAK (severe symptoms and persistent weakness), PERS WEAKNESS (persistent weakness), PROX (proximal)

Tx: Therapeutic strategies. Doses were increased as tolerated up to the following therapeutic doses. PHT (Phenytoin 100 mg TID), CBZ (Carbamazepine 200 mg TID), AMT (Amitriptylline 50 mg QHS), ACZ (Acetazolamide 250 mg BID), GPT (Gabapentin 400 mg TID), Quinine (300 mg BID).

	Marker name	D17S794	D17S944	SCN4A	D17S1874	D17S1816
	Genetic position (cM)	92,02	92,76		94,94	95,49
	Physical position (Mb)	58,17	58,78	59,36	61,6	61,85
Family ID	ID	M1476I				
1	III:4	248	232	+	188	282
		245	238	-	182	298
2	II:10	248	232	+	188	296
		245	230	-	186	294
2	III:7	0	0	+	188	296
		0	0	-	0	294
3	V:3	0	0	+	188	270
		0	0	-	182	282
3	IV:19	248	232	+	188	0
		248	234	-	180	0
4	III:1	0	232	+	188	0
		0	228	-	182	0
5	II:3	248	232	+	188	296
		238	238	-	180	284
5	III:2	248	232	+	188	296
		250	232	-	180	0
6	III:1	248	232	+	188	296
		248	238	-	182	284
6	II:1	248	232	+	188	296
		248	238	-	180	298
7	IV:1	248	232	+	188	296
		243	234	-	186	294
7	III:3	248	232	+	188	298
		245	238	-	180	300
8	III:1	248	0	+	188	296
		241	0	-	180	294
8	II:4	248	232	+	188	294
		243	228	-	178	298
9	V:1	0	0	+	188	296
		0	0	-	0	296
10	III:1	248	232	+	188	296
		248	244	-	188	300
11	III:1	248	232	+	188	0
		243	232	-	180	0
11	IV:5	248	0	+	176	0
		243	0	-	180	0
11	IV:1	248	232	+	180	296
		243	230	-	182	296

**Supplementary E-Figure 2:** A common haplotype co-segregates with *M1476I* mutation in affected families demonstrating a founder effect in SLSJ area for this new *SCN4A* mutation.

## **Discussion**

We describe a group of 44 French-Canadian cases of autosomal dominant SCM myotonia belonging to 11 families that share a novel *SCN4A* founder mutation. We postulate that this is a pathogenic mutation which causes the phenotype observed in our cohort for the following reasons. First, it segregates on a shared historical haplotype in our families in which *CLCNI* mutations were excluded. Second, it is absent in 204 French-Canadian control chromosomes. Third, it modifies a highly conserved amino acid (figure 1, p23) strategically located on a cytoplasmic loop known to be involved with fast inactivation of the voltage-gated muscle sodium channel. Physiologic confirmation of the pathogenicity of this mutation could be obtained through functional expression studies.

*SCN4A* mutations known to cause SCM alter kinetics of the muscle voltage-gated sodium channel. They have been shown to slow the rate of inactivation, accelerate recovery from inactivation, shift the availability curves toward more depolarized states, and increase the persistent current by two- to fourfold<sup>3</sup> Their net effect is to prolong action potential duration by destabilizing the inactivation state. In addition, potassium trapping in the t-tubules following repeated discharges appears to contribute to the generation of myotonic discharges as it creates a local depolarization sufficient to trigger spontaneous discharges.<sup>3</sup>

The localization of our new mutation on the cytoplasmic side of the sodium channel is comparable to that of other SCM mutations (figure 3, p25). These have been found either on the inactivation gate (DIII-IV linker) or on its acceptor site (cytoplasmic sides of segments 5–6 of each domain). Our proposed new mutation is located on the S4-5 linker of domain IV. This particular loop has been shown to be essential for intact fast inactivation and coupling activation to fast inactivation.<sup>24–29</sup> The nearby F1473S mutation causes a PMC phenotype.<sup>30</sup> Functional studies of this mutation have revealed that it slows fast inactivation twofold and that it accelerates recovery from inactivation fivefold.<sup>28</sup> Other mutations at this site (L1482C/A and S1478Q) have been shown to induce persistent sodium currents, shift the steady-state

inactivation curve toward depolarization, and accelerate recovery from fast inactivation.<sup>24,28,29</sup> These mutations also affected slow inactivation by increasing accession to slow inactivation and prolonging recovery from slow inactivation.<sup>24</sup> In addition, the P1158S mutation causing an overlap PAM-HYPP phenotype is located on the S4-5 linker of adjacent domain III. In view of this, our proposed mutation located on the cytoplasmic S4-5 linker of domain IV would be strategically positioned to equally alter both fast and slow inactivation mechanisms and explain the observed phenotype.

Individuals with the new *SCN4A* mutation identified in this study demonstrate great phenotypic heterogeneity ranging from asymptomatic myotonic discharges on EMG to severe diffuse myotonia. This is concordant with previous reports of phenotypic variability in *SCN4A* mutations.<sup>31</sup> For instance, the G1306V mutation produced a HYPP-PMC phenotype in one family<sup>11</sup> and a benign myotonia fluctuans phenotype in another.<sup>26</sup> The most common distinctive features in our cohort are that 41% of patients have cold aggravated myotonia, and that 18% have painful myotonia. In addition, one of our patients presented with lifelong myotonia and eventually developed transient paralytic episodes reminiscent of HYPP, which may evoke a SCM-HYPP overlap phenotype. He had no known medical conditions such as hypothyroidism that could explain transient weakness. Similar mixed phenotypes in muscle sodium channelopathies have been previously described. For instance, a patient with heat-induced myotonia responsive to acetazolamide and cold-induced paralysis was shown to carry the P1158S mutation located on the intracellular S4-5 linker of domain III.<sup>32,33</sup> As only one patient in our cohort presented this mixed phenotype, we postulate that polymorphisms elsewhere in *SCN4A* or in other genes affect clinical expression of the M1476I mutation in this patient. The phenotypic variability observed in this large French-Canadian cohort with cold-aggravated painful myotonia due to a novel founder dominant *SCN4A* mutation reinforces the notion that other genetic variants are responsible for modulating the clinical expression of sodium channelopathies.

Received December 27, 2006. Accepted in final form May 30, 2007.

## References

1. Cannon SC. Ion-channel defects and aberrant excitability in myotonia and periodic paralysis. *Trends Neurosci* 1996;19:3–10.
2. Lehmann-Horn F, Rudel R, Jurkat-Rott K. Nondystrophic myotonias and periodic paralyses. *Myology*. New York: McGraw-Hill, 2004:1257–1300.
3. Cannon SC. From mutation to myotonia in sodium channel disorders. *Neuromuscul Disord* 1997;7:241–249.
4. Ebers GC, George AL, Barchi RL, et al. Paramyotonia congenita and hyperkalemic periodic paralysis are linked to the adult muscle sodium channel gene. *Ann Neurol* 1991;30:810–816.
5. Koch MC, Ricker K, Otto M, et al. Linkage data suggesting allelic heterogeneity for paramyotonia congenita and hyperkalemic periodic paralysis on chromosome 17. *Hum Genet* 1991;88:71–74.
6. Ptacek LJ, Trimmer JS, Agnew WS, Roberts JW, Petajan JH, Leppert M. Paramyotonia congenita and hyperkalemic periodic paralysis map to the same sodium-channel gene locus. *Am J Hum Genet* 1991;49:851–854.
7. Fontaine B, Khurana TS, Hoffman EP, et al. Hyperkalemic periodic paralysis and the adult muscle sodium channel alpha-subunit gene. *Science* 1990;250:1000–1002.
8. Steinmeyer K, Klocke R, Ortlund C, et al. Inactivation of muscle chloride channel by transposon insertion in myotonic mice. *Nature* 1991;354:304–308.
9. Thomsen J. Tonische Krämpfe in willkürlich beweglichen Muskeln in Folge von merbter psychischer Disposition. 6 ed. 1876:702–718.
10. Mailander V, Heine R, Deymeer F, Lehmann-Horn F. Novel muscle chloride channel mutations and their effects on heterozygous carriers. *Am J Hum Genet* 1996;58:317–324.
11. Wagner S, Deymeer F, Kurz LL, et al. The dominant chloride channel mutant G200R causing fluctuating myotonia: clinical findings, electrophysiology, and channel pathology. *Muscle Nerve* 1998;21:1122–1128.
12. Wu FF, Ryan A, Devaney J, et al. Novel CLCN1 mutations with unique clinical and electrophysiological consequences. *Brain* 2002;125:2392–2407.
13. Becker PE, Zur Genetik der Myotonien.. In: Kuhn E, ed. *Progressive Muskeldystrophies Myotonie Myasthenie*. Berlin: Springer-Verlag, 1966:247–255.
14. Ptacek LJ, Tawil R, Griggs RC, Storvick D, Leppert M. Linkage of atypical myotonia congenita to a sodium channel locus. *Neurology* 1992;42:431–433.
15. Heine R, Pika U, Lehmann-Horn F. A novel SCN4A mutation causing myotonia aggravated by cold and potassium. *Hum Mol Genet* 1993;2:1349–1353.
16. Ricker K, Lehmann-Horn F, Moxley RT. III. Myotonia fluctuans. *Arch Neurol* 1990;47:268–272.
17. Ricker K, Moxley RT III, Heine R, Lehmann-Horn F. Myotonia fluctuans. A third type of muscle sodium channel disease. *Arch Neurol* 1994;51:1095–1102.
18. Ptacek LJ, Tawil R, Griggs RC, et al. Sodium channel mutations in acetazolamide-responsive myotonia congenita, paramyotonia congenita, and hyperkalemic periodic paralysis. *Neurology* 1994;44:1500–1503.
19. Trudell RG, Kaiser KK, Griggs RC. Acetazolamide-responsive myotonia congenita. *Neurology* 1987;37:488–491.
20. Yotova V, Labuda D, Zietkiewicz E, et al. Anatomy of a founder effect: myotonic dystrophy in Northeastern Quebec. *Hum Genet* 2005;117:177–187.
21. Zelinski T, Coghlan G, Myal Y, et al. Genetic linkage between the Kell blood group system and prolactin-inducible protein loci: provisional assignment of KEL to chromosome 7. *Ann Hum Genet* 1991;55:137–140.
22. Cannon SC. Voltage-gated ion channelopathies of the nervous system. 1 ed. Elsevier: 2001,104–117.
23. Colding-Jorgensen E. Phenotypic variability in myotonia congenita. *Muscle Nerve* 2005;32:19–34.
24. Alekov AK, Peter W, Mitrovic N, Lehmann-Horn F, Lerche H. Two mutations in the IV/S4-S5 segment of the human skeletal muscle Na<sup>+</sup> channel disrupt fast and enhance slow

- inactivation. *Neurosci Lett* 2001;306:173–176.
25. Filatov GN, Nguyen TP, Kraner SD, Barchi RL. Inactivation and secondary structure in the D4/S4-5 region of the SkM1 sodium channel. *J Gen Physiol* 1998;111:703–715.
  26. Lerche H, Peter W, Fleischhauer R, et al. Role in fast inactivation of the IV/S4-S5 loop of the human muscle Na<sup>+</sup> channel probed by cysteine mutagenesis. *J Physiol* 1997;505 (Pt 2):345–352.
  27. McPhee JC, Ragsdale DS, Scheuer T, Catterall WA. A critical role for the S4-S5 intracellular loop in domain IV of the sodium channel alpha-subunit in fast inactivation. *J Biol Chem* 1998;273:1121–1129.
  28. Mitrovic N, Lerche H, Heine R, et al. Role in fast inactivation of conserved amino acids in the IV/S4-S5 loop of the human muscle Na<sup>+</sup> channel. *Neurosci Lett* 1996;214:9–12.
  29. Popa MO, Alekov AK, Bail S, Lehmann-Horn F, Lerche H. Cooperative effect of S4-S5 loops in domains D3 and D4 on fast inactivation of the Na<sup>+</sup> channel. *J Physiol* 2004;561:39–51.
  30. Bulman DE, Scoggan KA, van Oene MD, et al. A novel sodium channel mutation in a family with hypokalemic periodic paralysis. *Neurology* 1999;53:1932–1936.
  31. Hudson AJ, Ebers GC, Bulman DE. The skeletal muscle sodium and chloride channel diseases. *Brain* 1995;118(Pt 2):547–563.
  32. Sugiura Y, Aoki T, Sugiyama Y, Hida C, Ogata M, Yamamoto T. Temperature-sensitive sodium channelopathy with heat-induced myotonia and cold-induced paralysis. *Neurology* 2000;54:2179–2181.
  33. Sugiura Y, Makita N, Li L, et al. Cold induces shifts of voltage dependence in mutant SCN4A, causing hypokalemic periodic paralysis. *Neurology* 2003;61:914–918.

