



HAL
open science

Identification et validation fonctionnelle de nouveaux gènes impliqués dans les myopathies

Vanessa Schartner

► **To cite this version:**

Vanessa Schartner. Identification et validation fonctionnelle de nouveaux gènes impliqués dans les myopathies. Rhumatologie et système ostéo-articulaire. Université de Strasbourg, 2017. Français. NNT : 2017STRAJ026 . tel-01830198

HAL Id: tel-01830198

<https://theses.hal.science/tel-01830198>

Submitted on 4 Jul 2018

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

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

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire

THÈSE présentée par :
Vanessa SCHARTNER

soutenue le : **23 Mai 2017**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Sciences du vivant
Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Identification et validation fonctionnelle
de nouveaux
gènes impliqués dans les myopathies**

THÈSE dirigée par :

M LAPORTE Jocelyn
Mme BIANCALANA Valérie

Directeur de recherche, Université de Strasbourg
Maître de conférences, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme France Piétri-Rouxel
M Vincent Jacquemond

Chargé de recherche, Université Pierre et Marie Curie
Directeur de recherche, Université Claude Bernard Lyon I

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme Gisèle Bonne
M Jamel Chelly

Directeur de recherche, Université Pierre et Marie Curie
Professeur, Université de Strasbourg

SOMMAIRE

RESUME	5
ABREVIATIONS	11
LISTE DES FIGURES	12
LISTES DES TABLEAUX	12
INTRODUCTION	14
I. FONCTION DU MUSCLE	14
I.1. CONTRACTION MUSCULAIRE : LE SARCOMERE	14
<i>I.1.a Organisation du muscle squelettique</i>	<i>14</i>
<i>I.1.b Le sarcomère.....</i>	<i>14</i>
I.2. CONTRACTION MUSCULAIRE : LA JONCTION TRIADIQUE	16
<i>I.2.a Organisation et biogénèse de la triade.....</i>	<i>16</i>
.....	17
<i>I.2.b Le couplage excitation-contraction (CEC).....</i>	<i>18</i>
<i>I.2.c Le canal calcique voltage-dépendant DHPR.....</i>	<i>18</i>
<i>I.2.d Le canal calcique RYR1.....</i>	<i>25</i>
<i>I.2.e La triadine</i>	<i>26</i>
<i>I.2.f Calsequestrin</i>	<i>26</i>
<i>I.2.g STAC3.....</i>	<i>27</i>
<i>I.2.h Les autres protéines de la triade.....</i>	<i>27</i>
II. LES MYOPATHIES CONGENITALES	28
II.1 LES MYOPATHIES A « CORES »	29
II.2 LES MYOPATHIES A NOYAUX CENTRALISES	32
II.3 LES MYOPATHIES A AGREGATS OU INCLUSION PROTEIQUE (MYOPATHIES A NEMALINE) ...	33
II.4 LES AUTRES MYOPATHIES CONGENITALES.....	34
III. LA BALANCE REDOX DANS LE MUSCLE	34
III.1 LE STRESS OXYDATIF ET LA BALANCE REDOX	34
III.2 LES PATHOLOGIES MUSCULAIRES ASSOCIANT UN DEFAUT DE LA BALANCE REDOX.....	35
IV. DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES MYOPATHIES CONGENITALES	35
IV.1 GENETIQUE DES MALADIES RARES.....	35
IV.2 METHODES CLASSIQUES DE RECHERCHES DE MUTATIONS.....	36
IV.3 SEQUENÇAGE DE NOUVELLE GENERATION.....	38
<i>IV.3.a Introduction au séquençage</i>	<i>38</i>
<i>IV.3.b Différentes étapes de l'analyse des données de SNG</i>	<i>40</i>
IV.4 SEQUENÇAGE A HAUT DEBIT POUR LE DIAGNOSTIC ET LA RECHERCHE	42

RESULTATS	43
I. CONTEXTE DE MON PROJET DE RECHERCHE	43
I.1 BASES GENETIQUES DES MYOPATHIES CONGENITALES	43
I.2 QUESTION BIOLOGIQUE : IDENTIFICATION DE NOUVEAUX GENES DE MYOPATHIES.....	43
I.3 MYOCAPTURE : UN CONSORTIUM FRANÇAIS.....	45
I.4 SEQUENÇAGE HAUT-DEBIT ET TRAITEMENT DES DONNEES	45
II. COHORTE 1 : MYOPATHIE AVEC NOYAUX INTERNALISES ET « CORES »	47
II.1 ANALYSE GENETIQUE	49
II.2 ETUDE FONCTIONNELLE DES MUTATIONS DE CACNA1S	53
II.3 CONCLUSION DE L'ETUDE	54
III. COHORTE 2 : MYOPATHIE MYOFIBRILLAIRE AVEC NOYAUX INTERNALISES, CORES, ET BATONNETS	57
III.1 ANALYSE GENETIQUE	57
III.2 ANALYSE FONCTIONNELLE.....	58
III.3 CONCLUSION DE L'ETUDE	59
DISCUSSION	61
I. IMPACT DES MUTATIONS IDENTIFIEES DANS CACNA1S	61
I.1. IMPACT DES MUTATIONS TRONQUANTES DANS CACNA1S.....	61
<i>I.1.a Etude des mutations tronquantes de CACNA1S dans notre cohorte</i>	61
<i>I.1.b. Que sait-on sur la partie C-terminale de CACNA1S ?</i>	62
I.2 IMPACT DES MUTATIONS FAUX-SENS	63
<i>I.2.a Comment différentes mutations « faux-sens » de CACNA1S conduisent-elles à différentes maladies ?</i>	64
<i>I.2.b Impact des mutations « faux-sens » dans les cas récessifs de notre étude</i>	66
<i>I.2.c Impact des mutations « faux-sens » dans les cas dominants de notre étude</i>	67
<i>I.2.d Mécanismes physiopathologiques</i>	68
I.3 HISTOLOGIE ET ULTRASTRUCTURE DES MUSCLES DES PATIENTS CACNA1S	69
II. IMPACT DES MUTATIONS DE PYROXD1	70
II.1 QUEL EST LE ROLE DE PYROXD1 ?	71
II.2 QUEL EST L'IMPACT DES MUTATIONS IDENTIFIEES ?.....	71
II.3 MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES	72
II.4 LES ANTIOXYDANTS : UNE APPROCHE THERAPEUTIQUE A ENVISAGER	73
III. CONCLUSION GENERALE	74
BIBLIOGRAPHIE	76
RESOURCES WEB ET LOGICIELS :	86

Résumé

Introduction

Les myopathies congénitales sont des maladies neuromusculaires très sévères avec une prévalence de 1/25 000. Les symptômes sont différents pour tous les patients car il existe différentes classes de myopathies congénitales, distinguées selon les défauts morphologiques identifiés sur biopsies musculaires et selon le gène causant la maladie. Le diagnostic est donc établi sur la base d'études cliniques, histologiques et génétiques. L'identification du gène muté est très important pour une meilleure prise en charge du patient, un conseil génétique et de nouvelles perspectives thérapeutiques; mais également pour l'étude de nouveaux mécanismes pathologiques. Malheureusement, environ la moitié des patients n'ont pas encore de diagnostic génétique, ce qui suggère de nouveaux gènes impliqués dans les myopathies.

Le but de mon projet de thèse était d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans les myopathies congénitales et de valider l'impact des mutations trouvées.

La stratégie utilisée est l'analyse de données de séquençage d'exomes de patients déjà exclus pour les gènes connus grâce à un « pipeline » bio-informatique validé dans le laboratoire. Après l'identification d'un gène candidat, l'impact des mutations est étudié de manière *in vitro* dans des cellules de patients ou des cellules musculaires transfectées avec un ADNc muté.

Résultats

I. Validation fonctionnelle des mutations trouvées dans le gène *CACNA1S*

Le premier gène que j'ai étudié est le gène *CACNA1S*. Ce gène code pour la sous-unité majeure du récepteur de la dihydropyridine (DHPR) et est essentiel pour le couplage excitation-contraction, grâce à son interaction avec le récepteur de la ryanodine (RYR1).

Grâce au « pipeline » bio-informatique développé au laboratoire, nous avons identifié dans notre cohorte un patient hétérozygote composite qui porte une mutation avec décalage du cadre de lecture et une mutation non-sens. Ceci était très intéressant car il existe un modèle spontané de souris porteur d'une mutation avec décalage du cadre de lecture et la mutation homozygote cause une létalité embryonnaire. De plus, dans les bases de données d'exomes publics, il n'existe qu'une seule mutation tronquante présente sous forme homozygote à la fin du dernier exon, possiblement sans impact sur la protéine.

A la recherche d'autres familles porteuses de mutations dans *CACNA1S*, nous avons identifié une deuxième famille récessive porteuse de deux mutations avec décalage du cadre de lecture mais également, deux familles de ségrégation dominante et *de novo*, porteuse chacune d'une mutation faux-sens affectant le même acide aminé. L'observation de deux ségrégations différentes était assez surprenante pour ce potentiel nouveau gène de myopathie. Des mutations dans *CACNA1S* avaient en fait été déjà reportées dans d'autres maladies musculaires mais avec une ségrégation exclusivement dominante. Durant mon projet de thèse, nous avons également collaboré avec d'autres équipes qui avaient également identifié des mutations dans *CACNA1S*, ce qui faisait un total de 7 familles (4 récessives et 3 dominantes).

La comparaison des données cliniques et histologiques obtenues en collaboration avec l'équipe de Dr Norma Romero (Institut de Myologie à Paris) et les cliniciens des familles a montré une homogénéité entre les quatre familles, indifféremment de la ségrégation des mutations dans le gène *CACNA1S*. Tous les patients avaient une faiblesse musculaire modérée, avec faiblesse faciale et légère difficulté à la déglutition. Au niveau morphologique, les biopsies des patients montrent des caractéristiques non spécifiques à une seule classe de myopathie congénitale. Nous pouvons en effet observer des noyaux centraux et des structures ressemblant à des « core », mais également un aspect « alvéolaire » du réseau intermyofibrillaire observée par coloration NADH-TR.

La protéine *CACNA1S* étant une protéine présente au niveau des triades, une structure particulièrement importante dans le muscle, nous avons observé la structure des triades sur des coupes de muscles de patients en histologie et en microscopie électronique et nous voyons

effectivement des défauts au niveau de la triade. Le réticulum sarcoplasmique (RS) et le tubule transverse est dilaté mais nous pouvons toujours voir les « pieds » de RYR1 entre le RS et tubule transverse avec un espacement qui semble normal.

La partie majeure de mon projet était de valider l'impact des mutations sur la protéine. Pour cela, nous avons prévu de tester plusieurs outils en parallèle : des myotubes provenant de cellules primaires de souris transfectées par l'ADNc muté, des myotubes immortalisées de souris ou d'homme transfectés par l'ADNc muté, des cellules non musculaires transfectées par l'ADNc muté ou bien également des myotubes de patients. Au final, le meilleur modèle pour étudier l'effet des mutations était les cellules de patients. Malheureusement, nous n'avons pu avoir accès à seulement une seule lignée primaire de myoblastes de patient : le patient porteur de deux mutations avec décalage du cadre de lecture. Cette lignée de cellules nous a permis de faire plusieurs tests fonctionnels. J'ai pu observer que l'ARN est toujours présent mais qu'il n'y a pas de signal détectable de la protéine par western blot ni par immunofluorescence avec un anticorps ciblant la partie N-terminale de la protéine. Ce résultat a pu être comparé avec un western-blot sur des extraits protéiques de muscles de patients dominants et récessifs ou nous avons pu observer une grande diminution du niveau protéique chez tous les patients mutés dans *CACNA1S*. Dans les cellules, nous pouvons observer une localisation normale des protéines RYR1, BIN1 et Dysferlin par rapport à des myotubes contrôles, ce qui suggère qu'il n'y a pas d'altération des structures de la triade au stade étudié.

