



Programme national de recherche PNR 53
«Santé musculosquelettique –
douleurs chroniques»

Hyperthermie maligne: les tests génétiques remplacent les biopsies musculaires¹

Soledad Levano, Albert Urwyler, Susan Treves, Mirko Vukcevic, Thierry Girard

Departement für Anästhesie und Biomedizin, Universitätsspital Basel

Contexte

L'hyperthermie maligne (HM) est un des plus importants syndromes pharmacogénétiques survenant en anesthésie. Les personnes sujettes à ce dysfonctionnement peuvent développer un hypercatabolisme extrêmement sévère après l'administration d'un relaxant musculaire dépolarisant (succinylcholine) et/ou d'anesthésiques par inhalation tels que l'halothane, l'isoflurane, le sévoflurane ou le desflurane. Le métabolisme de ces patients se dérègle, et une libération incontrôlée de calcium a lieu dans les cellules de leur musculature squelettique. Le symptôme tardif de cette pathologie est une élévation rapide de la température. Cet épisode peut provoquer une issue fatale s'il n'est pas reconnu et traité rapidement de manière adéquate. Cliniquement, l'hyperthermie maligne se manifeste très différemment d'un cas à l'autre, c'est pourquoi il est difficile d'estimer la fréquence de son apparition. En principe, on l'évalue à un cas sur 10 000 à 30 000 anesthésies.

La prédisposition à l'hyperthermie maligne est d'origine congénitale et se transmet de façon autosomale dominante. On a pu en identifier une des causes dans certaines mutations du gène du récepteur de la ryanodine (RYR1) de la musculature squelettique. Chez environ la moitié des familles concernées, ces mutations sont responsables de la prédisposition à l'HM. Dans les autres familles, la cause moléculaire de la susceptibilité à cette pathologie demeure jusqu'ici peu claire. Les mutations du gène RYR1 provoquent également la myopathie à axe central (*central core disease* ou CCD) congénitale et caractérisée par une myasthénie à accentuation proximale et à évolution lente. Les patients atteints de myopathie à axe central sont en général également sujets à l'hyperthermie maligne.

Objectif

L'hyperthermie maligne est une myopathie subclinique. La prédisposition à l'HM ne se détecte que lorsque les patients sont mis en contact avec

les substances déclenchantes. C'est la raison pour laquelle il est nécessaire de disposer de méthodes permettant d'établir un diagnostic présymptomatique. D'autant plus qu'il existe maintenant des méthodes d'anesthésie alternatives – et sûres – pour les patients sujets à l'hyperthermie maligne.

Jusqu'ici, pour examiner la prédisposition à l'hyperthermie maligne, le standard d'or était l'évaluation de la contraction musculaire *in vitro*. Ce test exige de prélever de petits faisceaux musculaires et nécessite donc une biopsie musculaire dite à ciel ouvert. Ces tissus sont mis en présence d'halothane, resp. de caféine sous stimulation supramaximale. Le résultat de ce test est considéré comme positif à partir d'une contracture musculaire de 2 millinewton (mN). Le seul centre suisse de test accrédité par le Groupe européen de l'hyperthermie maligne (EMHG: *European Malignant Hyperthermia Group*) est exploité par le département d'anesthésie de l'Hôpital universitaire de Bâle.

L'EMHG a établi dès 2001 des directives pour le diagnostic de la prédisposition à l'hyperthermie maligne par la génétique moléculaire [1]. Seules les mutations dont l'effet fonctionnel a été démontré sont reconnues en tant que marqueurs diagnostiques. L'examen par génétique moléculaire est plus supportable pour le patient qu'une biopsie musculaire à ciel ouvert. Cependant un test génétique négatif ne permet pas d'exclure à cent pour cent la prédisposition à l'hyperthermie maligne. Dans ce cas, comme l'origine génétique de l'hyperthermie maligne est variable, il faut effectuer le test de la contraction musculaire *in vitro* afin d'exclure ou de confirmer une telle prédisposition. Par conséquent, cette étude a également cherché à identifier de nouvelles mutations du gène RYR1 qui puissent être utiles dans le diagnostic génétique de l'hyperthermie maligne.