## **V) Discussion**

Au cours de cette étude, nous avons recruté une des plus amples cohortes de patients atteints de myotonie congénitale non dystrophique. Ceci nous a permis de faire plusieurs observations que nous aimerions discuter au cours des prochaines pages. En premier lieu, tout comme cela avait été décrit dans les myotonies congénitales classiques liées au gène *CLCN1*, notre étude souligne la grande hétérogénéité phénotypique qui se retrouve chez les patients souffrant de myotonie congénitale atypique liée au gène *SCN4A*. Deuxièmement, notre étude révèle certaines caractéristiques phénotypiques distinctives des mutations du gène *SCN4A*. Lorsque de tels phénomènes sont présents, cette observation permet de mieux cibler l'analyse moléculaire en favorisant d'abord le séquençage de *SCN4A* plutôt que celui de *CLCN1*. Troisièmement, notre étude a permis de décrire une nouvelle mutation du gène *SCN4A*, soit M1476I, dont la localisation au niveau du site accepteur de la boucle d'inactivation rapide du canal sodé permet de considérer l'impact physiopathologique d'une telle mutation sur l'homéostasie musculaire. En quatrième lieu, nous notons qu'il existe un certain chevauchement phénotypique entre les diverses conditions alléliques associées au gène *SCN4A* et que certains patients présentent des phénotypes mixtes de myotonie/paramyotonie/paralysie périodique. Enfin, la description de l'évolution à long terme de plusieurs patients évalués durant cette étude nous permet de commenter sur les complications possibles de cette condition, sur l'impact de symptômes précoces sur l'évolution globale et sur la pertinence d'un dépistage familial lors du diagnostic d'un cas indexe.

### **V-1) Hétérogénéité phénotypique**

L'ampleur de la cohorte évaluée pour cette étude nous a permis d'observer l'hétérogénéité phénotypique retrouvée chez les patients souffrant de myotonies congénitales classiques liées au canal chlore, et de façon plus frappante celle retrouvée lors de mutations du canal sodé. En effet, chez nos familles avec mutations du gène *SCN4A*, 25% des patients étaient asymptomatiques mais présentaient des myotonies électriques, alors que 61 % des patients présentaient des symptômes légers et 14% des patients souffraient de symptômes sévères parfois associés à une

faiblesse proximale persistante. De plus, alors que la majorité des patients présentait un phénotype de myotonies isolées non-douloureuses similaire au phénotype des myotonies congénitales classiques de Thomsen, 18% des patients rapportaient des myotonies douloureuses et 41% une aggravation au froid. Ceci est d'autant plus intéressant qu'une telle hétérogénéité est manifeste de façon intrafamiliale, parfois même au sein d'une même fratrie.

La présence d'une telle variabilité de la sévérité phénotypique était déjà bien connue pour les myotonies congénitales associées au canal chlore (Colding-Jorgensen, 2005). En effet, les descriptions cliniques des membres de la famille étendue du Dr Thomsen pointaient déjà dans ce sens puisque ses frères et sœurs cadets étaient fortement symptomatiques alors que sa mère et son frère aîné l'étaient très peu (Johnson, 1968). Plusieurs familles présentant une telle variabilité phénotypique ont depuis été décrites. Ainsi, une patiente porteuse de la mutation T550M ayant présenté des myotonies dès l'âge de 7 ans et évolué vers un phénotype dystrophique avec faiblesse et dysphagie à l'âge adulte manifestait un phénotype beaucoup plus sévère que son fils, son frère et deux neveux également porteur de la même mutation (Wu et al., 2002). Il demeure possible que certains de ces patients avec phénotypes plus sévères soient en fait porteurs d'une seconde mutation non dépistée parce que localisée dans une région non séquencée (ex : intron, site d'épissage), ou que des polymorphismes dans d'autres gènes contribuent à la sévérité du phénotype.

Par ailleurs, les familles souffrant de myotonies congénitales associées au canal sodé rapportées dans la littérature étant plus restreintes, l'hétérogénéité phénotypique intra et interfamiliale n'avait pu être mise en évidence aussi clairement que dans notre cohorte. Certes, divers phénotypes ont été attribués aux mutations du canal sodé Nav1.4 incluant les Myotonia Permanens (Spaans et al., 1990), Myotonia Fluctuans (Ricker et al., 1994) et les Acetazolamide-responsive myotonia (Trudell et al., 1987), regroupées sous le label Potassium-Aggravated Myotonia (PAM : OMIM 608390) ou Sodium Channel Myotonia (SCM). Dans certains cas, la même mutation se manifeste différemment d'une famille à l'autre. Ainsi, deux patients non-apparentés porteurs de la mutation G1306E ont été décrits comme souffrant de

Myotonie Permanens. Notons toutefois que leurs phénotypes différaient puisque la première patiente présentait un phénotype sévère de myotonies électriques continues affectant les membres et les muscles respiratoires (Lerche et al., 1993), alors que le second patient présentait un phénotype myotonique sévère sans atteinte respiratoire mais associé à un nanisme et à des traits dysmorphiques (Spaans et al., 1990). Par la suite, un large pedigree dominant comptant possiblement 12 individus atteints (2 patients examinés et prouvés porteurs de la mutation G1306E) présentant des myotonies douloureuses modérées-sévères fluctuantes, aggravées au froid et accompagnées d'une élévation légère des enzyme musculaires (CK) fut décrit (Colding-Jorgensen et al., 2006). Une telle variation phénotypique interfamiliale se retrouve également chez les patients porteurs de la mutation V1589M, initialement décrite dans un contexte de myotonies aggravées par le froid et le potassium (PAM) (Heine et al., 1993), puis chez des patients présentant un phénotype de crampes avec myotonies légères (Orrell et al., 1998), et enfin chez plusieurs membres d'une famille présentant un phénotype de PMC avec des myotonies sévères exacerbées au froid impliquant les membres et la musculature oropharyngée (causant un stridor au froid chez la probande) associées à des épisodes de faiblesse franche (Ferriby et al., 2006).

En ce qui touche la variabilité intrafamiliale, un large pedigree comptant 17 atteints porteurs de la mutation A1481D a été décrit (Schoser et al., 2007). On note que le cas index présentait dès l'enfance des myotonies modérées non-douloureuses ayant évoluées à l'âge adulte vers un phénotype de myotonies sévères soutenues douloureuses exacerbées au froid impliquant autant la musculature des membres que celle du visage, alors que sa grand-mère avait présenté un phénotype de myotonies sommes toutes légères jusqu'à l'âge de 65 ans puis développa des myotonies plus soutenues et une faiblesse proximale. De même, un large pedigree finlandais connu pour la mutation A1156T incluait une jeune adulte ayant présenté depuis l'enfance des épisodes de faiblesse post exercice puis ayant développé des myotonies de préhension durant sa grossesse qui fut compliquée d'un épisode de paralysie post-partum. Son père présentait des épisodes de faiblesse post exercice et au froid accompagnés de myotonies électrophysiologiques, alors que plusieurs oncles

paternels présentaient un phénotype de myotonies légères occasionnellement aggravées au froid (McClatchey et al., 1992).

La variabilité phénotypique retrouvée dans les myotonies congénitales associées au gène *CLCN1* et au gène *SCN4A* demeure un phénomène inexplicé. Il est fort probable que des polymorphismes dans ces gènes, dans leurs promoteurs ou au niveau d'autres gènes impliqués dans l'expression ou la fonction des gènes *CLCN1* et *SCN4A* ou dans l'homéostasie d'autres ions impliqués dans l'excitabilité membranaire (K, Ca) contribuent à ce phénomène. Ainsi, notre étude nous a ainsi permis de mettre en évidence une trentaine de polymorphismes dans les régions introniques du gène *CLCN1* ainsi qu'une dizaine dans les portions séquencées du gène *SCN4A*. Bien qu'aucun de ces polymorphismes n'aie semblé être lié à l'expression phénotypique chez nos patients, leur abondance nous porte à croire que d'autres polymorphismes situés ailleurs dans les portions non séquencées de la séquence génomique de ces gènes puissent affecter l'expression phénotypique. Par ailleurs, il est possible qu'une variabilité au niveau de l'expression allélique puisse contribuer au phénotype clinique. Ainsi, Duno et al (Duno et al., 2004) ont démontré qu'une variabilité de l'expression allélique, reflétée par la quantification de l'ARNm pour l'allèle muté R894X (gène *CLCN1*) dans les biopsies musculaires de patients souffrant de mytonie congénitale, était corrélée avec la sévérité de la symptomatologie clinique. Enfin, des facteurs environnementaux incluant des altérations transitoires de la kaliémie, de l'homéostasie thyroïdienne, ou la prise de médicaments peuvent dans certains cas contribuer à la variabilité du tableau clinique.

Par ailleurs, notons qu'une grande hétérogénéité phénotypique a également été décrite dans certaines autres conditions associées à des mutations de canaux sodés et que les facteurs sous-tendant cette hétérogénéité demeurent également incertains. Ainsi, des mutations du canal sodé cérébral Nav1.1 (gène *SCN1A*) ont été décrites chez des patients souffrant d'épilepsie myoclonique sévère infantile (Dravet), d'épilepsie myoclonique de Doose, d'épilepsie généralisée avec convulsions fébriles plus (GEFS), d'épilepsie généralisée cryptogène, d'encéphalopathie isolée et de convulsions fébriles simples (Harkin et al., 2007; Scheffer et al., 2009).

## V-2) Caractéristiques distinctives des mutations *SCN4A*

Historiquement, plusieurs patients avec myotonies fluctuantes légères à modérées et certains patients avec symptômes dits atypiques (aggravation au froid et myotonies douloureuses) furent inclus dans les cohortes de myotonie congénitale de Thomsen. Ce n'est qu'avec la venue des tests moléculaires que l'on découvrit des mutations du gène *SCN4A* chez ces patients. Il existe donc une zone grise dans la symptomatologie clinique ne permettant pas toujours de différencier les conditions liées au gène *CLCN1* de celles liées au gène *SCN4A*, surtout lorsque les myotonies sont relativement isolées et dominant le tableau clinique. Une telle différenciation serait toutefois souhaitable puisque les deux groupes de myotonies ne répondent pas de façon similaire aux traitements anti-myotoniques. Ainsi, bien que les myotonies liées au canal chlore ClC-1 répondent parfois à la carbamazépine ou à la phénytoïne, celles liées au canal sodé Nav1.4 répondent généralement mieux à la mexilétine. De plus, la détermination de critères cliniques diagnostiques favorisant la discrimination entre ces deux gènes permettrait de limiter les coûts diagnostiques en favorisant une approche étagée des tests moléculaires.

Il n'existe pour l'instant aucun critère clinique validé permettant de différencier les myotonies dues aux mutations du gène *CLCN1* de celles liées au gène *SCN4A*. Toutefois, à la lumière de notre étude, nous croyons que certains symptômes, lorsque présents chez au moins un atteint d'une famille donnée, devraient orienter les tests moléculaires vers l'étude du gène *SCN4A*. Ainsi, la prédominance de myotonies aggravées au froid, de myotonies douloureuses, d'épisodes de paralysie ou de faiblesse marquée, d'œdème musculaire localisé ou d'aggravation des symptômes suivant l'ingestion de repas riches en potassium devraient inciter le clinicien à exclure en premier lieu une mutation du gène *SCN4A*. Bien que ces symptômes pris isolément ne permettent pas d'exclure catégoriquement une mutation du canal chlore, ils pointent en ce sens lorsqu'ils constituent une part prédominante du tableau clinique et qu'ils surviennent en combinaison. Ainsi, dans notre cohorte de patients avec mutation du gène *SCN4A* (M1476I), une aggravation des myotonies au froid était notée chez 41% des patients, et la présence de myotonies

douloureuses chez 18%. De plus, un patient a présenté un œdème musculaire localisé post-myotonie prolongée et un autre a développé des épisodes de paralysie transitoire post prandiale. Ceci est en accord avec les descriptions cliniques d'autres mutations *SCN4A* connues tel que détaillé ci-bas.