Comme *CACNA1S* est essentiel pour le couplage excitation-contraction qui mène au relargage de calcium présent dans le RS vers le cytosol, l'étape suivante du projet a été d'étudier l'impact des mutations sur l'homéostasie calcique. Pour cela, nous avons collaboré avec l'équipe de Dr Susan Treves (University of Basel) pour effectuer des mesures de calcium dans les myotubes du patient avec mutations récessives de notre cohorte et les myotubes d'un patient avec une mutation dominante provenant d'un autre collaborateur. Les résultats ont montré qu'au repos, les niveaux de calcium cytosolique et sarcoplasmique sont similaires entre les cellules des patients et les cellules contrôles. Cependant, après activation de *CACNA1S* induite par un ajout de KCl dans le milieu, le niveau maximal de calcium relargué par le RS est diminué par rapport

aux cellules contrôles. Ces résultats montrent un défaut du couplage d'excitation-contraction dans les cellules de patients portant des mutations dans *CACNAIS*.

11. Validation fonctionnelle de variants trouvés dans le gène *PYROXDI*

Le deuxième gène que j'ai étudié était *PYROXDI* (pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase domain 1). L'analyse génétique d'une famille consanguine d'origine turque avait été effectuée avant mon arrivée dans le laboratoire. Le meilleur gène candidat était *PYROXDI*, avec une mutation faux-sens homozygote. Grâce à une collaboration internationale, nous avons trouvé quatre autres familles portant des mutations dans ce gène avec une ségrégation récessive pour tous. Les cinq mutations différentes comportent des faux-sens, des décalages du cadre de lecture ou bien des mutations détruisant le site d'épissage canonique.

Toujours en collaboration, nous avons établi la comparaison clinique et histologique entre tous les patients. Il s'agit de patient âgés de 7 à 31 ans présentant une faiblesse musculaire proximale et distale, une faiblesse faciale et un symptôme de voix nasale. L'étude morphologique montre une histologie spécifique ne ressemblant à aucune autre myopathie, avec des noyaux internalisés et/ou groupés, une désorganisation sarcomérique et des agrégats myofibrillaires.

Pour la partie génétique, nous nous séquencé le gène *PYROXDI* à partir de l'ADN de plusieurs familles qui avaient un phénotype similaire afin de trouver de nouvelles mutations. Deux familles portaient chacune une mutation déjà découverte dans les autres familles dans *PYROXDI*. Cependant, les parents porteurs hétérozygotes n'étant pas atteints et le fait que dans les autres familles la maladie est récessive suggèrait soit une deuxième mutation intronique ou une grande délétion chez les patients, ou alors des patients porteurs sains. Dans un des deux patients, nous avons pu avoir accès à du muscle et donc de l'ARN. En étudiant l'ARN par PCR et séquençage, j'ai pu observer sur gel que l'ARN n'est pas dégradé mais que la mutation était à l'état homozygote, ce qui suggèrait une dégradation du deuxième allèle. Nous avons réussi à séquencer environ 80 % des introns à la recherche de mutations intronique causant la dégradation du deuxième allèle mais nous n'en avons pas détecté. La cause de la dégradation

peut être une grande délétion dans le gène ou une mutation dans une partie des introns que nous n'avons pas encore réussi à séquencer.

Pour valider l'impact du faux sens homozygote trouvé dans la famille de notre cohorte, j'ai cloné l'ADNc sauvage de PYROXD1 dans plusieurs vecteurs et introduis la mutation dans la construction. J'ai transfecté les plasmides sauvages et mutés dans différents types cellulaires afin de 1) déterminer la localisation de la protéine sauvage et 2) étudier l'impact de la mutation sur la localisation. J'ai également pu obtenir des myoblastes de patients pour l'étude fonctionnelle. La plus grande difficulté pour l'étude des mutations de ce gène a été de trouver un bon anticorps. En effet, le gène n'étant pas connu, aucun anticorps n'avait déjà été caractérisé. J'ai pu tester avec différentes techniques des anticorps commerciaux mais j'ai également fait produire un anticorps grâce à la plateforme d'anticorps de l'IGBMC que j'ai caractérisé par la suite et utilisé pour étudier l'impact de la mutation.

Au niveau de la localisation et du niveau protéique, nous n'avons observé aucun changement entre les protéines mutées et sauvages, ce qui suggérait que les mutations pouvaient avoir un impact sur la fonction de la protéine.

La fonction de la protéine n'était pas connue car aucune étude n'avait encore été faite sur PYROXD1. Les domaines protéiques reconnus sur la séquence protéique comprennent un domaine d'oxidoreduction. Pour comprendre si PYROXD1 pourrait avoir ce type de fonction, nous avons commencé une collaboration avec l'équipe de Dr Sylvie Friant (Université de Strasbourg) pour avoir un modèle animal de levure. La stratégie était d'introduire l'ADNc humain de PYROXD1 dans des levures mutées pour la réductase Glr1, et d'étudier si la complémentation avait lieu. Nous avons pu observer une complémentation ce qui suggère que PYROXD1 a une activité de réductase, et nous avons pu observer que les mutations testées impactaient cette activité dans la levure.

Conclusion

Durant mon travail de thèse, j'ai participé à :

- L'étude fonctionnelle des mutations identifiées dans le nouveau gène de myopathie *PYROXD1* et la recherche de nouvelles mutations dans notre cohorte de patients atteints de myopathie congénitale.
- L'identification de mutations dans le nouveau gène de myopathie *CACNAIS*.
- L'étude fonctionnelle des mutations du gène *CACNAIS* qui montre que les mutations induisent une réduction du niveau protéique et, pour les 2 mutations testées, il y a un défaut du couplage excitation-contraction dont le mécanisme exact est encore à caractériser.

Abréviations

Ca²⁺ : calcium

CCD : Central core disease

CEC : Couplage excitation-contraction

CNM : Centronuclear myopathy

DHPR : Dihydropyridine receptor

FAD : Flavine adénine dinucléotide

GTm : Gomori trichrome modifié

HE : Hématoxyline éosine

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogéné

PCR : Polymerase chain reaction

PYROXD1 : pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase domain 1

RS : Réticulum sarcoplasmique

RYR1 : Ryanonide receptor type 1

SDH : Succinyl-CoQ déshydrogénase

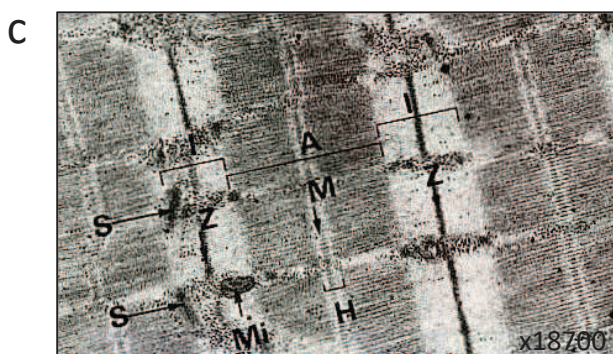
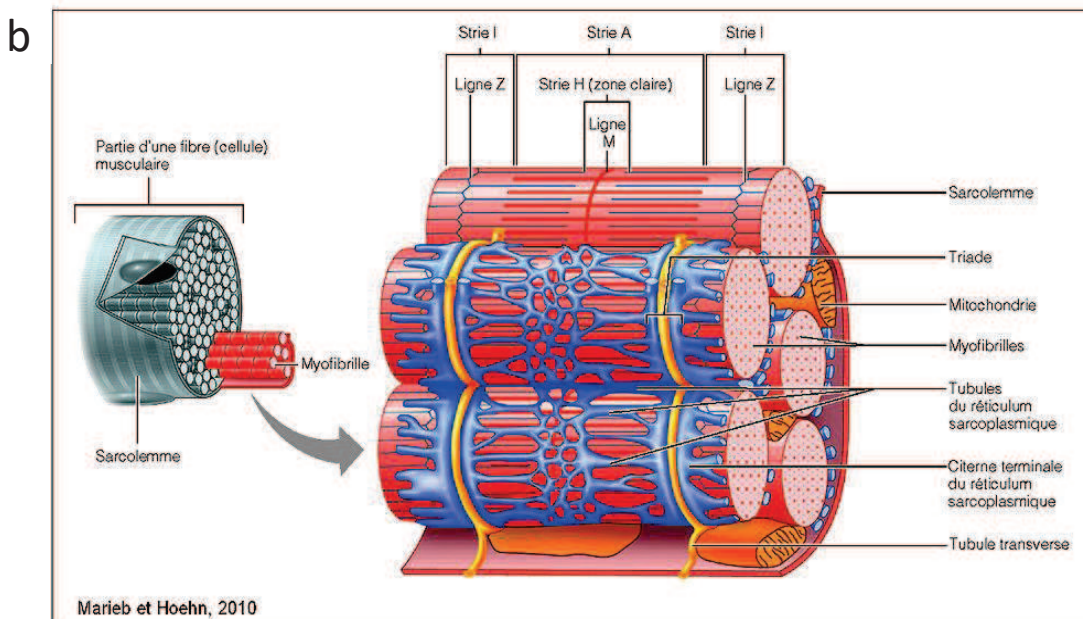
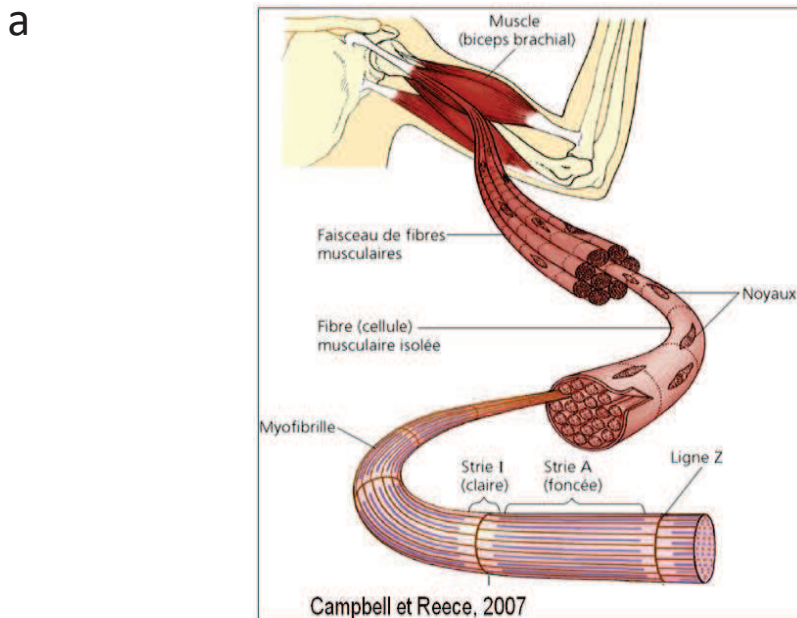
SNG : séquençage de nouvelle génération

Liste des figures

Figure 1. Structure simplifiée du muscle squelettique.	10
Figure 2. Contraction musculaire : les protéines associées au sarcomère	12
Figure 3. Représentation schématique simplifiée de la jonction triadique du muscle squelettique.	14
Figure 4. Organisation du DHPR dans le muscle squelettique	16
Figure 5. Structure 3D de DHPR.	18
Figure 6. Représentation schématique de la localisation des mutations pathogéniques de <i>CACNAIS</i> .	20
Figure 7. Le récepteur à la ryanodine (RYR1).	20
Figure 8. Signes « classiques » des différentes myopathies congénitales observés en histologie	26
Figure 9. Différentes étapes entre le séquençage par la technique de Sanger et par un séquenceur de nouvelle génération	33
Figure 10. Schéma de l'alignement de reads obtenus par SNG.	35
Figure 11. Exemple d'histologie de biopsie musculaire de la cohorte 1 (<i>CACNAIS</i>)	41
Figure 12. Arbres généalogiques de la cohorte 1 et mutations identifiées	41
Figure 13. Représentation schématique de la localisation des variants pathogéniques de <i>CACNAIS</i>	44
Figure 14. Arbres généalogiques de la cohorte 2 et mutations identifiées dans <i>PYROXDI</i> .	48
Figure 15. Représentation schématique de la localisation des variants pathogéniques de <i>PYROXDI</i>	48
Figure 16. Représentation schématique de la localisation des mutations de <i>CACNAIS</i> .	56

Listes des tableaux

Tableau 1. Les myopathies congénitales et les gènes associés.	24
Tableau 2. Origine ethnique des personnes dont les données d'exomes ou de génomes sont disponibles dans la bases de données gnomAD	35
Tableau 3. Exemple de tableau d'analyse avec annotations des variants avec le logiciel VaRank	38
Tableau 4. Identification de 10 variants rares du gène <i>CACNAIS</i> dans une cohorte de 11 patients atteints de myopathie congénitale	44
Tableau 5. Identification de 5 variants rares du gène <i>PYROXDI</i> dans une cohorte de 9 patients atteints de myopathie congénitale	48



Histologie fonctionnelle 2nd édition, Ed. : MEDS

Figure 1. Structure simplifiée du muscle squelettique. a) Organisation du muscle en réseau de fibres (cellules) musculaires. b) Chaque fibre musculaire est composée de multiples myofibrilles. Entre les myofibrilles se trouvent le cytoplasme, des mitochondries. Autour de chaque myofibrille se trouve un réseau de réticulum sarcoplasmique organisé, qui s'organise avec une invagination du sarcolemme (membrane plasmique) afin de former la structure de la triade. c) Observation au microscope électronique d'une coupe longitudinale de muscle, où l'on peut observer l'alignement des myofibrilles composées de filaments fins et épais du sarcomère.