¹ Etudes de génétique moléculaire chez des patients atteints de maladies musculaires associées au gène du récepteur de la ryanodine. Numéro de projet: 405340-104853.

Méthode et résultats de l'analyse génétique

Dans le cadre du projet de recherche PNR-53, nous avons examiné de plus près toutes les familles ayant présenté un cas d'hyperthermie maligne et chez lesquelles aucune des mutations connues jusque là du gène RYR1 n'avait été identifiée lors d'études précédentes [2]. Le gène RYR1 est très long. Il est constitué de 106 exons et de plus de 150 000 paires de bases, ce qui complique l'analyse génétique. Nous avons élaboré un protocole permettant de déterminer le plus efficacement possible l'ensemble de la séquence codante du gène RYR1. Des échantillons de biopsies musculaires ont livré le matériel servant à isoler l'ARN-m et à créer ainsi la situation de départ permettant d'amplifier toutes les parties codantes du gène RYR1 en 23 étapes, par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et de les séquencer ensuite. Parmi 36 familles présentant une prédisposition à l'hyperthermie maligne, nous avons trouvé une seule ou plusieurs mutations chez 22 familles (64%). De ces mutations, 17 étaient inconnues jusqu'ici et 5 étaient rares. Ces dernières n'avaient été identifiées que récemment par d'autres groupes de recherche (tab. 1 ). Afin de déterminer la fréquence d'apparition de certains polymorphismes génétiques, nous avons

examiné les nouvelles mutations sur 100 échantillons de contrôle anonymes. Tous les échantillons furent négatifs. Dans huit familles on a identifié une mutation connue, dans quatre on a même identifié simultanément deux de ces mutations. Contrairement à la supposition de départ, il s'est avéré que les mutations du gène RYR1 ne se cantonnent pas dans des régions déterminées du gène et qu'il n'y a donc pas de «points chauds». Nous avons encore examiné d'autres membres des familles dans lesquelles nous avons trouvé des mutations. L'analyse de 190 personnes faisant partie de 20 familles a permis de conclure que, dans 94% des cas, le test de la contraction musculaire in vitro et l'analyse génétique arrivaient au même résultat.

Méthode et résultats de l'analyse fonctionnelle

Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons cherché à déterminer si les nouvelles mutations identifiées ont aussi un effet fonctionnel. Ce genre d'investigation nécessite des cellules de sang périphérique frais prélevé chez les patients porteurs des modifications génétiques en question. Nous avons obtenu des échantillons pour quatre mutations de RYR1: p.D544Y, p.R2336H, p.E2404K et p.D2730G. Nous en avons extrait les lymphocytes B que nous avons immortalisés par le virus d'Epstein-Barr pour les soumettre à une analyse fonctionnelle. A cet effet, nous avons mesuré l'augmentation du Ca²⁺ dans le cytoplasme déclenchée par l'agoniste de RYR1, à l'aide d'un microscope à fluorescence. On a constaté que, chez les porteurs de mutations, le calcium cytoplasmique lymphocytaire se trouvait être stimulé par des concentrations de 4-chloro-m-crésol et de caféine significativement plus basses que dans le groupe de contrôle. Ces expérimentations montrent que les mutations p.D544Y, p.R2336H, p.E2404K et p.D2730G ont un effet fonctionnel avéré.

Conclusion pratique

Les résultats de notre étude sont significatifs dans la pratique pour deux raisons. D'une part, nous avons conçu un système efficace d'analyse du gène RYR1, simplifiant ainsi la recherche de nouvelles mutations du gène chez des sujets prédisposés à l'hyperthermie maligne. D'autre part, nos résultats présentent aussi une utilité clinique immédiate: quatre nouvelles mutations peuvent s'ajouter à la liste des 29 mutations de RYR1 déjà reconnues auparavant pour l'analyse génétique moléculaire de l'hyperthermie maligne (www.emhg.org). Un nombre nettement plus élevé de patients pourront bénéficier d'un diagnostic moléculaire non invasif; la biopsie musculaire à

Tableau 1. Mutations du gène RYR1 nouvellement identifiées chez les patients examinés.
En caractères gras: mutations dont l'effet fonctionnel a été étudié.