En effet, une aggravation des myotonies au froid sans autres critères de PMC (soit l'absence d'épisodes de faiblesse, la présence d'un phénomène de warm-up et l'épargne relative des muscles oropharyngés) a été décrite dans plusieurs mutations associées aux phénotypes PAM/SCM incluant V445M (Takahashi and Cannon, 2001; Trip et al., 2007), A1481D (Schoser et al., 2007), G1306E (Colding-Jorgensen et al., 2006), V1589M (Heine et al., 1993; Orrell et al., 1998; Ferriby et al., 2006) et S804F (Fournier et al., 2006). On ne peut préciser l'incidence exacte d'une telle aggravation au froid dans les mutations PAM/SCM vu le nombre restreint de patients rapportés, mais ce symptôme fut noté chez 75% à 94% des patients de certaines cohortes incluant 3 patients sur 4 atteints de la mutation V1589M (Ferriby et al., 2006), 5 patients sur 6 atteints de la mutation S804P (McClatchey et al., 1992) et 16 patients sur 17 des patients porteurs de la mutations A1481D (Schoser et al., 2007). De plus, une telle aggravation symptomatique au froid est également prédominante dans la majorité des mutations rapportées dans un contexte de PMC. Nous reviendrons plus loin sur les corollaires physiologiques sous-tendant cet effet du froid. Notons toutefois que cet élément pris isolément ne permet pas d'exclure une mutation du canal chlore ClC-1 puisque certaines mutations chez des patients présentant par ailleurs un phénotype de myotonie congénitale classique mais rapportant une aggravation des myotonies au froid ont également été décrites incluant P480L (Colding-Jorgensen et al., 2003), R894X (Colding-Jorgensen et al., 2003), M128V (Colding-Jorgensen et al., 2003), F167L (Fialho et al., 2007), F297S (Fialho et al., 2007), W303R (Fialho et al., 2007), F413C (Fialho et al., 2007), R894X (Fialho et al., 2007), C271R (Fialho et al., 2007). Par contre, dans la majorité des cas, le gène *SCN4A* n'avait pas été séquencé et une double hétérozygotie incluant une mutation dans les deux gènes *CLCN1* et *SCN4A* ne peut être exclue.

En second lieu, une prédominance de myotonies douloureuses a été rapportée pour la plupart des mutations causant un phénotype de PAM/SCM incluant : V445M

(Rosenfeld et al., 1997; Takahashi and Cannon, 2001; Trip et al., 2007), G1306 A/V/E (Colding-Jorgensen et al., 2006; Fournier et al., 2006), V1589M (Orrell et al., 1998) et A1481D (Schoser et al., 2007). Ces myotonies douloureuses surviennent chez 12 à 25% des patients rapportés soit 2 patients sur 17 porteurs de la mutation A1481D (Schoser et al., 2007) et 1 patient sur 4 porteur de la mutation V1589M (Orrell et al., 1998). De même, certaines mutations causant des phénotypes de HYPP s'accompagnent de myotonies douloureuses: I1495F (Chahine et al., 1994) et L689I (Chahine et al., 1994). Encore une fois, ceci ne permet pas d'exclure des mutations du canal chlore puisque certains patients avec myotonies classiques liées au canal chlore rapportent également une certaine douleur au décours des myotonies (Fialho et al., 2007). Toutefois, tel qu'illustré dans notre étude, l'ampleur de cet inconfort chez les patients porteurs de mutations *CLCN1* semble moindre que celle rapportée pour les mutations *SCN4A*.

Par ailleurs, la fluctuation des symptômes durant les grossesses (*CLCN1* : F167L (Fialho et al., 2007), A313V (Fialho et al., 2007)) ou la présence de réactions anesthésiques graves à l'administration d'agents dépolarisants (*CLCN1* : IVS1+35 (Farbu et al., 2003), *SCN4A* : A1481D (Schoser et al., 2007), G1306A (Vita et al., 1995)) tels que retrouvés dans notre cohorte ont été rapportées tant dans les myotonies associées au gène *CLCN1* qu'à celles liées au gène *SCN4A* et ces critères ne permettent donc pas d'orienter le diagnostic moléculaire. Ceci n'est pas surprenant puisque tout médicament augmentant l'excitabilité membranaire aggravera les symptômes myotoniques peut importe l'étiologie sous-jacente.

De même, l'évolution vers un phénotype dystrophique avec faiblesse proximale persistante tel que rapportée chez deux de nos patients avec mutation du canal sodé ne semble pas spécifique aux mutations de ce gène. Ainsi, une évolution vers un phénotype dystrophique fut observée initialement chez 25 à 33% des patients avec myotonies congénitales classiques souffrant de formes récessives sévères (Nagamitsu et al., 2000; Colding-Jorgensen, 2005). Une évolution semblable a également été rapportée chez un patient avec PAM/SCM porteur de la mutation A1481D (Schoser et al., 2007) dans le gène *SCN4A* ainsi que pour d'autres mutations

de ce gène (Cannon, 1996a) tel que nous le détaillons plus loin (Discussion, section V-5, P57).

Enfin, certains critères électrophysiologiques semblent pouvoir appuyer la différenciation clinique entre les mutations associées au canal chlore de celles associées au canal sodé. En particulier, une réponse décrémente importante des potentiels d'action moteurs à l'EMG suivant des efforts répétés se retrouve chez les patients atteints de formes récessives de Becker mais est minime ou absente chez les patients avec mutations du canal sodé (Deymeer et al., 1998; Colding-Jorgensen et al., 2003; Fournier et al., 2004; Dupre et al., 2009). Une analyse électromyographique après exposition au froid peut également aider à faire cette distinction (Fournier et al., 2006).

### V-3) Implications physiopathologiques des mutations *CLCN1* et *SCN4A*

Plusieurs groupes se sont penchés sur l'étude des causes physiopathologiques expliquant les divers symptômes observés dans les syndromes de myotonies congénitales héréditaires associées au canal chlore et des conditions alléliques associées aux mutations du canal sodés incluant les SCM, PMC et HYPP. En effet, différentes altérations fonctionnelles semblent sous-tendre les myotonies, la faiblesse intermittente et les épisodes de paralysies. Bien qu'une corrélation génotype-phénotype ne puisse pas toujours être clairement établie, certains principes fondamentaux semblent être respectés. Ainsi, alors que l'apparition de myotonies reflète une hyperexcitabilité membranaire, les épisodes de faiblesse ou de paralysie représentent un état d'inexcitabilité membranaire. Afin de mieux comprendre ces phénomènes et leurs corrélations physiologiques et fonctionnelles, il est indiqué de revoir d'abord les principes fondamentaux sous-tendant l'excitabilité membranaire menant aux contractions musculaires volontaires, ainsi que certaines notions quant à la structure des canaux ioniques voltage-dépendants au chlore et au sodium.

#### V-3.1) Contractions musculaires volontaires et homéostasie ionique sarcoplasmique

Revoyons d'abord la séquence d'événements permettant à un influx nerveux afférent de causer une contraction musculaire volontaire. En premier lieu, le stimulus

afférent provenant de l'aire motrice primaire via un motoneurone central est transmis synaptiquement au motoneurone périphérique au niveau de la corne ventrale de la moelle épinière. Le signal est par la suite véhiculé sous forme de potentiel d'action le long du motoneurone secondaire et est transmis à la membrane sarcoplasmique par le biais d'une relâche d'acétylcholine du bouton pré-synaptique dans la fente synaptique de la jonction neuromusculaire. L'acétylcholine se lie à son récepteur ligand-dépendant pentamérique sur la membrane musculaire, ce qui génère un potentiel de plaque habituellement suffisamment large pour dépolariser la membrane post-synaptique. Le potentiel d'action sarcolemmal se propage alors tout au long de la fibre musculaire, ainsi que dans le système des tubules transverses qui sillonne la fibre. La phase ascendante du potentiel d'action est médiée par l'ouverture des canaux sodés voltage-dépendants  $Na_v1.4$  (gène *SCN4A*). Ceux-ci produisent alors un large courant entrant de sodium ce qui accentue la dépolarisation membranaire et l'ouverture d'autres canaux sodés voltage-dépendants par effet d'entraînement positif. La phase ascendante du potentiel d'action est rapidement interrompue par l'inactivation spontanée des canaux sodés due à un changement de conformation dit d'inactivation rapide. De plus, la dépolarisation causée par l'ouverture initiale des canaux sodés provoque l'ouverture retardée des canaux potassiques voltage-dépendants (rectification tardive). Ceux-ci génèrent un courant sortant de potassium afin de rééquilibrer le potentiel membranaire. Enfin, les canaux chlore *ClC-1* ayant une forte conductance aux voltages hyperpolarisés, contribuent à repolariser et à stabiliser le potentiel membranaire. Pendant ce temps, le potentiel d'action se propage aux régions spécialisées du système des tubules transverses et provoque l'ouverture de canaux calciques voltages-dépendants  $Ca_v1.1$  (dihydropyridine). Cette entrée de calcium provoque l'ouverture de canaux calciques à ryanodine du réticulum sarcoplasmique, provoquant une libération massive de calcium intracellulaire. Ce calcium est ensuite utilisé par l'appareil contractile de la fibre musculaire en favorisant l'interaction des filaments d'actine avec les molécules de myosine (Engel and Franzini-Armstrong, 2004; Jurkat-Rott and Lehmann-Horn, 2005).

Le canal chlore CIC-1 a donc pour fonction de stabiliser le potentiel membranaire et de réguler l'excitabilité membranaire. En effet, au repos, le potentiel membranaire sarcoplasmique se maintient autour de -95 mV (Cannon, 2000) grâce aux conductances combinées de divers canaux ioniques voltage-dépendants. Le canal chlore voltage-dépendant CIC-1 est responsable de 70-85% de cette conductance au repos (Bryant and Morales-Aguilera, 1971; Barchi, 1998; Colding-Jorgensen, 2005). Il permet de stabiliser le potentiel membranaire et d'éviter des contractions musculaires non désirées. Une altération de cette conductance au chlore déstabilise le potentiel membranaire au repos et rend la membrane sarcoplasmique plus excitable. Il est postulé que les myotonies surviennent à l'effort puisqu'une certaine quantité de potassium s'accumule dans les canaux tubulaires T lors de contractions soutenues et que cette hyperkaliémie localisée est suffisante pour dépolariser la membrane et la mener à des décharges répétées lorsque le courant chlore n'est pas suffisant pour maintenir le potentiel membranaire après repolarisation (Barchi, 1998; Colding-Jorgensen, 2005)

### V-3.2) Physiopathologie des mutations du canal chlore CIC-1

Le canal chlore CIC-1 fait partie de la grande famille des canaux chlore voltage-dépendants comprenant plus de 9 canaux décrits tant chez les bactéries, les levures, les végétaux, les animaux que les humains (Jentsch et al., 1999). Le canal chlore CIC-1 est presque exclusivement exprimé dans les muscles squelettiques, bien que de faibles niveaux de transcription aient été détectés au niveau du cœur, des reins et des muscles lisses (Steinmeyer et al., 1991a). Il se compose d'une série de segments trans-membranaires ainsi que de deux segments CBS essentiels pour la localisation membranaire du canal (Schwappach et al., 1998). La structure tridimensionnelle des canaux chlore a été progressivement élucidée et l'on sait maintenant qu'il s'agit d'hétérodimères (Miller and White, 1984; Middleton et al., 1996)). Chacun des deux pores agit indépendamment de l'autre, et comporte ses propres caractéristiques physiologiques (conductance, sélectivité, cinétiques d'inactivation) (Middleton et al., 1996). Ainsi, chaque sous-unité possède sa propre boucle d'inactivation rapide, et une structure supplémentaire permet une inactivation conjointe et lente des deux pores (Jentsch et al., 1999).

Plus de 80 mutations ont été impliquées dans la pathogénèse des myotonies congénitales classiques et se retrouvent sur toute la longueur du gène (Colding-Jorgensen, 2005; Fialho et al., 2007). La majorité des mutations *CLCN1* récessives sont des mutations non-sens ou des codons stop menant à la production d'une protéine tronquée ou à l'instabilité de l'ARNm avec absence de la protéine. Par ailleurs, la majorité des mutations ponctuelles rapportées sont des mutations faux-sens (Colding-Jorgensen, 2005). Dans la plupart des cas, ces mutations modifient la courbe d'activation vers des potentiels plus dépolarisés (Cannon, 1996b; Barchi, 1998; Kubisch et al., 1998; Colding-Jorgensen, 2005). Le canal n'est donc pas actif au potentiel de repos hyperpolarisé et n'apparaît que lorsque la membrane est déjà dépolarisée et près du seuil d'excitabilité. À l'effort, les muscles atteints n'ont donc pas la possibilité de compenser les dépolarisations membranaires spontanées et on observe alors le déclenchement de salves de potentiels d'action autonomes donnant lieu aux décharges myotoniques à l'EMG. Lorsque la décharge myotonique est forte et prolongée, on atteint un seuil où tous les canaux sodés voltage-dépendants s'inactivent, ce qui provoque des épisodes de faiblesse transitoire. Enfin, d'autres mutations plus rares altèrent la conductance au chlore ou la sélectivité ionique et permettent ainsi le passage de cations causant un courant sodique excitateur aberrant. Ceci survient par exemple dans le cas de la mutation G230E qui introduit un acide aminé chargé négativement au sein du site de sélectivité ionique du pore attirant ainsi les cation au détriment des anions (Fahlke et al., 1997).