INTRODUCTION

I. Fonction du muscle

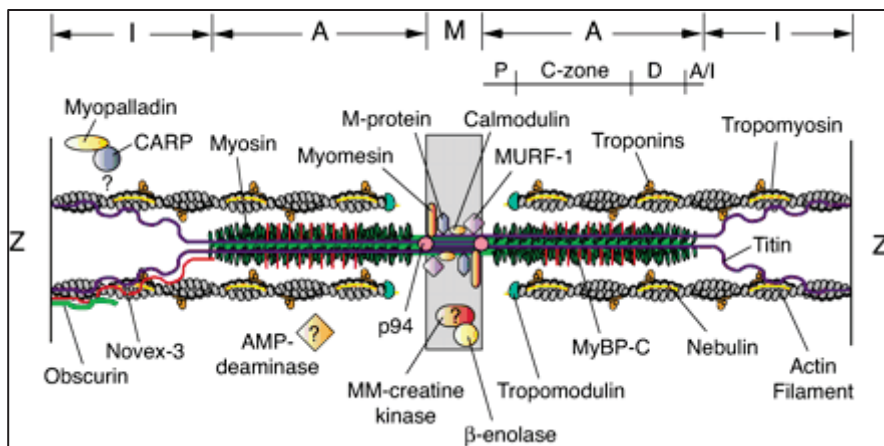
I.1. Contraction musculaire : le sarcomère

I.1.a Organisation du muscle squelettique

Dans le muscle squelettique, les cellules musculaires sont grandes, allongées et multinuclées. Les cellules sont appelées « fibres » et les noyaux sont localisés en périphérie tout au long de la cellule et prennent une forme allongée dans le sens de la fibre (**Figure 1a**). Ces cellules ont la particularité de ne pas se diviser, et en cas de lésion et destruction de la cellule, elle est remplacée par la prolifération de cellules souches musculaires. La cellule est entourée d'une membrane plasmique appelée sarcolemme. La cellule est composée de multiples myofibrilles dans le cytoplasme, où se trouvent également des mitochondries (**Figure 1b**). Chaque myofibrille est entourée par le réticulum sarcoplasmique (RS), organisé en réseau longitudinal le long du sarcomère dont l'extrémité, la citerne terminale est dilatée au niveau de la ligne Z. Le RS est le réservoir intracellulaire de calcium (Ca^{2+}). Chaque réseau de RS se retrouve symétriquement en face d'un autre réseau séparé par une invagination transversale du sarcolemme appelée tubule transversal (Tubule T) au niveau de la jonction entre les stries A et I (**Figure 1b**). En microscopie électronique sur une coupe longitudinale, les myofibrilles forment un alignement de bandes sombres (stries A) qui correspondent aux filaments épais du sarcomère et de bandes blanches (stries I) qui correspondent aux filaments fins du sarcomère (**Figure 1c**). Ce qui est observé est la structure répétée du sarcomère, délimitée par les lignes Z, plus petite unité de contraction dans le muscle.

I.1.b Le sarcomère

Les filaments fins sont composés principalement d'actine, auquel s'ajoute des protéines accessoires comme la tropomyosine ou la troponine. Les filaments sont attachés deux par deux



www.annualreviews.org

Figure 2. Contraction musculaire : les protéines associées au sarcomère

via l'alpha-actinine au niveau de la ligne Z. La nébuline s'étend le long des filaments fins pour assurer la structure.

Les filaments épais sont composés de myosine. Chaque molécule de myosine est composée de 2 chaînes lourdes qui s'enroulent pour former une hélice avec à leur extrémité la « tête de myosine » et 2 chaînes légères. Différents isoformes de myosine peuvent être exprimés au cours du développement ou selon le type de muscle. La myoméline et l'obscurine fixent la myosine au niveau de ligne M. La titine fixe les filaments épais à la ligne Z (**Figure 2**).

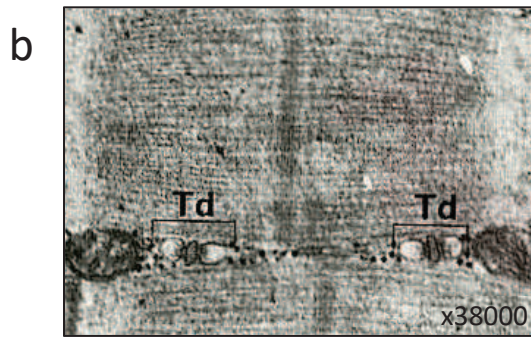
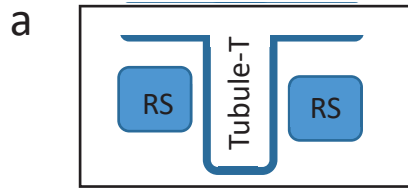
D'autres protéines structurales sont très importantes : la dystrophine qui relie les myofilaments à un complexe glycoprotéique à la membrane plasmique, les complexes des dystroglycanes et sarcoglycanes et la laminine qui fait le lien avec les éléments de la matrice extracellulaire.

Lors de la contraction, les myofilaments d'actine glissent entre les filaments de myosine. Ce mouvement est commandé par les têtes des molécules de myosine qui se lient puis se détachent de la molécule d'actine. Le déplacement est capable grâce à la fixation et l'hydrolyse de molécules d'ATP sur la myosine. La régulation de la contraction musculaire se fait à plusieurs niveaux. La tropomyosine masque le site de la liaison actine-myosine. La libération de ce site est induite par le Ca^{2+} . Cet influx cytosolique de Ca^{2+} se fait après un influx nerveux dans une structure particulière du muscle, appelée triade.

I.2. Contraction musculaire : la jonction triadique

I.2.a Organisation et biogénèse de la triade

La triade est une structure très spécialisée et l'organisation de sa structure est essentielle pour la contraction musculaire. Elle est constituée des citernes terminales du RS (contenant le Ca^{2+}) et d'un tubule T (**Figure 1b ; Figure3a-b**). Le RS est une forme spécialisée du réticulum endoplasmique et se compose d'un réseau de tubules longitudinaux de diamètre variable qui se regroupent en un unique compartiment plus élargie appelé citerne terminale au niveau de la jonction entre les stries A et I. La biogénèse du RS a été étudié dans différents modèles. On peut observer le début de la formation sous la forme de cluster de protéines de la triades (RyR1,



Histologie fonctionnelle 2nd édition, Ed. : MEDS

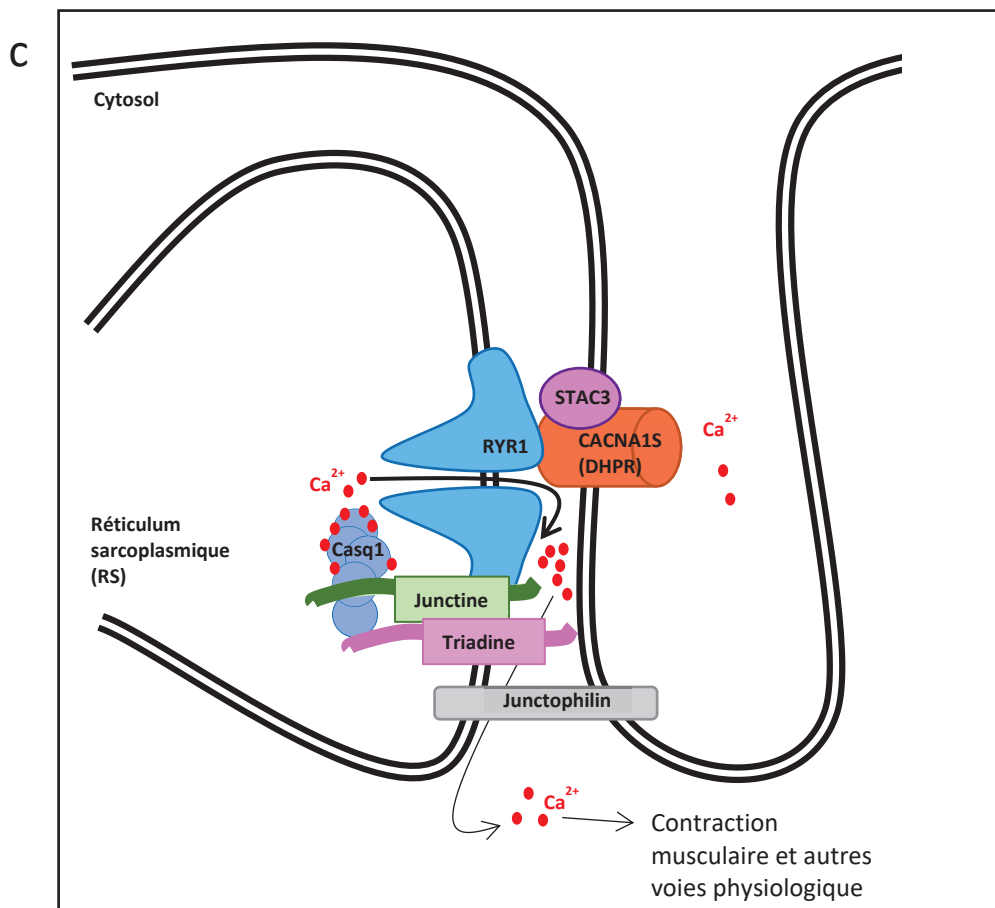


Figure 3. Représentation schématique simplifiée de la jonction triadique du muscle squelettique.

a) Représentation schématique d'une triade : Un Tubule-T central et deux citernes terminales de réticulum sarcoplasmique (RS) de part et d'autre. b) Observation des triades (Td) en

triadine, DHPR) sous forme longitudinale puis transversale (Rossi et al., 2008; Schiaffino and Margreth, 1969; Takekura et al., 2001). La biogénèse des tubules T est complexe et fait intervenir plusieurs mécanismes, dont la tubulation des membranes par Caveolin 3, Amphiphysin 2 et Mitsugumin 29 (Ishikawa, 1968; Komazaki et al., 2001; Lee et al., 2002). La triade est la structure où a lieu le mécanisme de couplage excitation-contraction (CEC).