Base mutée	Acide aminé muté
c.38T>G	p.L13R
c.677T>A	p.M226K
c.1100G>T	p.R367L
c.1589G>A	p.R530H
c.1630G>T	p.D544Y
c.3127C>T	p.R1043C
c.4055C>G	p.A1352G
c.7007G>A	p.R2336H
c.7210G>A	p.E2404K
c.8026C>T	p.R2676W
c.8189A>G	p.D2730G
c.8360C>G	p.T2787S
c.8638G>A	p.E2880K
c.9649T>C	p.S3217P
c.9868G>A	p.E3290K
c.11314C>T	p.R3772W
c.11416G>A	p.G3806R
c.12864_12872dupCACGGCGGC	p.A4289_A4291dup
c.13502C>T	p.P4501L
c.14512C>G	p.L4838V
c.14627A>G	p.K4876R
c.14813T>C	p.I4938T

ciel ouvert ainsi que le test de contraction musculaire in vitro ne seront plus nécessaires chez les porteurs de ces nouvelles mutations.

Perspectives

Les progrès réalisés dans les méthodes d'analyse du gène RYR1 vont peu à peu encore accroître le nombre de ses mutations identifiées, et rendre d'autant plus nécessaire leur rassemblement dans une banque de données internationale. Celle-ci devrait contenir toutes les mutations de RYR1, leur prévalence dans la population spécifique, ainsi que le déroulement clinique d'un épisode particulier d'hyperthermie maligne. Un projet issu du PNR53 prévoit la création d'une telle banque de données à partir du Groupe européen sur l'hyperthermie maligne.

La prévalence réelle de la prédisposition à l'hyperthermie maligne causée par des mutations du gène RYR1 reste peu claire. Parmi les familles affectées par la prédisposition à l'hyperthermie

maligne, la proportion de celles dont certains membres présentent plus d'une mutation s'élève à 7% en France [3] et à 12% au Japon [4]. Ce constat laisse supposer que la fréquence de la prédisposition à l'hyperthermie maligne pourrait dépasser nettement les estimations faites jusqu'ici. Le développement d'un typage efficace du gène RYR1 pourrait clarifier la question de la prévalence dans les échantillons de population correspondants.

Message clé

La liste des mutations du gène RYR1 admise pour le diagnostic de la prédisposition à l'hyperthermie maligne congénitale s'est enrichie de quatre nouvelles mutations, leur nombre passant ainsi de 29 à 33. En outre, on peut effectuer plus souvent qu'auparavant un test génétique au lieu de devoir pratiquer une biopsie musculaire invasive chez les patients issus de familles porteuses des mutations entraînant une telle prédisposition.

Références

- 1 Urwyler A, Deufel T, McCarthy T, West S. Guidelines for molecular genetic detection of susceptibility to malignant hyperthermia. *Br J Anaesth* 2001;86(2):283–7.
- 2 Girard T, Urwyler A, Censier K, Mueller C, Zorzato F, Treves S. Genotype-Phenotype Comparison of the Swiss Malignant Hyperthermia population. *Hum Mutat* 2001;18:357–8.
- 3 Monnier N, Krivosic-Horber R, Payen JF, et al. Presence of two different genetic traits in malignant hyperthermia families:

implication for genetic analysis, diagnosis, and incidence of malignant hyperthermia susceptibility. *Anesthesiology* 2002; 97(5):1067–74.

- 4 Ibarra MC, Wu S, Murayama K, et al. Malignant hyperthermia in Japan: mutation screening of the entire ryanodine receptor type 1 gene coding region by direct sequencing. *Anesthesiology* 2006;104(6):1146–54.

Correspondance:
PD Dr Thierry Girard
Departement Anästhesie
Universitätsspital
CH-4031 Basel
thierry.girard@unibas.ch

Erratum

Dans le numéro 41/2008, une petite erreur s'est glissée dans l'article «*Bacteroides-fragilis*-assozierte Aortitis abdominalis» de la rubrique «Der besondere Fall». L'adresse e-mail correcte de l'auteur Nora Schaub est: noschaub@uhbs.ch. La version en ligne a été corrigée.