Le canal chlore membranaire étant un hétérodimère, les deux allèles doivent être altérés afin d'abaisser la conductance au chlore suffisamment (< 25% de la normale) pour provoquer les décharges répétées menant aux myotonies (Barchi, 1998; Colding-Jorgensen, 2005). En effet, des modélisations mathématiques ont permis d'estimer qu'une baisse de la perméabilité au chlore à 20% de la normale serait suffisante pour causer des décharges myotoniques après une stimulation isolée (Barchi, 1975). Des estimations *in vivo* sur des muscles intercostaux humains ont de plus démontré qu'une diminution de la conductance à 40% de la normale ne faisait que provoquer une discrète prolongation de la relaxation musculaire alors qu'une diminution à 18% de la normale provoque des décharges myotoniques claires

(Kwiecinski et al., 1988). C'est pour cette raison que les porteurs hétérozygotes d'une mutation récessive provoquant une baisse de la conductance au chlore de 50% demeurent asymptomatiques. Par ailleurs, certaines mutations semblent avoir un effet de dominance négative et altérer la fonction de la moitié intacte du canal entre autre en altérant le mécanisme d'inactivation lente commune aux deux pores (Saviane et al., 1999).

### V-3.3) Physiopathologie des mutations du canal sodé Nav 1.4

Les myotonies atypiques aggravées par le potassium (PAM / SCM) sont quant à elles causées par des anomalies du canal sodé voltage-dépendant Nav1.4 (gène *SCN4A*). Ce canal est un hétérodimère composé d'une sous-unité alpha (pore ionique) de 260 kDa formant le pore du canal et codé par le gène *SCN4A* et d'une de 4 sous-unités beta ( $\beta$  1-4) modifiant les propriétés cinétiques du canal (Trimmer et al., 1989; Candenias et al., 2006). La sous-unité alpha est exprimée fortement au niveau des muscles, de la thyroïde et des gonades, et faiblement dans les autres organes d'où l'absence de manifestations extra musculaires significatives des mutations du gène *SCN4A* (Trimmer et al., 1989).

La sous-unité alpha du canal sodé contient quatre domaines homologues, chacun composé de six segments transmembranaires (Figure 2, p 24). Le segment 4 de chaque domaine comporte plusieurs résidus arginine et lysine lui conférant une sensibilité au voltage membranaire. Lorsque la membrane est dépolarisée par un potentiel d'action, les segments 4 se déplacent en spirale vers le milieu extracellulaire ce qui modifie la configuration tridimensionnelle du canal et permet l'ouverture du pore. Les segments 5 et 6 des quatre domaines constituent les parois du pore. L'anse liant les segments S5 et S6 de chaque domaine constitue la boucle P qui s'insère dans l'ouverture du pore afin d'en réguler la perméabilité et la sélectivité ionique. L'anse reliant les domaines III et IV constitue la particule d'inactivation rapide (nommée IFM pour sa composition d'acides aminés : isoleucine, phénylalanine, méthionine) (Patton et al., 1992; Lerche et al., 1993; Hayward et al., 1996). Cette particule s'ancre au niveau d'un site d'accueil formé par les portions intracellulaires des segments 4 et 5 et de la boucle S4-5 du domaine IV. Ainsi, le

senseur de voltage du domaine IV (IV/S4) se déplace lors d'une dépolarisation membranaire et ceci permet d'exposer le site d'accueil (IV/S4-5) de la boucle d'inactivation (IFM : boucle III-IV) et permet de coupler l'activation du canal à son inactivation rapide (Chahine et al., 1994). Les portions cytoplasmiques des segments S6 des quatre domaines semblent aussi participer à ce phénomène d'inactivation rapide.

Les canaux sodés voltage-dépendants alternent entre trois états physiologiques : ouverts, inactivés et fermés. Ainsi, les canaux s'ouvrent lorsque la membrane cytoplasmique est dépolarisée, permettant une entrée massive de sodium et signant la phase de dépolarisation rapide du potentiel d'action. Cette ouverture rapide est suivie d'une inactivation rapide qui limite la durée du potentiel d'action et crée une période réfractaire durant laquelle la membrane ne peut être dépolarisée à nouveau. Simultanément, la dépolarisation membranaire provoque l'ouverture plus lente de canaux potassiques voltage-dépendants qui permettent une repolarisation graduelle de la membrane cytoplasmique. Lorsque celle-ci atteint une hyperpolarisation suffisante, les canaux sodés adoptent l'état fermé et peuvent à nouveau être ouverts lors de l'arrivée d'une seconde dépolarisation membranaire. Au niveau moléculaire, ces modifications d'états sont provoquées par des changements morphologiques au sein de l'unité alpha des canaux ioniques. Ainsi, la dépolarisation membranaire entraîne un mouvement transmembranaire du segment S4 chargé positivement et le déplacement des segments transmembranaires adjacents dégage le pore ionique et permet le passage des ions sodés. Cette configuration activée expose un site accepteur pour la boucle d'inactivation rapide au niveau des portions cytoplasmiques des segments S5-S6. Outre l'inactivation rapide qui se développe en quelques millisecondes après la dépolarisation membranaire initiale, un mécanisme d'inactivation lente a lieu après quelques minutes d'activation et altère la disponibilité des canaux sodés.

La présence de myotonies chez les patients ayant des mutations dominantes du gène *SCN4A* est attribuée à une altération des mécanismes de transition entre activation, inactivation et fermeture du canal sodé menant à une hyperexcitabilité membranaire en provoquant des courant sodés récurrents aberrants. Alors que la

membrane musculaire normale se repolarise et redevient silencieuse à la fin d'un stimulus, la présence de courants sodés aberrants cause une hyperexcitabilité membranaire et provoque des excitations récurrentes suite à certains stimuli plus soutenus. La majorité des mutations retrouvées dans les cas de PAM/SCM et de PMC altèrent les mécanismes d'inactivation rapide (Lerche et al., 1993; Chahine et al., 1994; Mitrovic et al., 1994; Yang et al., 1994; Cannon, 1996a; Hayward et al., 1996; Bendahhou et al., 1999a; Groome et al., 2005; Colding-Jorgensen et al., 2006; Groome et al., 2007). Elles le font en combinant différentes anomalies incluant un ralentissement du début de l'inactivation rapide et une récupération accélérée de l'inactivation rapide. De plus, elles causent souvent un ralentissement du processus de désactivation (défini comme le passage de l'état ouvert à fermé lors d'une repolarisation rapide de la membrane ne nécessitant pas d'inactivation) menant à la persistance d'un courant sodique aberrant aux potentiels hyperpolarisés (courant de queue). Enfin, bien que certaines mutations déplacent le seuil d'inactivation vers les potentiels plus dépolarisés, la plupart modifient globalement la dépendance au voltage du processus d'inactivation et découplent l'activation de l'inactivation (Chahine et al., 1994).

L'ensemble de ces phénomènes se conçoit aisément puisque la majorité des mutations décrites se retrouvent au niveau des régions du canal impliquées dans l'inactivation rapide (boucle DIII-DIV, DIV/S4-5, surfaces cytoplasmiques des segments 5 et 6). Ces phénomènes sont bien illustrés dans l'évaluation *in vitro* des mutations impliquant la glycine en position 1306 dans la boucle d'inactivation rapide (G1306 A/V/E) causant soit un phénotype de PAM/SCM (Groome et al., 2005) soit une PMC (McClatchey et al., 1992; Ptacek et al., 1994; Colding-Jorgensen et al., 2006). Situées en position stratégique, toutes trois modifient de façon considérable l'inactivation rapide en retardant l'initiation de l'inactivation, ce qui mène à des réouvertures tardives fréquentes des canaux sodés tel que notées à l'enregistrement unitaire (Lerche et al., 1993; Mitrovic et al., 1995; Groome et al., 2007). Elles retardent également le phénomène de désactivation rendant la membrane plus excitable après repolarisation rapide (Mitrovic et al., 1995). Des anomalies similaires ont été observées à l'étude d'autres mutations causant des myotonies isolées

(PAM/SCM). Ainsi, la mutation S804F située dans le segment 6 du domaine II, causant des myotonies aggravées au froid mais sans faiblesse (McClatchey et al., 1992; Fournier et al., 2006) ralentit l'inactivation rapide de deux fois et entraîne la persistance d'un courant sodique excédentaire (Green et al., 1998). De même, la mutation V1589M causant un phénotype de myotonies douloureuses exacerbées au froid, parfois isolées (PAM/SCM) (Heine et al., 1993; Orrell et al., 1998) mais parfois accompagnées de faiblesse (PMC) (Ferriby et al., 2006), génère une instabilité de l'inactivation rapide en déplaçant l'inactivation vers les potentiels plus dépolarisés et en accélérant la récupération post-inactivation, se traduisant par des ouvertures tardives groupées en enregistrements unitaires (Mitrovic et al., 1994). Notons enfin que l'altération de l'inactivation rapide est suffisante pour expliquer les phénomènes de myotonie. En effet, l'application sur des fibres musculaires de la toxine ATX inhibant l'inactivation rapide de façon spécifique provoque des décharges myotoniques soutenues (Cannon and Corey, 1993). En prenant compte des éléments ci-haut, la nouvelle mutation M1476I que nous rapportons se trouve donc en position privilégiée pour affecter les paramètres cinétiques de l'inactivation rapide puisqu'elle est localisée au niveau de la boucle S4-5 du domaine IV au sein du site accepteur de la boucle d'inactivation rapide.

Outre la localisation des mutations pathogènes, la nature de la substitution impliquée influe également sur les phénotypes observés tant aux niveaux cliniques que physiologiques. Ceci est particulièrement bien illustré dans les mutations de la glycine en position 1306. Ainsi, alors que la substitution G1306A est relativement bénigne cliniquement, se manifestant par l'apparition de myotonies peu fréquentes légères à modérées (myotonia fluctuans), les substitutions G1306V et G1306E sont nettement plus sévères, la dernière étant la plus sévère des trois (McClatchey et al., 1992; Lerche et al., 1993; Colding-Jorgensen et al., 2006). En effet, la substitution G1306E est associée à un phénotype de myotonies sévères douloureuses quasi continues à L'EMG (myotonia permanens, PMC) (Spaans et al., 1990; Colding-Jorgensen et al., 2006). Cette substitution par un acide aminé volumineux et chargé négativement majore les effets cinétiques sur l'inactivation rapide notés chez les autres substitutions. De plus, contrairement aux autres mutations de ce site, G1306E

modifie le potentiel d'activation vers les potentiels hyperpolarisés favorisant l'ouverture du canal plus près du potentiel de repos membranaire augmentant d'autant l'excitabilité membranaire et expliquant la sévérité phénotypique (Lehmann-Horn et al., 1987; Mitrovic et al., 1995). Un impact similaire de la nature de la substitution sur la sévérité du phénotype observé a été longuement étudié pour les mutations de l'arginine en position 1448 au niveau du segment 4 (S4/ DIV) causant des paramyotonies congénitales (A1448 H/C/P). Ainsi, le phénotype est classé en ordre croissant de sévérité pour les mutations A1448 H, C, P. Au niveau physiologique, les 3 mutations retardent l'initiation de l'inactivation rapide, accélèrent la récupération post inactivation et altèrent la dépendance de l'inactivation au voltage membranaire, causant des réouvertures tardives des canaux sodés (Chahine et al., 1994; Yang et al., 1994; Fan et al., 1996; Borg et al., 1997; Featherstone et al., 1998; Bendahhou et al., 1999a; Mitrovic et al., 1999). Toutefois, la mutation R1448P cause un ralentissement plus important de l'inactivation rapide se traduisant par une symptomatologie plus sévère (Mitrovic et al., 1999). Dans le cas de la nouvelle mutation que nous rapportons, M1476I, la substitution remplace la méthionine par l'isoleucine. Ces deux acides aminés sont non polaires et neutres, par contre l'isoleucine porte un index d'hydropathie significativement plus élevé (4.5 vs 1.9) (Kyte and Doolittle, 1982) ce qui pourrait modifier le comportement de cette région dans le milieu cytoplasmique.