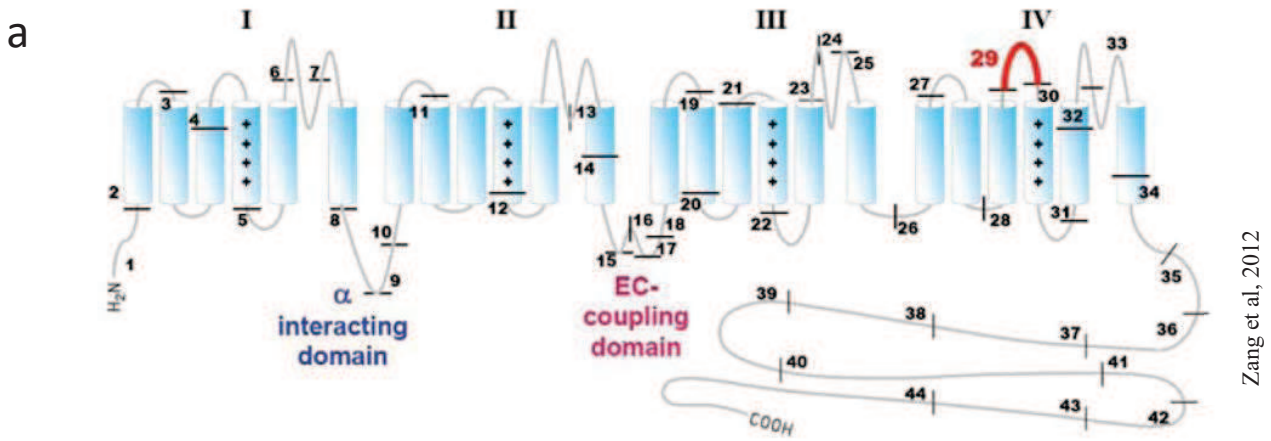
I.2.b Le couplage excitation-contraction (CEC)

Le couplage excitation-contraction (CEC) est le processus qui lie l'excitation électrique de la membrane (dépolariation) à la contraction musculaire. Plus spécifiquement, la dépolariation de la membrane du tubule T induit un relargage du Ca^{2+} stocké dans le RS. Les acteurs majeurs du CEC sont le récepteur à la dihydropyridine (DHPR) et le récepteur à la ryanodine (RYR1) mais le CEC est fonctionnel grâce à une multitude de protéines (**Figure 3c**). Le potentiel de membrane est senti par les résidus chargés des domaines transmembranaires du canal DHPR situé sur le tubule T qui active le canal RYR1 au niveau du RS qui va libérer le Ca^{2+} vers le cytosol (Schneider et Chandler 1973 ; Chandler et al, 1976). Dans le muscle squelettique, c'est un changement de conformation du DHPR qui active RYR1. Le Ca^{2+} relargué va activer différentes voies physiologiques dans le muscle, dont la contraction musculaire au niveau du sarcomère

Après libération du Ca^{2+} du RS vers le cytosol, une pompe calcique ATPase (SERCA) permet l'entrée du Ca^{2+} vers le RS pour remplir à nouveau les stocks de Ca^{2+} du RS.

I.2.c Le canal calcique voltage-dépendant DHPR

Il existe 4 types de canaux calciques dépendant du voltage (L, T, N, P). Les canaux de type L sont aussi appelés récepteur à la dihydropyridine (DHPR), sont ubiquitaires et ont deux fonctions. Ils ont la fonction de canal calcique de type L mais également de senseur de voltage. Les canaux de types L ont des propriétés électrophysiologiques spécifiques avec un seuil d'activation de -40mV et un courant compris entre -30mV et -10mV. L'activation est rapide et l'inactivation lente.



Zang et al, 2012

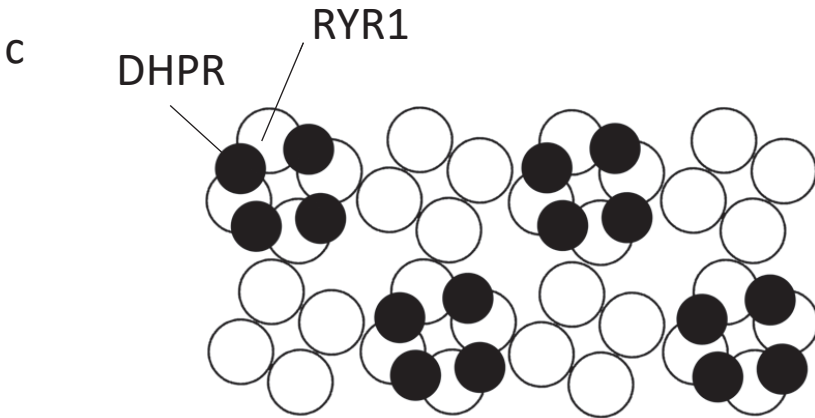
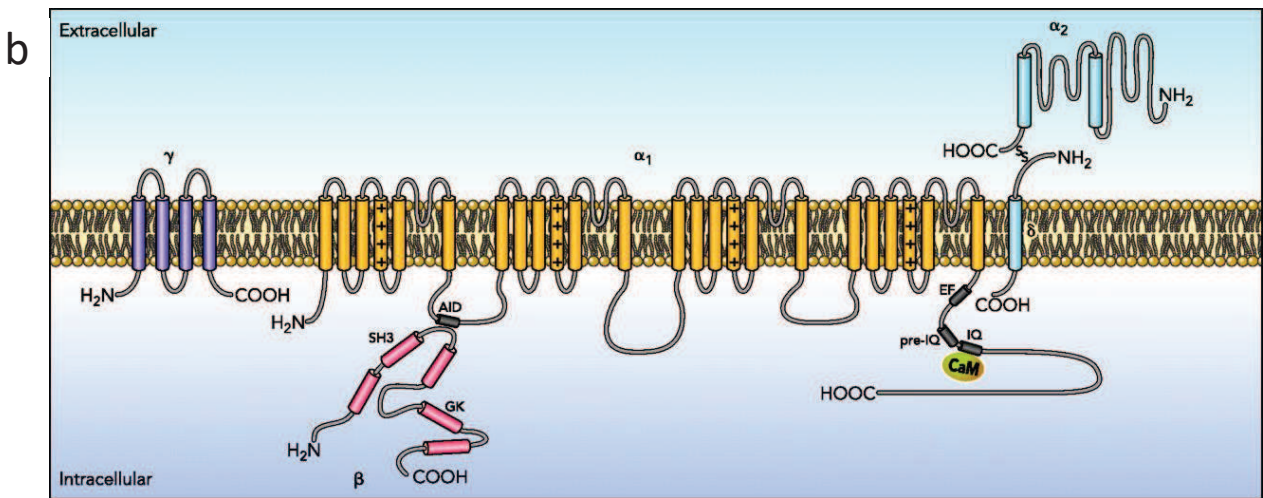


Figure 4. Organisation du DHPR dans le muscle squelettique. a) Organisation de CACNA1S en 4 domaines similaires composés de 6 segments transmembranaires. La boucle I-II est connue pour interagir avec la sous-unité beta de DHPR, la boucle II-III est nécessaire pour le couplage excitation-contraction. L'exon 29 n'est pas présent dans le transcrypt embryonnaire. b) Organisation des 5 sous-unités de DHPR. c) Organisation du DHPR en tétrades et orientés en face de RYR1 de manière alternative.

Le DHPR est un complexe moléculaire de 450 kDa composé de 5 sous-unités : **alpha1** (176 kDa), **alpha2** (147 kDa), **delta** (24 kDa), **beta** (56 kDa), **gamma** (34 kDa). Chaque sous-unité est présente une fois dans le complexe.

DHPR est localisé sur la membrane du tubule T, et certains de ses domaines font donc face à l'extérieur de la cellule tandis que d'autres domaines se trouvent dans le cytosol de la cellule.

L'analyse de la structure primaire de la protéine **alpha1** montre la présence de 24 segments transmembranaires, séparés en 4 domaines répétés (Tanabe et al., 1987) (**Figure 4a**). Chaque domaine (I à IV) contient 6 segments appelés segments S1 à S6. **Alpha1** a également une grande partie C-terminale du côté cytosolique. L'analyse des autres sous-unités montre que la protéine **delta** n'a qu'un seul segment transmembranaire qui lui permet d'ancrer **alpha2** au niveau de la membrane, du côté extracellulaire (Brickley et al., 1995; Gurnett et al., 1996). Le peptide **beta** serait hydrophilique et localisée du côté cytosolique tandis que **gamma** contient 4 segments transmembranaires (**Figure 4b**).

Alpha2 et delta sont codés par le même gène. Les 2 sous-unités sont reliées par un pont disulfure, sont orientés vers la partie extracellulaire et interagiraient avec le domaine III de **Alpha1** (Jay et al., 1991; Dolphin, 2013; Gurnett et al., 1997). Leur rôle, seul sans interaction avec d'autres sous-unités de DHPR, est difficile à déterminer. Cependant, selon différentes études, ils auraient un rôle dans le niveau d'expression de **Alpha1**, dans le trafic membranaire et dans l'amplitude du courant (Felix et al., 1997; Suh-Kim et al., 1996).

La sous unité **beta** est présente dans le cytoplasme et a un rôle essentiel dans les propriétés de senseur de voltage et de trafic intracellulaire de **alpha1** (Cheng et al., 2005; Schredelseker et al., 2009; Sheridan et al., 2003). Plusieurs études ont montré une interaction entre **beta** et **alpha 1** grâce à un domaine de **alpha1** appelé AID (alpha 1-interaction domain) entre les domaines I et II. La sous unité **beta** pourrait également interagir avec RYR1 (Karunasekara et al., 2012).

Basé sur l'analyse de la structure 3D de DHPR, la sous unité **gamma** semble interagir avec le segment transmembranaire S4 du domaine 4 de CACNA1S ainsi que la boucle III-IV suggérant un rôle de **gamma** dans les propriétés de canal de CACNA1S (Wu et al, 2016).

Alpha1, appelé CACNA1S ou Cav1.1, est la sous unité principale de DHPR, avec ses deux rôles de senseur de voltage et de canal calcique (Buraei and Yang, 2010; Catterall, 2011). La sous-unité Alpha1 est codé par différents gènes et l'expression de chacun est spécifique selon les tissus. Dans le muscle squelettique, la sous-unité Alpha1 est codé par le gène *CACNA1S* et est exprimé lors du développement embryonnaire et à l'âge adulte. Cependant, le transcrit majoritaire de *CACNA1S* n'est pas le même durant de le développement et chez l'adulte (Flucher and Tuluc, 2011). Le transcrit fétal ne contient pas l'exon 29 et est exprimé très faiblement chez l'adulte.

L'étude des structures de CACNA1S et DHPR a commencée par des expériences de « freeze-fracture » des membranes du tubule T. Cela a montré une organisation en tétrades (4 DHPR) de manière à se trouver alternativement en face de RYR1, laissant un RYR1 sur 2 libre (Block et al., 1988; Franzini-Armstrong, 1984; Leung et al., 1988) (**Figure 4c**).