Bien que la position de la mutation retrouvée ainsi que la nature de la substitution aide à expliquer l'impact sur l'inactivation rapide et le phénotype observé, les anomalies électrophysiologiques retrouvées ne permettent pas toujours d'expliquer entièrement la sévérité clinique. De plus, certaines mutations donnent lieu à des combinaisons de symptômes qui rappellent à la fois les phénotypes de myotonies isolées (SCM) et ceux des paramyotonies (PMC). En effet, bien que les paramyotonies soient définies comme étant des myotonies aggravées à l'effort et au froid et suivies d'épisodes de faiblesse, alors que les myotonies ne sont pas suivies de faiblesse et s'améliorent à l'effort (Cannon, 1996a, 1997, 2000), certains patients présentent des myotonies allégées à l'effort (warm-up), mais aggravées au froid tel que rapporté dans notre cohorte. Pour cette raison, il n'est pas certain qu'il faille

considérer ces conditions comme étant mutuellement exclusives et leur classification en tant que continuum est possiblement plus adéquate. En effet, des mutations au même site entraînant des substitutions par des acides aminés différents se manifestent tantôt comme PAM, tantôt comme PMC (G1306 A/V/E (McClatchey et al., 1992; Lerche et al., 1993; Mitrovic et al., 1995; Papponen et al., 1999; Colding-Jorgensen et al., 2006)) et des mutations identiques chez des patients différents peuvent se manifester soit comme PMC soit comme PAM (V1589M (Heine et al., 1993; Orrell et al., 1998; Ferriby et al., 2006)). Ces différences peuvent être partiellement attribuées aux différences de background génétique d'un patient à l'autre. Ainsi, la présence de polymorphismes ailleurs dans le gène ou dans d'autres gènes impliqués dans l'homéostasie ionique musculaire peut modifier la sévérité du phénotype observé. De plus, il est possible qu'il y ait un biais de l'expression allélique en faveur de l'allèle intact chez certains patients. En effet, en comparant les paramètres cinétiques de l'inactivation rapide de spécimens musculaires de patients porteurs de mutations R1448C/P et de biopsies contrôles, en parallèle avec les anomalies retrouvées *in vitro* lors d'expression dans les lignées cellulaires HEK, il a été estimé que les canaux mutants ne correspondaient qu'à 38% des canaux totaux (au lieu de 50%) et que ceci était proportionnel à la sévérité du phénotype observé (Mitrovic et al., 1999).

Par ailleurs, le mécanisme physiologique sous-tendant l'aggravation des myotonies au froid n'est pas entièrement élucidé. Les transitions d'états et la cinétique de l'inactivation rapide est grandement dépendante de la température *in vitro*. On estime que les taux d'inactivation peuvent varier de 3 à 4 fois par tranche de 10 degrés Celsius (Cannon, 2000). Toutefois, l'analyse de plusieurs mutations *in vitro* n'a pas permis de démontrer de tels effets lors du refroidissement bien que les patients s'en plaignent cliniquement (Chahine et al., 1994; Yang et al., 1994; Hayward et al., 1996; Cannon, 2000). On note toutefois une certaine aggravation des troubles électromyographiques avec une dégradation des potentiels d'action moteurs au froid et parfois une aggravation des décharges myotoniques (Fournier et al., 2006). D'autres facteurs influant sur l'excitabilité membranaire *in vivo* sont donc

probablement en jeu et sont mal pris en compte par l'étude de mutations dans les lignées cellulaires *in vitro*.

De même, l'aggravation des myotonies au potassium demeure un phénomène mal expliqué. Bien qu'une augmentation du potassium extracellulaire semble agir de façon synergétique sur la génération de myotonies lors de modélisations informatiques (Hayward et al., 1996; Green et al., 1998; Cannon, 2000), des modifications physiologiques à l'exposition au potassium ne sont pas toujours apparentes *in vitro* même lorsqu'elles sont rapportées par les patients tel que démontré par l'étude de la mutation V1589M (Mitrovic et al., 1994). Par moment, les effets semblent même contradictoires dépendant de la mutation étudiée (Groome et al., 2005). Cette aggravation des myotonies lors d'ingestion d'aliments riches en potassium a donc possiblement un effet seulement indirect sur l'excitabilité membranaire *in vivo*.

#### V-4) Chevauchements phénotypiques des mutations *SCN4A* : paralysie et inactivation lente

La description initiale des divers syndromes associés aux mutations du gène *SCN4A* semblait permettre de distinguer aisément ces syndromes. Ainsi, alors que la paralysie périodique hyperkaliémique (HYPP) se caractérise par des épisodes récurrents de paralysie suivant un effort ou des repas riches en potassium, parfois accompagnées de myotonies en périodes intercritiques, la paramyotonie congénitale (PMC) se manifeste par une symptomatologie myotonique prédominante, aggravée au froid et à l'effort, accompagnée à l'occasion d'épisode de faiblesse suivant généralement une myotonie soutenue. Par opposition, les myotonies associées au canal sodé (SCM/PAM) incluent un phénomène de warm-up puisque les myotonies s'allègent lors d'efforts répétés, et ne s'accompagnent généralement pas d'épisode de paralysie ou de faiblesse soutenue. Toutefois, plusieurs descriptions ont été faites de patients présentant des phénotypes mixtes entre ces trois conditions, et il n'est pas toujours aisé de trancher quant au diagnostique final. Ceci reflète la situation de notre patient présentant un phénotype mixte entre myotonie congénitale associée au canal sodé et paralysie périodique. Puisque ce patient souffre de la mutation M1476I

également retrouvée dans dix autres familles de la région, et puisque les autres patients atteints présentent globalement un phénotype compatible avec un diagnostic de PAM/SCM, nous concluons que d'autres facteurs génétiques contribuent probablement au phénotype mixte retrouvé chez notre patient.

Les corollaires physiologiques des épisodes de paralysie accompagnant certaines mutations *SCN4A* ont été longuement étudiés. Dans les syndromes de paralysie périodique hyperkaliémique (HYPP), les épisodes de paralysie surviennent généralement après une période de repos qui suit un effort intense. Elles peuvent durer de quelques heures à quelques jours et épargnent les muscles bulbaires et respiratoires. La majorité des patients souffrant de paralysie périodique hyperkaliémique présente également des myotonies, plus ou moins symptomatiques, mais facilement retrouvées à l'EMG. La coexistence de ces deux symptômes chez des patients présentant des mutations du canal sodé Nav 1.4 a longuement intrigué les neuroscientifiques. Il apparaît maintenant clairement que cette coexistence de symptômes est due à l'altération de deux phénomènes d'inactivation distincts. Ainsi, outre le phénomène d'inactivation rapide discuté précédemment, les canaux sodés voltages-dépendants subissent une inactivation lente qui survient après quelques secondes ou minutes d'activation à des voltages dépolarisés. Les composantes structurelles associées à ce second phénomène demeurent moins bien définies à ce jour que celles associées à l'inactivation rapide. Toutefois, plusieurs sites étudiés par mutagenèse localisée semblent jouer un rôle dans l'inactivation lente. Ainsi, les segments S4 des domaines II et IV, les boucles S4-5 des domaines II et IV, les segments S5 et S6 du domaine IV ont tous été associés à l'inactivation lente (Bendahhou et al., 1999b; Alekov et al., 2001; Bendahhou et al., 2002). Plusieurs mutations associées aux HYPP causent une dysfonction de l'inactivation lente (Hayward et al., 1997) (L699I (Bendahhou et al., 2002) , T704M (Bendahhou et al., 1999b) , M1585V (Hayward et al., 1997)) entraînant la persistance d'un courant sodé excédentaire, maintenant la membrane à un potentiel dépolarisé de façon prolongée et causant une inexcitabilité membranaire puisque les canaux sodés non inactivés ne sont alors plus disponibles pour générer un potentiel d'action suite à un stimulus. Dans ces cas, le potentiel membranaire mesuré au repos se situe généralement entre

-60 et -40mV plutôt que -95mV (Cannon, 2000). Le courant sodique persistant excédentaire est observé à l'enregistrement unitaire et correspond généralement à 0,5-5% par rapport au courant sodé maximal de 0,1% chez les contrôles (Cannon, 2000), et correspond au taux de canaux sodés non inactivés après une stimulation prolongée (Mitrovic et al., 1999). La majorité des mutations causant l'HYPP associe une altération de l'inactivation lente à des anomalies de l'inactivation rapide similaires à celles rapportées dans les mutations causant des myotonies ou paramyotonies et sous-tendant l'apparition de myotonies cliniques. Toutefois, certaines mutations causent un déficit uniquement de l'inactivation lente et se manifestent alors cliniquement par la présence de paralysies périodiques sans myotonies (L689I (Bendahhou et al., 2002) et M1592V (Rojas et al., 1999). Enfin, certaines mutations causant des HYPP épargnent l'inactivation lente, mais elles s'accompagnent alors d'une hyperpolarisation significative du seuil d'activation (M1592V(Rojas et al., 1999), I1495F (Bendahhou et al., 1999b)) causant une ouverture excessive des canaux sodés et un courant sodé persistant dépolarisant rendant la membrane inexcitable. Par ailleurs, les anomalies de l'inactivation lente semblent relativement spécifiques aux mutations causant l'HYPP. Quelques mutations associées aux myotonies isolées PAM/SCM réévaluées récemment ne paraissent pas altérer l'inactivation lente (S804F (Green et al., 1998)), pas plus que plusieurs mutations causant des phénotypes de PMC (R1448S (Bendahhou et al., 1999a), F1473S (Fleischhauer et al., 1998)). Ceci suggère donc que la faiblesse occasionnelle post effort soutenu chez les patients souffrant de PMC est un phénomène distinct reposant sur des anomalies physiologiques différentes de celles menant aux épisodes de paralysie et qu'elle représentent plus vraisemblablement une inactivation membranaire de courte durée lorsqu'un nombre suffisant de canaux sodés se retrouve en état d'inactivation rapide. Différentes expériences de modélisation informatiques ont été menées afin de rendre compte de cette transition de la myotonie vers la faiblesse selon le nombre de canaux inactivés (Cannon and Corey, 1993).

Par ailleurs, quelques mutations du canal sodé ont la particularité de se présenter chez certains patients avec une prédominance de myotonies et chez

d'autres avec un tableau clair de paralysie périodique, et ce parfois au sein de la même famille (I1160V (Ptacek et al., 1994), R1448S (Plassart et al., 1996; Bendahhou et al., 1999a), I693T (Plassart-Schiess et al., 1998; Hayward et al., 1999), A1156T (McClatchey et al., 1992)) . Ceci est donc semblable à ce que nous rapportons chez notre patient ayant développé quelques épisodes de paralysies post effort et postprandiales après plusieurs années d'un tableau dominé par des myotonies aggravées au froid. De tels patients sont considérés comme souffrant d'un syndrome mixte PMC-HYPP-SCM. Il est impossible de déterminer précisément la cause d'une telle complexité phénotypique. Toutefois, il est fort probable qu'une combinaison spécifique d'anomalies physiologiques mène au même phénomène d'inexcitabilité membranaire en fonction du contexte (activité précédente, médicaments, pH sanguin, kaliémie). De plus, il est fort probable que certains polymorphismes ailleurs dans le même gène, par exemple dans certaines zones impliquées également dans l'inactivation lente, ou dans d'autres gènes responsables de l'équilibre ionique sarcoplasmiques (canaux chlore et calcique) puissent contribuer à la variabilité phénotypique entre individus. Enfin, un biais de l'expression allélique chez les patients plus atteints majorant l'expression de l'allèle muté au détriment de l'allèle normal pourrait expliquer la différence de sévérité phénotypique chez des patients porteurs d'une même mutation. Dans ce contexte, des modifications épigénétiques (méthylation, acétylation du promoteur) favorisant l'expression de l'allèle muté de façon progressive au fil des ans pourraient rendre compte de l'apparente altération phénotypique chez ce patient plus âgé.

En somme, les mutations du canal sodé Nav 1.4 se traduisent par une variabilité phénotypique qui peut être partiellement expliquée par la localisation et la nature de la substitution mutationnelle en cause. Ainsi, les mutations causant des myotonies isolées PAM/SCM altèrent de façon plus ou moins prononcée les paramètres cinétiques de l'inactivation rapide (dépendance au voltage, délai d'initiation, rapidité de récupération), s'accompagnant parfois d'un déplacement de la courbe d'activation vers des potentiels plus hyperpolarisés (augmentant la probabilité d'ouverture des canaux sodés) et sont généralement localisées dans les régions impliquées dans l'inactivation rapide ou dans son couplage à l'activation. Tel

est bien le cas de la nouvelle mutation que nous décrivons qui se situe dans la boucle S4-5 du domaine IV faisant partie du site d'accueil de la boucle d'inactivation rapide. Notons qu'une mutation très rapprochée F1473S causant des myotonies aggravées au froid et parfois accompagnées de faiblesse provoque en effet des altérations significatives de l'inactivation rapide en ralentissant l'inactivation rapide, en déplaçant le seuil d'inactivation aux potentiels plus dépolarisés (+18mV), et en accélérant la récupération de l'inactivation de cinq fois, provoquant des rafales d'ouvertures retardées des canaux sodés, ceci étant exacerbé au froid (Fleischhauer et al., 1998). De plus, des mutations *in vitro* L1482C/A ont des effets similaires sur tous ces paramètres et semblent également modifier certains paramètres de l'inactivation lente (Alekov et al., 2001). En contrepartie, les mutations causant des PMC altèrent aussi l'inactivation rapide, quoique souvent de façon plus prononcée, et s'accompagnent généralement d'altérations des phénomènes de désactivation menant à un courant persistant plus important. Le taux de canaux ultimement inactivés semble expliquer les épisodes de faiblesse notés dans les PMC. Enfin, aucune de ces conditions ne semblent altérer l'inactivation lente alors que celle-ci est significativement modifiée dans plusieurs cas d'HYPP maintenant ainsi la membrane à des voltages globalement plus dépolarisés et causant une inexcitabilité membranaire suite à des dépolarisations prolongées. Dans les cas d'HYPP n'altérant pas l'inactivation lente, la nature des défaillances de l'inactivation rapide combinées à une hyperpolarisation beaucoup plus significative de la courbe d'activation se combinent pour produire le même résultat de dépolarisations prolongées de la membrane sarcoplasmique.

#### V-5) Évolution à long terme, complications et phénomènes dystrophiques

La majorité des patients souffrant de myotonies congénitales ne nécessite pas de traitements particuliers. Les patients apprennent instinctivement à éviter les facteurs aggravants et s'accommodent plutôt bien de leurs symptômes. Dans les cas plus sévères, on obtient une réponse favorable à la mexilétine (dérivé oral de la lidocaïne) qui bloque les canaux sodés prévenant les dépolarisations répétées (Fleischhauer et al., 1998; De Bellis et al., 2006). Ce traitement semble efficace chez

50% des patients (Streib, 1987a). Toutefois, certains cas nécessitent d'autres traitements tels la quinine, les anticonvulsivants tels la phénytoïne et la carbamazépine inhibant les canaux sodés voltages-dépendants, ou un bloqueur de l'anhydrase carbonique : l'acétazolamide (efficace dans les PAM mais aggravant les myotonies liées au canal chlore).

Outre la persistance de symptômes myotoniques, certains patients présentent également un phénomène dystrophique avec faiblesse et atrophie musculaire proximale prédominante aux membres inférieurs tel que nous le décrivons chez deux de nos patients atteints de la mutation M1476I dans le gène *SCN4A*. Dans ces cas précis, la patiente IV :1 de la famille 7, diagnostiquée à 17 ans dans un contexte de rhabdomyolyse aigüe suite à un influenza, présentait une faiblesse proximale légère persistante aux membres inférieurs quatre mois après l'épisode aigu. Cette faiblesse l'incommodait pour monter les escaliers ou se relever de la position assise, mais sans causer de perte de mobilité franche. Cette faiblesse s'est améliorée considérablement durant l'année qui suivit la rédaction de l'article ci-joint et semble donc de nature transitoire plutôt que dystrophique. Par ailleurs, le patient III :1 de la famille 10 présentait depuis l'adolescence des myotonies douloureuses aggravées au froid relativement stables pendant plus de 20 ans. À 54 ans, une évaluation électromyographique faite dans le contexte d'un accident traumatique du nerf poplité a révélé des décharges myotoniques menant au diagnostic de myotonie congénitale. Le patient a par la suite présenté quelques épisodes de paralysie post-prandiale brèves puis a développé graduellement une faiblesse proximale fixe légère des membres inférieurs et supérieurs, objectivée à 62 ans, se manifestant par une difficulté discrète à la montée des escaliers. Le patient est en attente d'une biopsie musculaire.

Une évolution dite dystrophique a été bien documentée chez 25-33% des patients atteints de myotonie congénitale de Becker liée au gène *CLCN1*, avec des biopsies révélant des changements d'allure dystrophique (Crews et al., 1976; Nagamitsu et al., 2000; Colding-Jorgensen, 2005). Par ailleurs, une évolution semblable est plus rare dans les cas de myotonies congénitales associées au gène *SCN4A*. Une patiente porteuse de la mutation A1481D ayant présenté des myotonies

depuis l'adolescence a développé une faiblesse proximale progressive des membres inférieurs vers l'âge de 65 ans, ayant évolué vers une faiblesse modérée à 71 ans, lui causant des difficultés ambulatories la confinant au fauteuil roulant à 80 ans. Une biopsie du triceps brachii à 77 ans a révélé des changements myopathiques avec variabilité de la taille des fibres de type II, accompagnée de vacuoles cytoplasmiques, d'agrégats tubulaires et d'accumulation de glycogène (Schoser et al., 2007). Par ailleurs, les changements pathologiques associés aux autres conditions alléliques *SCN4A* incluant l'HYPP sont généralement non-spécifiques avec une variabilité de la taille des fibres musculaires, des vacuoles périnucléaires, des fibres centronucléaires et parfois une atrophie sélective de fibres de type 2. Certains patients présentent alors l'apparition d'une faiblesse fixe proximale après plusieurs années d'évolution (Cannon, 1996a; Bendahhou et al., 1999b; Engel and Franzini-Armstrong, 2004).

Les mécanismes qui sous-tendent une telle évolution demeurent incertains. Il est possible que des altérations épigénétiques survenant après plusieurs années d'évolution puissent contribuer à ces phénomènes. Ainsi, Wu et collègues (Wu and Olson, 2002) ont démontré un déficit en histone déacétylases de classe II (jouant un rôle dans le contrôle épigénétique de l'expression de plusieurs gènes) et une activation de p38 MAPK chez les souris ADR porteuse d'une mutation dominante du gène *CLCN1*. Cette perte des histones déacétylases relâche l'inhibition qu'elles exercent normalement sur l'activité transcriptionnelle de MEF (Myocyte-specific enhancer-binding factor), un facteur de transcription impliqué dans l'hypertrophie musculaire et la spécification des sous-types de fibres musculaires. Conséquemment, ces souris ont une altération de la distribution des sous-types de fibres musculaires avec une perte des fibres glycolytiques de types IIb au profit des fibres oxydatives, similaire à celle retrouvée chez certains patients atteints de myotonie de Becker avec phénomène dystrophique (Crews et al., 1976). Notons de plus que ces mécanismes épigénétiques sont généralement fortement activés par l'activité cellulaire via les voies calciques (MAPK, CREB etc). Il se pourrait donc que les altérations de fonctions des canaux chlore et sodique, favorisant l'excitabilité membranaire, activent les voies calciques de façon excessive, et entraînent des changements

épigénétiques relâchant l'inhibition de divers programmes génétiques (ex MEF) et provoquant ainsi des symptômes plus sévères chez certains patients.

Enfin, nous aimerions conclure cet exposé en soulignant l'importance d'un dépistage clinique, électrophysiologique et génétique dans les familles lors du diagnostic d'un nouveau cas indexe. En effet, bien que cette condition demeure relativement bénigne dans la majorité des cas, il est primordial de poser un diagnostic précoce afin de limiter les risques de complications anesthésiques chez les patients et d'autres membres atteints apparentés. Ainsi, des réactions myotoniques diffuses aux agents dépolarisants (succinylcholine) utilisés lors de l'induction d'une anesthésie générale (Iaizzo and Lehmann-Horn, 1995; Farbu et al., 2003) ont été décrites chez des patients porteurs de mutations dans le canal chlore ClC-1 (Iaizzo and Lehmann-Horn, 1995; Farbu et al., 2003) ainsi que dans le canal sodé Nav1.4 (McClatchey et al., 1992; Heine et al., 1993; Vita et al., 1995; Schoser et al., 2007). Ces réactions se manifestent sous forme de trismus, de rigidité thoracique et de difficultés ventilatoires répondant habituellement au dantrolène et au réchauffement ambiant. L'activité musculaire soutenue peut parfois induire une légère hausse de la température corporelle, mais ceci ne s'accompagne pas des manifestations sévères ni de l'instabilité hémodynamique et métabolique caractéristique de l'hyperthermie maligne. Les experts s'entendent actuellement pour dire que les myotonies congénitales ne prédisposent pas à l'hyperthermie maligne, et ceci semble confirmé par des tests de contracture *in vitro* effectués sur la musculature de patients atteints (Lehmann-Horn and Iaizzo, 1990; Iaizzo and Lehmann-Horn, 1995). De plus, il s'agit de complications rares, moins de dix cas ayant été rapportés dans la littérature. Ainsi, plusieurs patients chez lesquels nous avons identifié des mutations au cours de l'étude actuelle avaient subi antérieurement des chirurgies avec anesthésie générale sans complication significative. Toutefois, puisqu'un cas de réaction sévère fatale a été décrit dans la littérature (Veyckemans, 2005), il est conseillé d'éviter les agents dépolarisants chez les patients atteints de myotonie congénitale (England, 2001). Il est également important d'éviter d'autres facteurs pouvant aggraver les myotonies incluant le froid et les altérations de la kaliémie en période per-opératoire.

## **VI) Conclusions et perspectives**

Notre étude nous a permis de recruter la plus grande cohorte de patients avec myotonie congénitale (PAM/SCM) liée au canal sodé Nav1.4 décrite à ce jour. L'étendue de cette cohorte met en évidence plusieurs points importants que nous aimerions rappeler brièvement.

En premier lieu, tout comme cela fut décrit précédemment pour les myotonies congénitales liées au canal chlore ClC-1, notre cohorte illustre une hétérogénéité phénotypique importante tant au niveau intrafamilial qu'interfamilial. Ceci reflète probablement l'effet de polymorphismes alléliques ou de polymorphismes affectant d'autres gènes modulant l'activité physiologique des canaux sodés voltage-dépendants ou l'homéostasie ionique sarcoplasmique. La possibilité d'un biais de l'expression allélique doit également être envisagée, de même que certains facteurs environnementaux incluant la kaliémie sanguine et l'équilibre thyroïdien. Par ailleurs, l'évolution vers un phénomène dystrophique après plusieurs années d'évolution chez certains patients pourrait pointer vers des effets épigénétiques dans certaines sous-populations de muscles où l'hyperexcitabilité sarcolemmale prolongée mènerait à une hyperactivité chronique de certaines voies de signalisation liées à l'activité.

En second lieu, bien qu'il y ait une grande similitude phénotypique entre les mutations des gènes *CLCN1* et *SCN4A* menant à des syndromes avec prédominance de myotonies (myotonies congénitales classiques vs PAM/SCM), certains traits phénotypiques peuvent aider à orienter le diagnostic. Puisque l'approche thérapeutique diffère selon que le patient soit porteur d'une mutation du gène *SCN4A* plutôt que du gène *CLCN1* et compte tenu des coûts liés au séquençage de ces deux gènes, nous favorisons une approche étagée et aimerions proposer certains critères cliniques orientant plutôt vers une mutation du canal sodé. Ainsi l'aggravation des symptômes au froid, une prédominance de myotonies douloureuses, un œdème localisé, ou des épisodes de paralysie périodique chez un patient ou des membres de sa famille devraient orienter vers le séquençage initial de *SCN4A* plutôt que du gène *CLCN1*. Par ailleurs, l'aggravation des symptômes lors des grossesses, les réactions myotoniques à l'anesthésie et les phénomènes dystrophiques à long terme, bien que

décrits initialement dans les cohortes de myotonies congénitales classiques se retrouvent également dans notre cohorte de patients atteints de mutations du gène *SCN4A* et ne permettent donc pas de cibler le diagnostic moléculaire.

En troisième lieu, les patients que nous rapportons ici illustrent le chevauchement phénotypique entre les myotonies congénitales et d'autres conditions associées aux mutations du gène *SCN4A* telles la paramyotonie congénitale et la paralysie périodique hyperkaliémique. L'aggravation des myotonies au froid et la présence de myotonies douloureuses ont été décrites précédemment chez d'autres patients avec myotonie congénitale associée au canal sodé Nav1.4. Ces patients présentent presque tous un phénomène de warm-up et ne présentant pas, pour la plupart, de périodes de faiblesse. Il semble donc bien s'agir de myotonies congénitales et non de PMC. Par ailleurs, nous décrivons un cas combinant une symptomatologie myotonique sévère, l'évolution vers un phénotype dystrophique, et l'apparition d'épisodes de paralysie transitoires après les repas, ressemblant à un syndrome mixte PAM-HYPP tel que décrit pour d'autres mutations du gène *SCN4A*. Bien que la base de ces chevauchements phénotypique demeure incertaine, il est possible que des polymorphismes alléliques contribuent à la présentation clinique mixte en affectant par exemple l'inactivation lente du canal ou en altérant le seuil d'activation suffisamment pour provoquer un courant entrant sodé excédentaire tel que retrouvé dans les mutations causant l'HYPP. Encore une fois, des facteurs environnementaux ou une variabilité de l'expression allélique pourrait également être mis en cause.