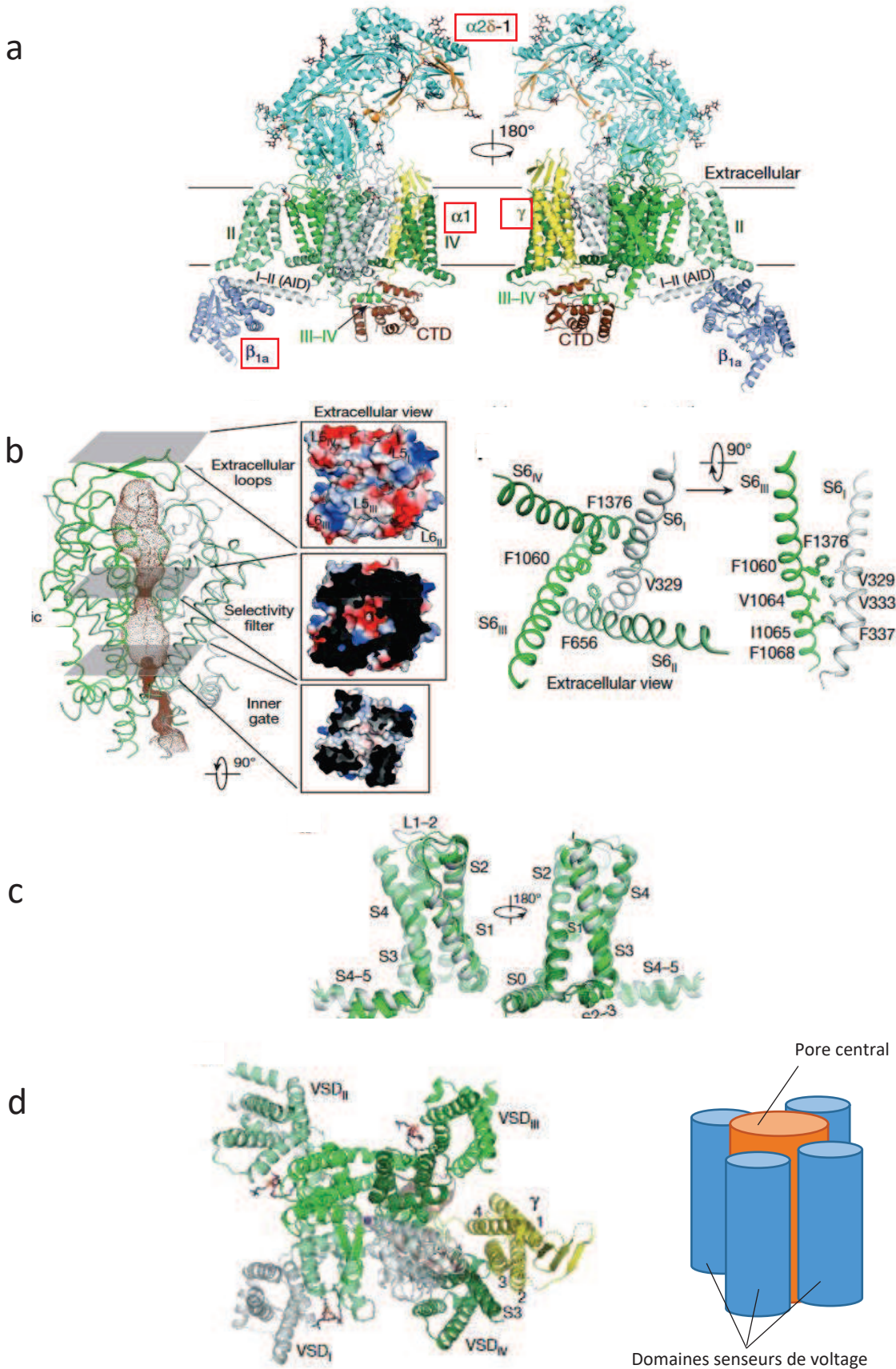


Figure 5. Structure 3D de DHPR. a) Vision globale de la structure de DHPR. b) Vision du pore ionique de CACNA1S formé par les segments S5, S6 et les boucles S5-S6 de tous les domaines (à gauche) et observation de certains acides aminés importants pour la structure du pore (à droite). c) Vision d'un pore « senseur de voltage » formé par les segments S1 à S4. d) A gauche, structure 3D de CACNA1S vu du haut. A droite, schéma simplifié des pores de DHPR : 4 pores « senseurs de voltage » et 1 pore ionique central.

La structure 3D de DHPR a été étudiée depuis la fin des années 1980 mais le complexe est très difficile à purifier et rend donc l'étude de la structure plus difficile, bloquée à 20 angström. Récemment, la structure a été déterminée de manière plus précise grâce à la technique de « cryo-EM » et à une optimisation du protocole de purification jusqu'à 4.2 angström (**Figure 5a**) (Hu et al, 2015 ; Wu et al, 2015 ; Wu et al, 2016).

Les segments S5 et S6 de CACNA1S sont très importants pour l'ouverture et la fermeture du pore aux ions calciques (**Figure 5b**). Le pore central est formé par les segments S5 et S6 et les boucles entre les segments 5 et 6 de chaque domaine. Ce pore est stabilisé par des interactions disulfides et contient des résidus chargés négativement afin de permettre une première entrée du Ca^{2+} vers le vestibule de sélectivité. Le filtre de sélectivité contient 4 glutamate et permet la sélectivité des ions. Sous le vestibule se trouve la cavité hydrophobique qui est formée par la dernière partie des 4 segments S6 et cette cavité empêche le passage des ions vers le cytosol.

Le domaine senseur de voltage est composé des segments 1 à 4, le S4 étant le segment comportant les charges positives (**Figure 5c**). Il y a donc 4 domaines senseur de voltage et un pore ionique (**Figure 5d**). Les structures qui n'ont pas pu être déterminés sont 40 résidus dans la boucle I-II, 100 résidus dans la boucle II-III et la partie C-terminale après le résidu 1515. Cela suggère que ces domaines sont variables.

Des mutations dans le gènes *CACNA1S* ont été identifiées dans deux maladies musculaires. L'hyperthermie maligne (HM) est une maladie pharmacogénique car elle est causée au contact de différents anesthésiants de type halothane, le relaxant musculaire dépolarisant succinylcholine et plus rarement l'HM peut être causée par la pratique d'un sport de haute intensité (Denborough et al, 1962 ; MacLennan et al, 1992). Les symptômes sont des contractures non contrôlées, une rigidité musculaire, de l'hyperthermie, de l'hyperkaliémie, des arythmies cardiaques et peut être fatal si la crise n'est pas traitée immédiatement. Trois mutations faux-sens hétérozygotes de *CACNA1S* induisent la maladie et le mécanisme pathologique est un relargage excessif de Ca^{2+} du RS vers le cytosol, ce qui conduit entre autres, à un excès de contraction (**Figure 6**) (Carpenter et al., 2009; Monnier et al., 1997). Le seul traitement disponible est l'injection de dantrolène (un inhibiteur du relargage calcique) qui stoppe les crises.

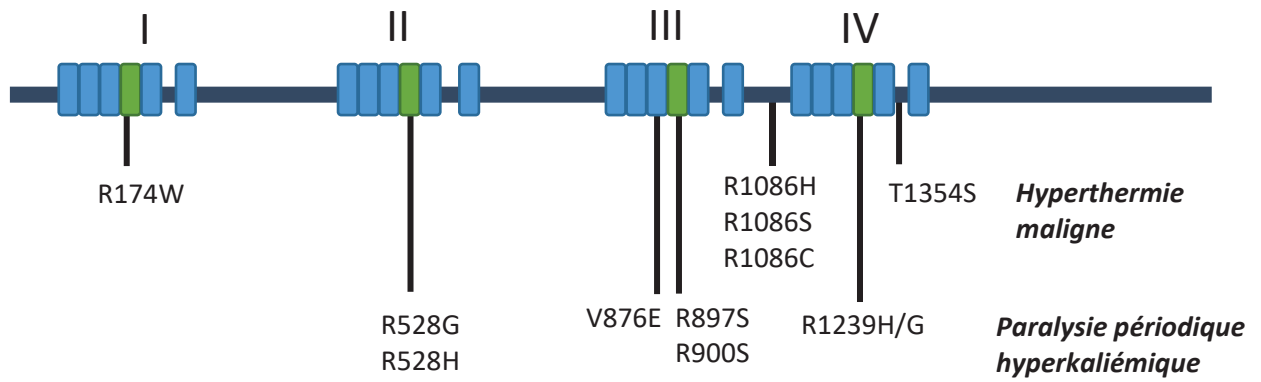


Figure 6 : Représentation schématique de la localisation des mutations pathogéniques de *CACNA1S*.

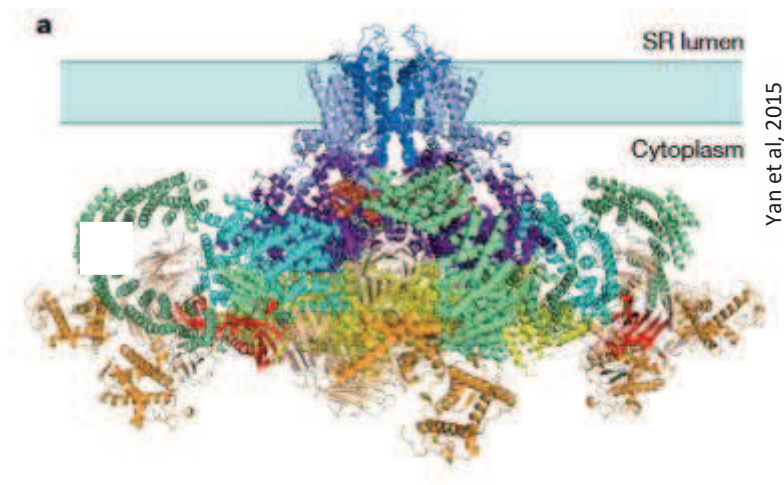


Figure 7. Le récepteur à la ryanodine (RYR1). Visualisation de la structure 3D de la protéine.

La paralysie périodique hypokaliémique (PPH) est caractérisée par des épisodes de faiblesse musculaire sévère pouvant durer entre quelques heures et quelques jours. Ces épisodes sont associés à un niveau réduit de potassium sérique. Les épisodes peuvent commencer à l'enfance et sont déclenchés par de l'exercice ou une période de stress ou de maladie. La prise de potassium ou d'acetazolamide permet chez certains patients de prolonger la durée entre deux crises. Il a été décrit que certains patients développent une myopathie vacuolaire à l'âge adulte. Les mutations de *CACNA1S* identifiées sont des faux-sens hétérozygotes dans les domaines senseur de voltage (**Figure 6**) (Matthews et al., 2009). Les études fonctionnelles sont peu nombreuses et pointent vers une hypothèse « perte de fonction » avec une perte de détection du voltage qui conduit à une réduction du relargage de calcium par RYR1. Cette maladie est également causée par des mutations dans le gène *SCN4A* qui code pour un canal sodique.

I.2.d Le canal calcique RYR1

Le récepteur à la ryanodine est un canal calcique codé par le gène *RYR1* et est majoritairement exprimé dans le muscle. D'autres gènes expriment ces canaux dans les autres tissus (*RYR2* dans le coeur, *RYR3* dans les cellules nerveuses). RYR1 est une très grosse protéine formée en homo-tétramère de quatre sous-unités identiques (560 kDa chacune) et est localisée sur la membrane du RS (**Figure 7**). Sa partie C-terminale forme le pore tandis que la partie N-terminale forme une structure cytosolique entre le RS et le tubule T qui est appelé les « pieds » de RYR1 ; observables en microscopie électronique. RYR1 est un canal calcique, qui permet la libération du Ca^{2+} du RS vers le cytosol. Son ouverture est activée par DHPR, qui subit un changement structural lors de la dépolarisation de la membrane (Schneider and Chandler, 1973). Certaines études montrent une interaction directe entre les deux protéines et d'autres études montrent plutôt une interaction indirecte (el-Hayek et al., 1995a; El-Hayek and Ikemoto, 1998; el-Hayek et al., 1995b; Morrissette et al., 1995; Proenza et al., 2000). D'autres molécules peuvent induire l'ouverture de RYR1 et la libération de calcium comme la ryanodine, la caféine ou le 4-chloro-*m*-cresol.

La déficience en *Ryr1* dans la souris conduit à une létalité embryonnaire, ce qui montre le rôle essentiel de RYR1 durant le développement du muscle (Takekura et al., 1995; Takeshima et al., 1994). L'utilisation de cellules musculaires déficientes en RYR1 (dyspédiques) a permis

l'observation que les « pieds » de RYR1 n'étaient plus visibles au niveau des triades et que le couplage excitation-contraction n'est plus fonctionnel (Takekura et al., 1995).

Des mutations dans *RYR1* sont identifiées dans plusieurs maladies musculaires. Des mutations dominantes conduisent à une hyperthermie maligne, également causée par des mutations de *CACNA1S* (symptômes décrits dans la partie précédente). Des mutations dominantes et récessives causent des myopathies congénitales, de type centronucléaire ou à « cores » (décrites dans une prochaine partie).

I.2.e La triadine

La triadine est une protéine transmembranaire pouvant être localisée tout au long du RS mais est trouvée plus spécifiquement près du RYR1. Elle est composée d'une partie transmembranaire et d'une longue partie C-terminale cytosolique. Certaines études montrent une interaction entre la triadine et RYR1 ou *CACNA1S* afin de stabiliser la structure de la triade (Caswell et al., 1991). La triadine est également importante pour la régulation du niveau de calcium dans le RS grâce à son interaction avec Calsequestrin, qui lui permet un ancrage près de RYR1. Le pré-ARNm du gène *Triadin* subit un épissage alternatif qui conduit à 4 différents isoformes appelés Trisk 95, Trisk 51, Trisk 49 et Trisk 32. Trisk 51 et Trisk 95 sont les protéines majoritaires dans le muscle squelettique tandis que Trisk 32 est surtout exprimé dans le muscle cardiaque. Les phénotypes d'une souris déficiente en triadine sont une cardiomyopathie et une faiblesse musculaire. De plus, l'étude des biopsies musculaires de la souris montre des défauts typiques d'une myopathie avec défaut des triades. Des mutations dans ce gène ont été identifiées dans une maladie cardiaque impliquant un défaut du CEC.