En quatrième lieu, nous aimerions réitérer l'importance du dépistage familial lorsqu'un patient est diagnostiqué avec un syndrome de myotonie congénitale. Ceci permet en effet de prévenir les risques anesthésiques chez les patients dépistés en modifiant l'arsenal thérapeutique utilisé pour induire l'anesthésie.

Enfin, bien que notre étude contribue aux connaissances actuelles sur ces conditions rares, plusieurs points demeurent obscurs et devront être étudiés plus à fond. Ainsi, bien que la localisation et la nature de la nouvelle mutation que nous rapportons permettent d'émettre certaines hypothèses quant aux conséquences physiologiques qu'elle entraîne, celles-ci doivent être objectivées *in vitro* pour

confirmer qu'il s'agit bien d'une mutation pathogène. De plus, l'aggravation des myotonies au froid demeure un phénomène mal compris sur le plan physiologique et ceci pourrait être approfondi en étudiant cette nouvelle mutation. Enfin, le suivi prolongé de cette cohorte permettra éventuellement de détailler les facteurs prédictifs de mauvais pronostic et la réponse thérapeutique à diverses médications incluant la mexilétine.

## VII) RÉFÉRENCES

- Alekov AK, Peter W, Mitrovic N, Lehmann-Horn F, Lerche H (2001) Two mutations in the IV/S4-S5 segment of the human skeletal muscle Na<sup>+</sup> channel disrupt fast and enhance slow inactivation. *Neurosci Lett* 306:173-176.
- Barchi RL (1975) Myotonia. An evaluation of the chloride hypothesis. *Arch Neurol* 32:175-180.
- Barchi RL (1998) Phenotype and genotype in the myotonic disorders. *Muscle Nerve* 21:1119-1121.
- Becker PE (1979) Heterozygote manifestation in recessive generalized myotonia. *Hum Genet* 46:325-329.
- Bendahhou S, Cummins TR, Kwiecinski H, Waxman SG, Ptacek LJ (1999a) Characterization of a new sodium channel mutation at arginine 1448 associated with moderate Paramyotonia congenita in humans. *J Physiol* 518 ( Pt 2):337-344.
- Bendahhou S, Cummins TR, Tawil R, Waxman SG, Ptacek LJ (1999b) Activation and inactivation of the voltage-gated sodium channel: role of segment S5 revealed by a novel hyperkalaemic periodic paralysis mutation. *J Neurosci* 19:4762-4771.
- Bendahhou S, Cummins TR, Kula RW, Fu YH, Ptacek LJ (2002) Impairment of slow inactivation as a common mechanism for periodic paralysis in DIIS4-S5. *Neurology* 58:1266-1272.
- Birt A (1908) A study of Thomsen's disease (congenita myotonia) by sufferer from it. *Montreal Med* 37:771-784.
- Borg K, Ahlberg G, Anvret M (1997) C4342T-mutation in the SCN4A gene on chromosome 17q in a Swedish family with paramyotonia congenita (Eulenburg)--correlations with clinical, neurophysiological and muscle biopsy data. *Neuromuscul Disord* 7:231-233.
- Bouhours M, Luce S, Sternberg D, Willer JC, Fontaine B, Tabti N (2005) A1152D mutation of the Na<sup>+</sup> channel causes paramyotonia congenita and emphasizes the role of DIII/S4-S5 linker in fast inactivation. *J Physiol* 565:415-427.
- Bryant SH, Morales-Aguilera A (1971) Chloride conductance in normal and myotonic muscle fibres and the action of monocarboxylic aromatic acids. *J Physiol* 219:367-383.
- Candenas L, Seda M, Noheda P, Buschmann H, Cintado CG, Martin JD, Pinto FM (2006) Molecular diversity of voltage-gated sodium channel alpha and beta subunit mRNAs in human tissues. *Eur J Pharmacol* 541:9-16.
- Cannon SC (1996a) Sodium channel defects in myotonia and periodic paralysis. *Annu Rev Neurosci* 19:141-164.
- Cannon SC (1996b) Ion-channel defects and aberrant excitability in myotonia and periodic paralysis. *Trends Neurosci* 19:3-10.
- Cannon SC (1997) From mutation to myotonia in sodium channel disorders. *Neuromuscul Disord* 7:241-249.
- Cannon SC (2000) Spectrum of sodium channel disturbances in the nondystrophic myotonias and periodic paralyses. *Kidney Int* 57:772-779.
- Cannon SC, Corey DP (1993) Loss of Na<sup>+</sup> channel inactivation by anemone toxin (ATX II) mimics the myotonic state in hyperkalaemic periodic paralysis. *J Physiol* 466:501-520.
- Chahine M, George AL, Jr., Zhou M, Ji S, Sun W, Barchi RL, Horn R (1994) Sodium channel mutations in paramyotonia congenita uncouple inactivation from activation. *Neuron* 12:281-294.
- Clark S, Luton F, Cutler J (1939) A form of congenital myotonia in goats. *J Nerv Ment Dis* 90:297-309.
- Colding-Jorgensen E (2005) Phenotypic variability in myotonia congenita. *Muscle Nerve* 32:19-34.
- Colding-Jorgensen E, Duno M, Vissing J (2006) Autosomal dominant monosymptomatic myotonia permanens. *Neurology* 67:153-155.
- Colding-Jorgensen E, Dun OM, Schwartz M, Vissing J (2003) Decrement of compound muscle action potential is related to mutation type in myotonia congenita. *Muscle Nerve* 27:449-455.
- Crews J, Kaiser KK, Brooke MH (1976) Muscle pathology of myotonia congenita. *J Neurol Sci* 28:449-457.
- De Bellis M, De Luca A, Rana F, Cavalluzzi MM, Catalano A, Lentini G, Franchini C, Tortorella V, Conte Camerino D (2006) Evaluation of the pharmacological activity of the major mexiletine metabolites on skeletal muscle sodium currents. *Br J Pharmacol* 149:300-310.

- Deymeer F, Cakirkaya S, Serdaroglu P, Schleithoff L, Lehmann-Horn F, Rudel R, Ozdemir C (1998) Transient weakness and compound muscle action potential decrement in myotonia congenita. *Muscle Nerve* 21:1334-1337.
- Deymeer F, Lehmann-Horn F, Serdaroglu P, Cakirkaya S, Benz S, Rudel R, Ozdemir C (1999) Electrical myotonia in heterozygous carriers of recessive myotonia congenita. *Muscle Nerve* 22:123-125.
- Duno M, Colding-Jorgensen E, Grunnet M, Jespersen T, Vissing J, Schwartz M (2004) Difference in allelic expression of the CLCN1 gene and the possible influence on the myotonia congenita phenotype. *Eur J Hum Genet* 12:738-743.
- Dupre N, Chrestian N, Boucharde JP, Rossignol E, Brunet D, Sternberg D, Brais B, Mathieu J, Puymirat J (2009) Clinical, electrophysiologic, and genetic study of non-dystrophic myotonia in French-Canadians. *Neuromuscul Disord* 19:330-334.
- Emery AE (1991) Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. *Neuromuscul Disord* 1:19-29.
- Engel, Franzini-Armstrong (2004) Non dystrophic myotonias and periodic paralysis. In: *Textbook of myology*, pp 1257-1300.
- England JD (2001) Mutant sodium channels, myotonia, and propofol. *Muscle Nerve* 24:713-715.
- Fahlke C, Beck CL, George AL, Jr. (1997) A mutation in autosomal dominant myotonia congenita affects pore properties of the muscle chloride channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2729-2734.
- Fan Z, George AL, Jr., Kyle JW, Makielski JC (1996) Two human paramyotonia congenita mutations have opposite effects on lidocaine block of Na<sup>+</sup> channels expressed in a mammalian cell line. *J Physiol* 496 ( Pt 1):275-286.
- Farbu E, Softeland E, Bindoff LA (2003) Anaesthetic complications associated with myotonia congenita: case study and comparison with other myotonic disorders. *Acta Anaesthesiol Scand* 47:630-634.
- Featherstone DE, Fujimoto E, Ruben PC (1998) A defect in skeletal muscle sodium channel deactivation exacerbates hyperexcitability in human paramyotonia congenita. *J Physiol* 506 ( Pt 3):627-638.
- Ferriby D, Stojkovic T, Sternberg D, Hurtevent JF, Hurtevent JP, Vermersch P (2006) A new case of autosomal dominant myotonia associated with the V1589M missense mutation in the muscle sodium channel gene and its phenotypic classification. *Neuromuscul Disord* 16:321-324.
- Fialho D, Schorge S, Pucovska U, Davies NP, Labrum R, Haworth A, Stanley E, Sud R, Wakeling W, Davis MB, Kullmann DM, Hanna MG (2007) Chloride channel myotonia: exon 8 hot-spot for dominant-negative interactions. *Brain* 130:3265-3274.
- Fleischhauer R, Mitrovic N, Deymeer F, Lehmann-Horn F, Lerche H (1998) Effects of temperature and mexiletine on the F1473S Na<sup>+</sup> channel mutation causing paramyotonia congenita. *Pflugers Arch* 436:757-765.
- Fournier E, Arzel M, Sternberg D, Vicart S, Laforet P, Eymard B, Willer JC, Tabti N, Fontaine B (2004) Electromyography guides toward subgroups of mutations in muscle channelopathies. *Ann Neurol* 56:650-661.
- Fournier E, Viala K, Gervais H, Sternberg D, Arzel-Hezode M, Laforet P, Eymard B, Tabti N, Willer JC, Vial C, Fontaine B (2006) Cold extends electromyography distinction between ion channel mutations causing myotonia. *Ann Neurol* 60:356-365.
- Green DS, George AL, Jr., Cannon SC (1998) Human sodium channel gating defects caused by missense mutations in S6 segments associated with myotonia: S804F and V1293I. *J Physiol* 510 ( Pt 3):685-694.
- Gronemeier M, Condie A, Prosser J, Steinmeyer K, Jentsch TJ, Jockusch H (1994) Nonsense and missense mutations in the muscular chloride channel gene Clc-1 of myotonic mice. *J Biol Chem* 269:5963-5967.
- Groome JR, Fujimoto E, Ruben PC (2005) K-aggravated myotonia mutations at residue G1306 differentially alter deactivation gating of human skeletal muscle sodium channels. *Cell Mol Neurobiol* 25:1075-1092.
- Groome JR, Alexander HM, Fujimoto E, Sherry M, Petty D (2007) Central charged residues in DIIS4 regulate deactivation gating in skeletal muscle sodium channels. *Cell Mol Neurobiol* 27:87-106.