I.2.f Calsequestrin

Deux isoformes de Calsequestrin (Casq) existent et sont codé par deux gène *Casq1* et *Casq2* (Fliegel et al., 1987; Scott et al., 1988). *Casq1* est majoritairement exprimé dans le muscle squelettique et *Casq2* dans le muscle cardiaque. *Casq1* est localisée dans le RS et plus précisément près de RYR1 grâce à une interaction avec Triadin et Junctine, qui sont localisées dans la membrane. Son rôle est de fixer des molécules de Ca^{2+} libres, afin de regrouper le Ca^{2+}

près de la jonction triadique. Lors de l'activation de RYR1, les molécules de Ca^{2+} se détachent de Casq pour être libéré par RYR1.

La souris déficiente pour *Casq1* est viable et sa caractérisation montre des défauts musculaires de type vacuoles et défauts des triades. De plus, la mesure de Ca^{2+} montre une libération réduite de Ca^{2+} par RYR1, ce qui montre l'importance de Casq dans la régulation de l'homéostasie calcique (Paolini et al., 2007).

Des mutations ont été identifiées dans des patients atteints de myopathies vacuolaires.

I.2.g STAC3

STAC3 a un rôle important pour le couplage excitation-contraction et pour le trafic intracellulaire de CACNA1S, avec qui il interagit (Campiglio and Flucher, 2017; Nelson et al., 2013; Polster et al., 2015). La déficience en *Stac3* chez la souris est létale à la naissance ce qui montre un rôle important de STAC3 dans le développement du muscle (Reinholt et al., 2013). Une mutation faux-sens homozygote a été identifié dans la myopathie amérindienne, qui est caractérisée par une faiblesse musculaire non progressive, une arthrogrypose, faiblesse faciale, scoliose et faiblesse oculaire (Horstick et al., 2013; Stamm et al., 2008a; Stamm et al., 2008b). Les biopsies ne montrent pas quelque chose de spécifique mais des noyaux internalisés sont observables. Les patients sont susceptibles à l'hyperthermie maligne, ce qui montre un lien entre CACNA1S-RYR1-STAC3 dans le mécanisme pathologique de cette maladie. Les études fonctionnelles de la mutation localisée dans le domaine SH3 de STAC3 montrent une réduction du CEC et du trafic membranaire de CACNA1S (Polster et al., 2016).

I.2.h Les autres protéines de la triade

La junctine est une petite protéine transmembranaire avec une partie C-terminale localisée dans le RS. Elle est localisée près de RYR ou elle interagit avec RYR1 et Casq1 pour la régulation de la structure et de la libération de Ca^{2+} (Dulhunty et al., 2009; Wei et al., 2009; Zhang et al., 1997).

Myopathies avec cores		
Myopathie avec central core	AD, AR	récepteur de la ryanodine 1 (<i>RYR1</i>)
	AD	chaîne lourde de la myosine 7 (<i>MYH7</i>)
Myopathie avec multiminicore	AR	sélinoprotéine N (<i>SEPN1</i>)
	AR	récepteur de la ryanodine 1 (<i>RYR1</i>)
Autre myopathie avec désorganisations focale de la structure	AD	α -actine squelettique (<i>ACTA1</i>)
	AD	protéine contenant une double hélice 78 (<i>CCDC78</i>)
	AR	récepteur de la ryanodine 1 (<i>RYR1</i>)
Myopathies avec accumulation de protéines		
Myopathie némaline (myopathie avec bâtonnets)	AD, AR	α -tropomyosine lente (<i>TPM3</i>)
	AD, AR	α -actine squelettique (<i>ACTA1</i>)
	AD	β -tropomyosine (<i>TPM2</i>)
	AD	protéine de la famille BTB/Kelch (<i>KBTBD13</i>)
	AR	nébouline (<i>NEB</i>)
		troponine T lente (<i>TNNT1</i>)
		cofiline 2 (<i>CFL2</i>)
		membre 40 de la famille de type-Kelch (<i>KLH40</i>)
	AR	membre 41 de la famille de type-Kelch (<i>KLH41</i>)
		lelomodine 3 (<i>LMOD3</i>)
AR	<i>MYO18B</i> (<i>Myo18B</i>)	
Myopathie avec "cap"	AD	β -tropomyosine (<i>TPM2</i>)
	AD	α -tropomyosine lente (<i>TPM3</i>)
	sporadique	α -actine squelettique (<i>ACTA1</i>)
Myopathies avec noyaux centraux		
Myopathie myotubulaire	RLX	myotubularine (<i>MTM1</i>)
Myopathie centronucléaire	AD	dynamine 2 (<i>DNM2</i>)
	AD, AR	amphiphysine 2 (<i>BIN1</i>)
	AR	protéine SPEG (<i>SPEG</i>)
Formes rares de myopathies congénitales		
Myopathie avec accumulation de myosine	AD	chaîne lourde de la myosine 7 (<i>MYH7</i>)
Myopathie congénitale avec disproportion du type de fibres	AD	α -actine squelettique (<i>ACTA1</i>)
		α -tropomyosine lente (<i>TPM3</i>)
Myopathie avec déficit en contactine	AR	contactine-1 (<i>CNTN1</i>)
Myopathie sarcotubulaire (avec vacuoles)	AR	ligase de l'ubiquitine (<i>TRIM32</i>)
Myopathies avec anomalie de la myosine	AD, AR	protéine associée à la myosine (<i>MYBPC1</i>)
	AD	chaîne lourde de la myosine de fibre IIa (<i>MYH2</i>)
		chaîne lourde de la myosine périnatale (<i>MYH8</i>)
Myopathie avec corps réducteurs	RLX	protéine FHL1 (<i>FHL1</i>)
Myopathie avec agrégats tubulaires	AD	molécule d'interaction stromale 1 (<i>STIM1</i>)
	AD	<i>ORAI1</i> (<i>ORAI1</i>)
Myopathie avec corps zébrés		α -actine squelettique (<i>ACTA1</i>)
Myopathie congénitale « classique » liée à <i>SCN4A</i>	AR	un canal chlore (<i>SCN4A</i>)

¹ autosomique dominant (AD) ; autosomique récessif (AR) ; récessif lié à l'X(RLX)

Tableau 1. Les myopathies congénitales et les gènes associés.

Les myopathies congénitales sont des maladies musculaires rares apparaissant dès la naissance ou la petite enfance, et plus rarement à l'âge adulte. Les symptômes peuvent inclure une faiblesse musculaire dès la naissance ou l'enfance, avec une faiblesse faciale. Les myopathies congénitales sont des maladies génétiques. Il existe une grande hétérogénéité au sein des myopathies congénitales car des mutations dans un même gène peuvent causer différentes myopathies ainsi qu'une myopathie peut être causée par des mutations dans des gènes différents. On distingue généralement trois grands groupes de myopathies congénitales selon le type d'anomalies de structure retrouvées lors de l'étude de la biopsie musculaire et un quatrième groupe moins classique regroupant plusieurs sous-groupes de myopathies congénitales :

- Les myopathies à « cores »
- Les myopathies à noyaux centraux
- Les myopathies à agrégats protéique ou inclusion
- Les autres myopathies congénitales

Les études histologiques et génétiques montrent que les frontières entre les trois groupes sont plus floues que préalablement pensé (**Tableau 1**).

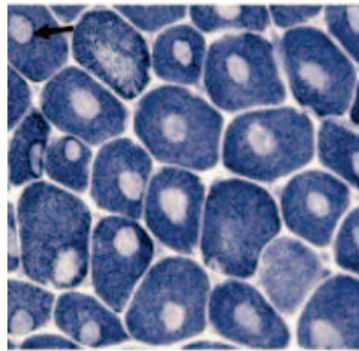
II.1 Les myopathies à « cores »

Les myopathies à « cores » sont caractérisées par la présence de zones anormales appelées cores à l'intérieur de la fibre musculaire. Ces zones correspondent à l'absence d'activité oxydative (absence de mitochondries) et sont détectables par deux colorations histologiques permettant la détection de ces activités, le plus souvent par les colorations SDH ou NADH (Dubowitz and Pearse, 1960). La taille et la localisation de ces cores permettent de distinguer deux sous-groupes : les myopathies à cores centraux (CCD) qui présentent des cores centraux ou latéraux tout au long de la fibre et les myopathies avec multi-minicores qui présentent des cores plus petits et disséminés (**Figure 8**). En pratique, il peut être difficile de distinguer les deux types de « cores » sur les coupes d'histologie. Les myopathies à cores les plus sévères peuvent également présenter en histologie des bâtonnets (Hernandez-Lain et al., 2011; Zvaritch et al., 2009).

Les gènes principalement associés à cette myopathie sont *RYR1*, *SEPNI*, *MEGF10*, *MYH7*, *ACTA1*, *CCDC78*.

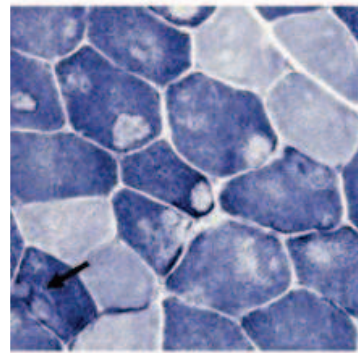
La myopathie CCD associées à des mutations de *RYR1* présente des caractéristiques histologiques particulier, avec des cores au milieu de la fibre. Les symptômes incluent une hypotonie néonatale, une faiblesse musculaire généralisée et une faiblesse faciale et les patients sont susceptibles à l'hyperthermie maligne (Robinson et al., 2002; Shuaib et al., 1987). La majorité des mutations sont dominantes (faux-sens ou défaut d'épissage) mais une ségrégation récessive a également été décrite dans certains cas (Romero et al., 2003). Les mutations sont surtout retrouvées dans la partie C-terminale qui forme le pore calcique de la protéine. Les études fonctionnelles mettent en évidence deux hypothèses : un canal RYR1 ouvert au repos qui laisse sortir du Ca^{2+} du RS (gain de fonction) et d'autres mutations semblent altérer le couplage avec DHPR (perte de fonction) (Avila and Dirksen, 2001; Avila et al., 2001; Dirksen and Avila, 2002; Kraeva et al., 2013). Ces deux hypothèses conduisent à une altération du CEC.

«cores»
détectable en
coloration
« NADH »



Malicdan et al, 2014

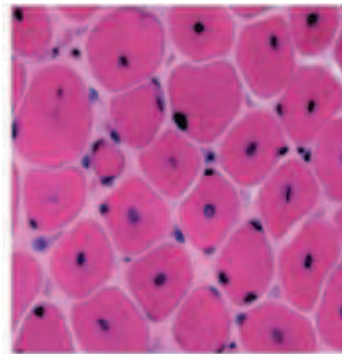
« cores » centraux



Malicdan et al, 2014

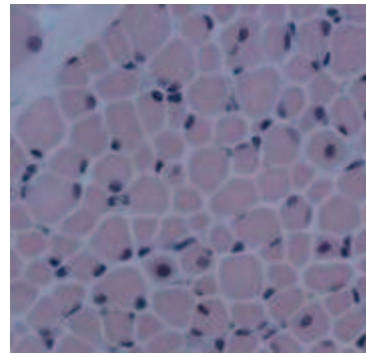
« cores » multiples, en
périphéries et démarcation
imprécise

Noyaux centralisés
détectables par
coloration HE



Nicot et al, 2007

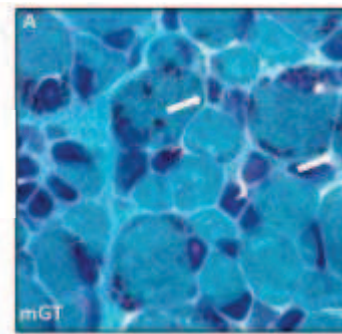
Noyaux centralisés fréquents



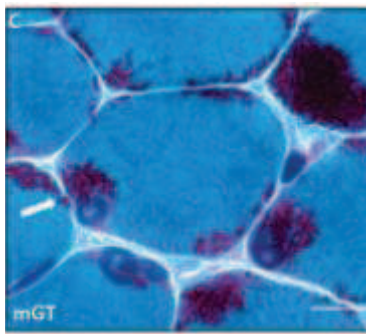
Wilmshurst et al, 2010

Rares noyaux centralisés

Agrégats
protéiques par
coloration GTm



Malfatti et al, 2014



Malfatti et al, 2014

Figure 8. Signes « classiques » des différentes myopathies congénitales observés en histologie. Ces images représentent des exemples. Cependant, si la présence d'anomalies n'est pas nombreuse, ou que la biopsie présente plusieurs signes, les conclusions sont plus difficiles à faire. *NADH* = Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogéné ; *HE* = hématoxyline éosine ; *GTm* = Gomori trichrome modifié

II.2 Les myopathies à noyaux centralisés

Les myopathies à noyaux centralisés (CNM) sont caractérisées par la localisation et une forme anormale des noyaux au centre de la fibre, sans qu'il y ait de preuves de dégénération/régénération de la fibre (**Figure 8**). Les symptômes et la sévérité de la maladie est très variable selon le gène impliqué.

Les gènes principalement associés sont *MTM1*, *BINI*, *DNM2*, *RYR1*, *TTN*, *SPEG*, *MTMR14*. Les différentes CNM peuvent être classifiées selon le gène affecté et la transmission génétique.

Les mutations de *MTM1* sont liées au chromosome X et est la forme la plus sévère de la maladie et les patients affectés présentent une hypotonie néonatale et une faiblesse musculaire généralisée très sévère, des difficultés respiratoires qui peuvent être fatales (McEntagart et al., 2002). Plus de 280 mutations (tronquantes et faux-sens) dans le gène *MTM1* ont été identifiées. *MTM1* code pour la myoptubularin, une phosphatase importante pour le remodelage des membranes. Les mécanismes pathologiques incluent une réduction de la quantité de la protéine ou une altération de son site catalytique qui conduit à une dérégulation du métabolisme des phosphoinositides et à une désorganisation de la triade (Dowling et al., 2009). La déficience de *MTM1* conduit également à un CEC réduit et à une diminution de la quantité des protéines RYR1 et CACNA1S (Al-Qusairi et al., 2009).

Les mutations de *BINI* peuvent être transmises de façon récessive et dominante. Les symptômes incluent une faiblesse musculaire proximal (plus sévère dans les cas récessifs), une faiblesse faciale et parfois des défauts respiratoires. La maladie débute à l'enfance dans les cas récessifs et chez l'adulte dans les cas dominants (Bohm et al., 2013b; Bohm et al., 2010; Claeys et al., 2010; Nicot et al., 2007). Les caractéristiques histologiques sont des noyaux centralisés, une atrophie, une prédominance de fibre de type I (Romero, 2010). *BINI* code pour l'amphiphysin-2, une protéine importante pour le remodelage et la courbature des membranes. L'impact des mutations dépend de la localisation des variants et peuvent altérer la localisation de l'amphiphysin-2, la tubulation des membranes et le recrutement de son partenaire dynamin-

2. Ces défauts conduisent à une altération de la structure des triades (Nicot et al., 2007; Toussaint et al., 2011).

Les mutations de *DNM2* sont impliquées dans une myopathie dominante caractérisée par une faiblesse musculaire progressive avec des défauts extraoculaires dans certains cas. L'âge d'apparition de la maladie est variable, de la naissance à l'âge adulte et la sévérité est également variable. Les caractéristiques histologiques sont des noyaux centralisés, une prédominance de fibres de type I, une inégalité de taille de fibres et distribution anormale du sarcoplasme autour du noyau (« en rayon de roue »). *DNM2* code pour la dynamin-2, une GTPase impliquée dans la fission des membranes. Les mutations faux-sens identifiées dans *DNM2* cause une augmentation de l'activité GTPase conduisant à des défauts de tubulation des membranes, à des défauts de la structure de la triade et à un CEC réduit (Bitoun et al., 2005; Bohm et al., 2012; Cowling et al., 2011; Gibbs et al., 2014; Wang et al., 2010).

Des mutations récessives de *RYR1* conduisent à une myopathie centronucléaire. Les symptômes sont une faiblesse musculaire axiale progressive et parfois des défauts extraoculaires (Bevilacqua et al., 2011; Jungbluth et al., 2007; Wilmshurst et al., 2010). Les mutations récessives conduisent à une diminution du niveau protéique de *RYR1* associé à une diminution de niveau protéique de son partenaire *CACNA1S* (Zhou et al., 2013).

II.3 Les myopathies à agrégats ou inclusion protéique (myopathies à némaline)

Les myopathies à agrégats ou inclusion (appelées aussi myopathies à némaline) sont caractérisées par la présence d'accumulation anormales de protéines et présentent plusieurs sous-groupes. Les symptômes sont variables mais incluent une faiblesse musculaire proximal, une insuffisance respiratoire, une faiblesse faciale et la sévérité de la maladie est variable avec des cas néonataux très sévères et cas moins sévères retrouvés chez l'adulte (Ryan et al., 2001).

Les myopathies à bâtonnets présentent des agrégats protéiques ressemblant à des bâtonnets, dans le sarcoplasme ou même dans les noyaux et les myopathies avec cap sont caractérisées par la présence de structure en forme de capuchons localisées à la périphérie des fibres (**Figure 8**). Les gènes mutés associés à ce groupe sont *ACTA1*, *NEB*, *TPM3*, *TPM2*, *TNNT1*, *CLF2*, *KBTBD13*, *MYO18B*, *LMOD3*, *KLH40* et *KLH41*.

Beaucoup de gènes sont impliqués dans ce type de myopathie et les conclusions liées à ces études est que cette myopathie est due à des défauts des protéines sarcomériques ou dans le développement des myofibrilles.

II.4 Les autres myopathies congénitales

D'autres myopathies sont également classées dans les myopathies congénitales mais n'ont pas été classés dans un des groupes discutés préalablement et sont plus rares (**Tableau 1**).

Les myopathies à agrégats tubulaires (TAM) sont dues à des mutations dominantes dans les gènes *ORAI1* et *STIM1* et le mécanisme pathologique est un excès d'influx calcique de l'extérieur des cellules vers le cytosol par le canal calcique ORAI1 (Bohm et al., 2017; Bohm et al., 2013a). Ces myopathies conduisent à un défaut de l'homéostasie calcique par un mécanisme différent de l'excès de calcium observé dans les myopathies causées par des mutations de *RYR1*, pour lesquels l'excès de calcium dans le cytosol provient du RS.

III. La balance redox dans le muscle

Des mutations dans plusieurs gènes impliqués dans la balance redox ont été identifiés comme cause de maladies musculaires, dont des myopathies. Cela montre l'importance de cette balance dans le bon fonctionnement du muscle.

III.1 Le stress oxydatif et la balance redox

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) comprennent des radicaux libres de type anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle (HO^\cdot) et des espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et leur formation est un processus normal physiologique (Droge, 2002). Ces ERO sont produites en permanence mais leur formation augmente jusqu'à 100 fois durant les contractions musculaires (Barbieri and Sestili, 2012). Les ERO sont produits majoritairement au niveau des mitochondries mais les réactions peuvent également avoir lieu dans le cytosol et près des membranes plasmique, du RS ou du tubule T (Balaban et al., 2005;

Powers and Jackson, 2008). La production de ces ERO est important pour la cellule car elles participent à des voies de signalisation essentielle de type MAP kinase ou NF-kB (Gomez-Cabrera et al., 2008).

Le stress oxydatif est un processus qui se met en place quand la balance redox est dérégulée et qu'il y a un excès d'ERO dans la cellule (Barouki, 2006). En effet, la surproduction d'ERO est toxique pour la cellule car cela peut entraîner une oxydation des protéines, lipides et ADN (Cadet et al., 1999). Pour prévenir ce stress oxydatif, plusieurs enzymes (superoxydes dismutases, catalases, peroxydases) dans la cellule vont permettre de dégrader ces ERO en excès et de réguler la balance redox.

III.2 Les pathologies musculaires associant un défaut de la balance redox

Certaines études montrent que le vieillissement est accompagné par un stress oxydatif et conduit à des défauts musculaires importants (Barouki, 2006; Canton et al., 2014; Gianni et al., 2004; Lawler, 2011; Terrill et al., 2013; Williams and Allen, 2007). Les défauts musculaires incluent des défauts membranaires et une atrophie lors du vieillissement.

Parmi les pathologies musculaires, le stress oxydatif a un rôle important dans la dégénération des cellules musculaires dans les dystrophies musculaires (Canton et al., 2014; Lawler, 2011; Terrill et al., 2013; Williams and Allen, 2007). Le stress oxydatif est également impliqué dans les myopathies congénitales associées à *RYR1* et *SEPNI* (Arbogast et al., 2009; Dowling et al., 2012; Giulivi et al., 2011; Juryneec et al., 2008). L'hypothèse principale proposée est un excès de calcium dans le cytosol qui induit la production d'ERO par les mitochondries mais des expériences fonctionnelles sont à faire afin de caractériser les mécanismes liant les défauts de RYR1 et le stress oxydatif. Des approches thérapeutiques utilisant l'antioxydant N-acetylcysteine (NAC) améliorent nettement les défauts histologiques du muscle dans le poisson-zèbre *ryr-1* (Dowling et al., 2012).

IV. Diagnostic moléculaire des myopathies congénitales

IV.1 Génétique des maladies rares

Une maladie rare touche moins d'une personne sur 2000. Il existe plus de 6000 maladies rares, dont 200 maladies neuromusculaires, et la majorité ont une origine génétique.

Le génome humain entier a été déterminé en 2001 après 12 ans et couté plusieurs milliards de dollars dans le cadre du projet « Human Genome Project » (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001). Le génome humain est composé de 22 paires de chromosomes autosomiques et 2 chromosomes sexuels (XX ou XY) et composé de 3 milliards de paires de bases, dont environ 23 000 gènes, présents sur moins de 3% du génome.

Lors du diagnostic moléculaire d'un patient, cette séquence est utilisée comme génome de référence (GRCh37/hg19). Durant ma thèse, je vais appeler « variant » chaque différence observée entre la séquence d'un patient et cette séquence de référence. Je parle de « mutation » lorsque le variant en question a été validé comme étant « pathogénique ». Un polymorphisme est un variant qui est présent dans plus de 1% de la population.

Dans les myopathies congénitales, nous retrouvons majoritairement une transmission des mutations de manière mendélienne. Un seul gène est transmis de manière autosomique dominant, autosomique récessif ou lié à un chromosome sexuel. La mutation peut également apparaître dans les gamètes ce qui conduit à une mutation « *de novo* », qui n'est pas présente chez les parents. Il peut également y avoir des mutations mosaïques, qui ont eu lieu lors du développement embryonnaire et conduisent à la présence de la mutation seulement dans certaines cellules de l'individu.

IV.2 Méthodes classiques de recherches de mutations

La méthode classique de recherche de mutations est une recherche « gène par gène ». Celle-ci se base sur les données cliniques et histologiques et selon les classes de myopathies afin d'avoir une liste de gènes candidats à tester. Les gènes en question sont amplifiés par PCR à partir d'ADN du patient et séquencé par la technique de Sanger. Le plus gros challenge est le fait que la génétique de ces maladies est très hétérogène, ce qui rend difficile un choix restreint de gènes. De plus, plusieurs des gènes déjà connus comme *TTN*, *NEB* ou *RYR1* sont des gènes

très grands et ne sont pas toujours totalement séquencés à cause de leur taille et de la difficulté à séquencer certaines régions répétées. Cependant, lorsqu'aucun gène candidat n'a de mutation chez les patients étudiés, il est nécessaire de chercher d'autres gènes.