- Harkin LA et al. (2007) The spectrum of SCN1A-related infantile epileptic encephalopathies. *Brain* 130:843-852.
- Hayward LJ, Brown RH, Jr., Cannon SC (1996) Inactivation defects caused by myotonia-associated mutations in the sodium channel III-IV linker. *J Gen Physiol* 107:559-576.
- Hayward LJ, Brown RH, Jr., Cannon SC (1997) Slow inactivation differs among mutant Na channels associated with myotonia and periodic paralysis. *Biophys J* 72:1204-1219.
- Hayward LJ, Sandoval GM, Cannon SC (1999) Defective slow inactivation of sodium channels contributes to familial periodic paralysis. *Neurology* 52:1447-1453.
- Heine R, Pika U, Lehmann-Horn F (1993) A novel SCN4A mutation causing myotonia aggravated by cold and potassium. *Hum Mol Genet* 2:1349-1353.
- Heller AH, Eicher EM, Hallett M, Sidman RL (1982) Myotonia, a new inherited muscle disease in mice. *J Neurosci* 2:924-933.
- Iaizzo PA, Lehmann-Horn F (1995) Anesthetic complications in muscle disorders. *Anesthesiology* 82:1093-1096.
- Jentsch TJ, Friedrich T, Schriever A, Yamada H (1999) The CLC chloride channel family. *Pflugers Arch* 437:783-795.
- Johnson J (1968) Thomsen and myotonia congenita. *Med Hist* 12:190-194.
- Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F (2005) Muscle channelopathies and critical points in functional and genetic studies. *J Clin Invest* 115:2000-2009.
- Kass RS (2005) The channelopathies: novel insights into molecular and genetic mechanisms of human disease. *J Clin Invest* 115:1986-1989.
- Koch MC, Steinmeyer K, Lorenz C, Ricker K, Wolf F, Otto M, Zoll B, Lehmann-Horn F, Grzeschik KH, Jentsch TJ (1992) The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* 257:797-800.
- Kubisch C, Schmidt-Rose T, Fontaine B, Bretag AH, Jentsch TJ (1998) CIC-1 chloride channel mutations in myotonia congenita: variable penetrance of mutations shifting the voltage dependence. *Hum Mol Genet* 7:1753-1760.
- Kullmann DM, Hanna MG (2002) Neurological disorders caused by inherited ion-channel mutations. *Lancet Neurol* 1:157-166.
- Kwiecinski H, Lehmann-Horn F, Rudel R (1988) Drug-induced myotonia in human intercostal muscle. *Muscle Nerve* 11:576-581.
- Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157:105-132.
- Lehmann-Horn F, Iaizzo PA (1990) Are myotonias and periodic paralyses associated with susceptibility to malignant hyperthermia? *Br J Anaesth* 65:692-697.
- Lehmann-Horn F, Mailander V, Heine R, George AL (1995) Myotonia levior is a chloride channel disorder. *Hum Mol Genet* 4:1397-1402.
- Lehmann-Horn F, Kuther G, Ricker K, Grafe P, Ballanyi K, Rudel R (1987) Adynamia episodica hereditaria with myotonia: a non-inactivating sodium current and the effect of extracellular pH. *Muscle Nerve* 10:363-374.
- Lerche H, Heine R, Pika U, George AL, Jr., Mitrovic N, Browatzki M, Weiss T, Rivet-Bastide M, Franke C, Lomonaco M, et al. (1993) Human sodium channel myotonia: slowed channel inactivation due to substitutions for a glycine within the III-IV linker. *J Physiol* 470:13-22.
- Lipicky RJ, Bryant SH (1966) Sodium, potassium, and chloride fluxes in intercostal muscle from normal goats and goats with hereditary myotonia. *J Gen Physiol* 50:89-111.
- Lipicky RJ, Bryant SH, Salmon JH (1971) Cable parameters, sodium, potassium, chloride, and water content, and potassium efflux in isolated external intercostal muscle of normal volunteers and patients with myotonia congenita. *J Clin Invest* 50:2091-2103.
- Lorenz C, Meyer-Kleine C, Steinmeyer K, Koch MC, Jentsch TJ (1994) Genomic organization of the human muscle chloride channel CIC-1 and analysis of novel mutations leading to Becker-type myotonia. *Hum Mol Genet* 3:941-946.
- Mailander V, Heine R, Deymeer F, Lehmann-Horn F (1996) Novel muscle chloride channel mutations and their effects on heterozygous carriers. *Am J Hum Genet* 58:317-324.
- McClatchey AI, McKenna-Yasek D, Cros D, Worthen HG, Kuncl RW, DeSilva SM, Cornblath DR, Gusella JF, Brown RH, Jr. (1992) Novel mutations in families with unusual and variable disorders of the skeletal muscle sodium channel. *Nat Genet* 2:148-152.

- Middleton RE, Pheasant DJ, Miller C (1996) Homodimeric architecture of a Cl<sup>-</sup>-type chloride ion channel. *Nature* 383:337-340.
- Miller C, White MM (1984) Dimeric structure of single chloride channels from *Torpedo* electroplax. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:2772-2775.
- Mitrovic N, George AL, Jr., Rudel R, Lehmann-Horn F, Lerche H (1999) Mutant channels contribute <50% to Na<sup>+</sup> current in paramyotonia congenita muscle. *Brain* 122 ( Pt 6):1085-1092.
- Mitrovic N, George AL, Jr., Lerche H, Wagner S, Fahlke C, Lehmann-Horn F (1995) Different effects on gating of three myotonia-causing mutations in the inactivation gate of the human muscle sodium channel. *J Physiol* 487 ( Pt 1):107-114.
- Mitrovic N, George AL, Jr., Heine R, Wagner S, Pika U, Hartlaub U, Zhou M, Lerche H, Fahlke C, Lehmann-Horn F (1994) K(+)-aggravated myotonia: destabilization of the inactivated state of the human muscle Na<sup>+</sup> channel by the V1589M mutation. *J Physiol* 478 Pt 3:395-402.
- Nagamitsu S, Matsuura T, Khajavi M, Armstrong R, Gooch C, Harati Y, Ashizawa T (2000) A "dystrophic" variant of autosomal recessive myotonia congenita caused by novel mutations in the CLCN1 gene. *Neurology* 55:1697-1703.
- Orrell RW, Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F, Lane RJ (1998) Familial cramp due to potassium-aggravated myotonia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65:569-572.
- Papponen H, Toppinen T, Baumann P, Myllyla V, Leisti J, Kuivaniemi H, Tromp G, Myllyla R (1999) Founder mutations and the high prevalence of myotonia congenita in northern Finland. *Neurology* 53:297-302.
- Patton DE, West JW, Catterall WA, Goldin AL (1992) Amino acid residues required for fast Na<sup>+</sup>-channel inactivation: charge neutralizations and deletions in the III-IV linker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10905-10909.
- Plassart E, Eymard B, Maurs L, Hauw JJ, Lyon-Caen O, Fardeau M, Fontaine B (1996) Paramyotonia congenita: genotype to phenotype correlations in two families and report of a new mutation in the sodium channel gene. *J Neurol Sci* 142:126-133.
- Plassart-Schiess E, Lhuillier L, George AL, Jr., Fontaine B, Tabti N (1998) Functional expression of the Ile693Thr Na<sup>+</sup> channel mutation associated with paramyotonia congenita in a human cell line. *J Physiol* 507 ( Pt 3):721-727.
- Ptacek LJ, Tawil R, Griggs RC, Storvick D, Leppert M (1992) Linkage of atypical myotonia congenita to a sodium channel locus. *Neurology* 42:431-433.
- Ptacek LJ, Tawil R, Griggs RC, Meola G, McManis P, Barohn RJ, Mendell JR, Harris C, Spitzer R, Santiago F, et al. (1994) Sodium channel mutations in acetazolamide-responsive myotonia congenita, paramyotonia congenita, and hyperkalemic periodic paralysis. *Neurology* 44:1500-1503.
- Richmond JE, VanDeCarr D, Featherstone DE, George AL, Jr., Ruben PC (1997) Defective fast inactivation recovery and deactivation account for sodium channel myotonia in the I1160V mutant. *Biophys J* 73:1896-1903.
- Ricker K, Moxley RT, 3rd, Heine R, Lehmann-Horn F (1994) Myotonia fluctuans. A third type of muscle sodium channel disease. *Arch Neurol* 51:1095-1102.
- Rojas CV, Neely A, Velasco-Loyden G, Palma V, Kukuljan M (1999) Hyperkalemic periodic paralysis M1592V mutation modifies activation in human skeletal muscle Na<sup>+</sup> channel. *Am J Physiol* 276:C259-266.
- Rosenfeld J, Sloan-Brown K, George AL, Jr. (1997) A novel muscle sodium channel mutation causes painful congenital myotonia. *Ann Neurol* 42:811-814.
- Saviane C, Conti F, Pusch M (1999) The muscle chloride channel ClC-1 has a double-barreled appearance that is differentially affected in dominant and recessive myotonia. *J Gen Physiol* 113:457-468.
- Scheffer IE, Zhang YH, Jansen FE, Dibbens L (2009) Dravet syndrome or genetic (generalized) epilepsy with febrile seizures plus? *Brain Dev* 31:394-400.
- Schoaser BG, Schroder JM, Grimm T, Sternberg D, Kress W (2007) A large German kindred with cold-aggravated myotonia and a heterozygous A1481D mutation in the SCN4A gene. *Muscle Nerve* 35:599-606.
- Schwappach B, Stobrawa S, Hechenberger M, Steinmeyer K, Jentsch TJ (1998) Golgi localization and functionally important domains in the NH2 and COOH terminus of the yeast ClC putative chloride channel Gef1p. *J Biol Chem* 273:15110-15118.

- Simpson BJ, Height TA, Rychkov GY, Nowak KJ, Laing NG, Hughes BP, Bretag AH (2004) Characterization of three myotonia-associated mutations of the CLCN1 chloride channel gene via heterologous expression. *Hum Mutat* 24:185.
- Spaans F, Theunissen P, Reekers AD, Smit L, Veldman H (1990) Schwartz-Jampel syndrome: I. Clinical, electromyographic, and histologic studies. *Muscle Nerve* 13:516-527.
- Steinmeyer K, Ortlund C, Jentsch TJ (1991a) Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. *Nature* 354:301-304.
- Steinmeyer K, Klocke R, Ortlund C, Gronemeier M, Jockusch H, Grunder S, Jentsch TJ (1991b) Inactivation of muscle chloride channel by transposon insertion in myotonic mice. *Nature* 354:304-308.
- Streib EW (1987a) Paramyotonia congenita: successful treatment with tocainide. Clinical and electrophysiologic findings in seven patients. *Muscle Nerve* 10:155-162.
- Streib EW (1987b) AAEE minimonograph #27: differential diagnosis of myotonic syndromes. *Muscle Nerve* 10:603-615.
- Streib EW, Sun SF (1982) EMG in detection of heterozygote carriers of recessive generalized myotonia. *Muscle Nerve* 5:179-181.
- Takahashi MP, Cannon SC (2001) Mexiletine block of disease-associated mutations in S6 segments of the human skeletal muscle Na(+) channel. *J Physiol* 537:701-714.
- Thomassen E (1948) Myotonia, Thomsen's disease. Paramyotonia, and dystrophia myotonica. *Op Ex Domo Biol Hered Hum U Hafniensis* 17:11-251.
- Trimmer JS, Cooperman SS, Tomiko SA, Zhou JY, Crean SM, Boyle MB, Kallen RG, Sheng ZH, Barchi RL, Sigworth FJ, et al. (1989) Primary structure and functional expression of a mammalian skeletal muscle sodium channel. *Neuron* 3:33-49.
- Trip J, Faber CG, Ginjaar HB, van Engelen BG, Drost G (2007) Warm-up phenomenon in myotonia associated with the V445M sodium channel mutation. *J Neurol* 254:257-258.
- Trudell RG, Kaiser KK, Griggs RC (1987) Acetazolamide-responsive myotonia congenita. *Neurology* 37:488-491.
- Veyckemans F (2005) Muscular channelopathies and hypermetabolic reactions. *Acta Anaesthesiol Scand* 49:124-125; author reply 125.
- Vita GM, Olckers A, Jedlicka AE, George AL, Heiman-Patterson T, Rosenberg H, Fletcher JE, Levitt RC (1995) Masseter muscle rigidity associated with glycine1306-to-alanine mutation in the adult muscle sodium channel alpha-subunit gene. *Anesthesiology* 82:1097-1103.
- Wagner S, Deymeer F, Kurz LL, Benz S, Schleithoff L, Lehmann-Horn F, Serdaroglu P, Ozdemir C, Rudel R (1998) The dominant chloride channel mutant G200R causing fluctuating myotonia: clinical findings, electrophysiology, and channel pathology. *Muscle Nerve* 21:1122-1128.
- Watkins WJ, Watts DC (1984) Biological features of the new A2G--adr mouse mutant with abnormal muscle function. *Lab Anim* 18:1-6.
- White G, Plaskett J (1904) "Nervous", "stiff-legged" or "fainting" goats. *Am Vet Rev* 28:556-560.
- Wu FF, Ryan A, Devaney J, Warnstedt M, Korade-Mirnic Z, Poser B, Escriva MJ, Pegoraro E, Yee AS, Felice KJ, Giuliani MJ, Mayer RF, Mongini T, Palmucci L, Marino M, Rudel R, Hoffman EP, Fahlke C (2002) Novel CLCN1 mutations with unique clinical and electrophysiological consequences. *Brain* 125:2392-2407.
- Wu H, Olson EN (2002) Activation of the MEF2 transcription factor in skeletal muscles from myotonic mice. *J Clin Invest* 109:1327-1333.
- Yang N, Ji S, Zhou M, Ptacek LJ, Barchi RL, Horn R, George AL, Jr. (1994) Sodium channel mutations in paramyotonia congenita exhibit similar biophysical phenotypes in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12785-12789.
- Zellweger H, Pavone L, Biondi A, Cimino V, Gullotta F, Hart M, Ionasescu V, Mollica F, Schieken R (1980) Autosomal recessive generalized myotonia. *Muscle Nerve* 3:176-180.
- Zuberi SM, Hanna MG (2001) Ion channels and neurology. *Arch Dis Child* 84:277-280.