Différentes techniques peuvent être utilisées afin de déterminer la localisation chromosomique des gènes impliqués dans la mutation lorsque l'on a l'ADN de plusieurs personnes de la famille

Les analyses de liaisons permettent de localiser les régions chromosomiques qui sont transmises entre plusieurs individus de liens. La stratégie utilisée est basée sur la co-ségrégation de certains marqueurs polymorphiques avec le gène impliqué dans la maladie (présents dans des régions chromosomiques proches). Les marqueurs utilisés peuvent être des microsatellites (séquences de 2 à 10 bases répétées) car ils sont présents tout le long du génome dans les introns et exons (Dib et al., 1996; Wheeler et al., 2008). La comparaison des différents marqueurs entre les individus permet de définir une ou plusieurs régions qui ségrégent entre les individus. Cette technique est utile dans les familles où l'on connaît le mode de ségrégation.

La cartographie par homozygotie fonctionne sur le même principe que l'analyse de liaison. Cette méthode est utile dans les familles consanguines dans lesquelles on suspecte une mutation homozygote. Cela permet de définir les régions du génome qui sont homozygotes et présents chez tous les individus atteints. Ces régions contiennent le gène impliqué dans la maladie.

Les analyses de variations du nombre de copies dans l'ADN peuvent se faire grâce à la technique de puce d'hybridation génomique comparative. Les ADN du patient et un ADN contrôle sont marqués par différents fluorochromes et hybridés sur des puces qui contiennent des fragments génomiques cibles. La fluorescence est détectée et analysée afin d'identifier des délétions ou duplications dans le génome.

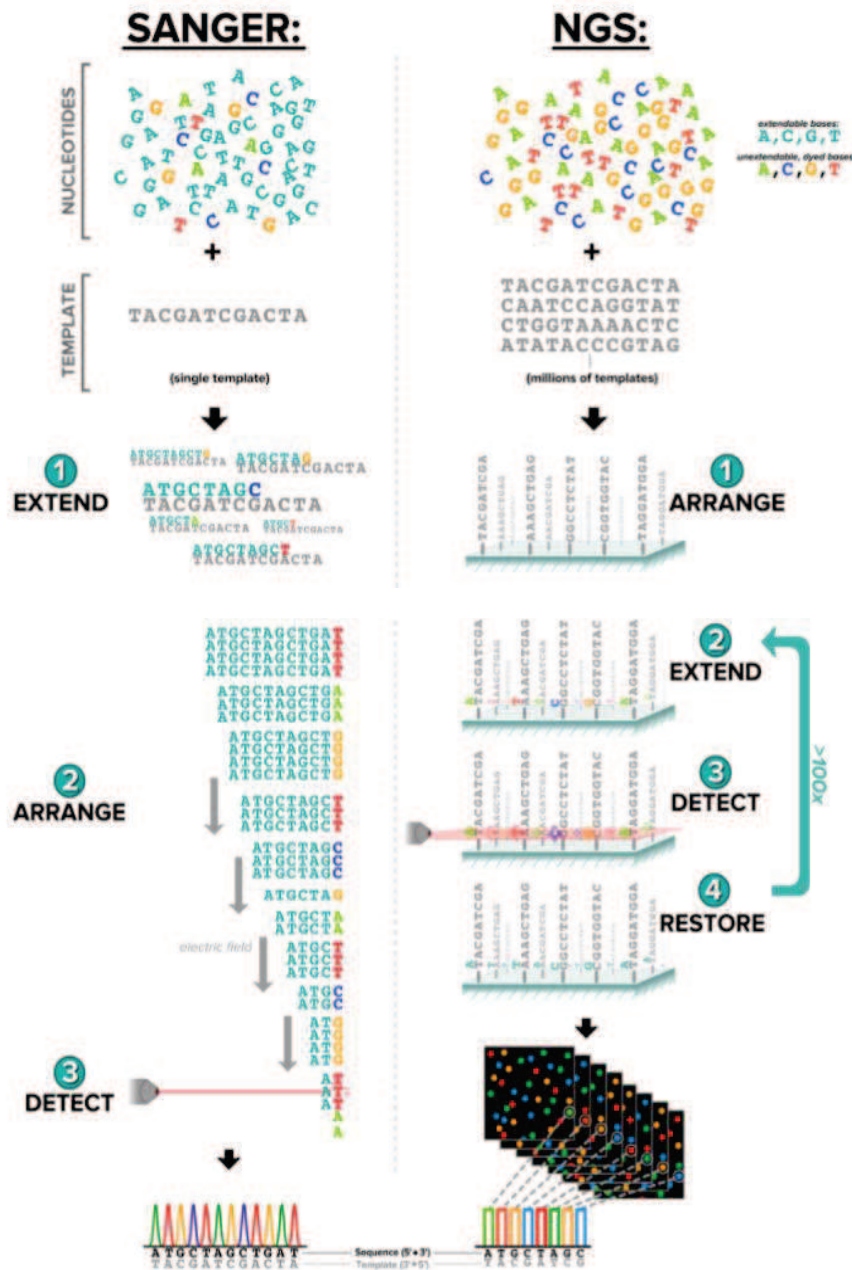
Ces différentes techniques permettent d'identifier une région d'intérêt dans une famille comprenant plusieurs affectés. Cependant, chaque région peut être assez grande selon la technique utilisée et comprendre plusieurs dizaines ou centaines de gènes. Chaque gène d'intérêt doit ensuite être séquencé par la méthode Sanger pour identifier une mutation. C'est un travail

qui peut donc demander beaucoup de temps et d'argent. De plus, pour des cas sporadiques, la ségrégation n'est pas connue donc la comparaison entre plusieurs individus de la même famille n'est pas possible. Dans ces cas-là d'autres techniques sont à envisager, comme le séquençage de nouvelle génération qui est en plein essor.

IV.3 Séquençage de nouvelle génération

IV.3.a Introduction au séquençage

. Les méthodes classiques de recherche de gènes peuvent prendre beaucoup de temps et d'argent. Il est nécessaire de chercher de nouvelles techniques. En 2008, le premier génome entier d'un individu a été obtenu grâce au séquençage de nouvelle génération (SNG)(Wheeler et al., 2008). Depuis, les techniques ont évolué et le séquençage à haut débit permet de séquencer un génome entier de plus en plus rapidement et de moins en moins cher. Le séquençage à haut débit peut être utilisé de différentes manières. Pour la recherche de nouveaux gènes, le génome entier ou seulement les exons peuvent être séquencés. Dans les cas du séquençage d'exons, il y a une étape supplémentaire d'enrichissement des séquences exoniques. Le SNG peut également être utilisé pour séquencer l'ARN, utile pour la recherche de différents transcrits chez un patient par exemple.



D'après Muzzey et al 2015

Figure 9. Différentes étapes entre le séquençage par la technique de Sanger et par un séquenceur de nouvelle génération

La stratégie du séquençage de l'ADN dans la technique de Sanger et dans le SNG est l'ajout de bases modifiées marquées avec un fluorochrome lors de l'amplification ; 4 couleurs différents pour chacune des 4 bases A, T, G ou C.

Pour la technique de Sanger, l'ajout de cette base modifiée stoppe l'amplification et conduit à un brin d'ADN d'une longueur unique et marqué selon la dernière base incorporée. Les brins sont ensuite séparés par électrophorèse et l'analyse des signaux fluorescents selon la taille du brin nous indique la séquence. La longueur d'un brin amplifié par Sanger est de 500 à 1000 bases.

Pour la technique de SNG, les bases modifiées permettent l'élongation en continue. Les brins d'ADN sont attachés sur un support et à chaque base incorporée, la fluorescence est mesurée. Chaque brin amplifié est appelé un « read », et mesure en général moins de 100-250 bases.

La stratégie de séquençage est similaire entre les deux techniques même si les étapes ne sont pas faites dans le même ordre (**Figure 9**). De plus, l'amplification de milliers de brins se fait en même temps et la réaction de SNG peut conduire à plus de 250 millions de « reads ».

IV.3.b Différentes étapes de l'analyse des données de SNG

Il y a différentes étapes entre la réaction de séquençage et l'analyse des données.

Les signaux fluorescents détectés par le séquenceur sont les données brutes qui vont être transformés en séquences. Ensuite, chaque « read » est aligné au génome humain de référence grâce à un logiciel d'alignement (dans notre cas, Burrows-Wheeler). Le nombre de « reads » alignés à un endroit précis est appelé profondeur de lecture ou couverture. Ensuite, un logiciel spécifique est utilisé pour détecter toutes les variations que ce soit des SNP, délétions ou insertions par rapport au génome de référence (dans notre cas, SAMtools) (**Figure 10**).



Figure 10. Schéma de l'alignement de reads obtenus par SNG. L'alignement des reads sur le génome de référence se fait grâce à un logiciel bio-informatique, La profondeur de lecture est le nombre de reads alignés à une position donnée. Des logiciels recherchent ensuite les différences par rapport à la séquence de référence : les variations d'un seul nucléotide, et les petites délétions ou duplication,

POPULATION	DESCRIPTION	GENOMES	EXOMES	TOTAL
AFR	African/African American	4,368	7,652	12,020
AMR	Admixed American	419	16,791	17,210
ASJ	Ashkenazi Jewish	151	4,925	5,076
EAS	East Asian	811	8,624	9,435
FIN	Finnish	1,747	11,150	12,897
NFE	Non-Finnish European	7,509	55,860	63,369
SAS	South Asian	0	15,391	15,391
OTH	Other (population not assigned)	491	2,743	3,234
	Total	15,496	123,136	138,632

Tableau 2. Origine ethnique des personnes dont les données d'exomes ou de génomes sont disponibles dans la bases de données gnomAD (<http://gnomad.broadinstitute.org/>).

A partir de ces données, il est possible d'annoter et filtrer les variants. Différents outils bio-informatique peuvent être utilisés. Par exemple, dans mon cas, un des outils bio-informatiques utilisés s'appelle Varank et a été développé à Strasbourg (Geoffroy et al., 2015). Il utilise les fichiers contenant les variants bruts obtenus après séquençage ; et permet l'annotation rapide des variant en utilisant différents logiciels d'annotation et prédiction (comme Alamut, qui regroupe les résultats de plusieurs sites de prédiction). L'annotation est très variée et permet d'annoter chaque variant avec l'impact du au niveau protéique et cDNA, la fréquence dans la population générale, l'impact sur l'épissage, l'implication du gène muté dans une autre maladie. L'outil permet également la détection de faux positif grâce à l'analyse des données de séquençage (profondeur de lecture, couverture, détection du variant).

IV.4 Séquençage à haut débit pour le diagnostic et la recherche

Il y a deux moyens d'utiliser le SNG. La première manière est un SNG non spécifique ou l'on va séquencer « tous » les exomes ou « tout » le génome d'un individu dans le cadre de la recherche de variants. Il est important de noter qu'il restera des régions non séquencées. En effet, certaines parties du génome ne se séquent pas très bien à cause d'une forte concentration en bases G ou C (souvent les premiers exons d'un gènes) ou à des séquences très riches des répétitions. L'autre manière est de faire du SNG « ciblé », pouvant être appliqué au diagnostic. Pour une maladie donnée, on peut choisir au préalable plusieurs gènes impliqués et enrichir la préparation de ces gènes-là.

Grâce au développement de ces méthodes de séquençage il est estimé qu'environ 1 million de personne ont leur génome ou exome séquencé mais seulement une partie est en libre accès. En effet, il existe des bases de données de séquençage de la population. La plus grande librairie est gnomAD (<http://gnomad.broadinstitute.org/>). Il comprend les données d'exomes de 123 136 personnes et les données de génome de 15 496 personnes. Cette base de données peut être très utile afin de connaître la fréquence d'un variant étudié, notamment lorsqu'on suspecte une ségrégation dominante. Les origines ethniques de ces données sont assez variées (**Tableau**

2) mais ne comprennent pas toutes les populations donc il faut être prudent lors de l'analyse de patients ayant une origine non présente dans gnomAD.

Résultats

I. Contexte de mon projet de recherche

I.1 Bases génétiques des myopathies congénitales

Comme introduit précédemment, le groupe des myopathies congénitales est très hétérogène sur plan génétique et histologique. Le diagnostic se fait en premier lieu par l'étude des données cliniques et histologiques permettant de déterminer la classe de myopathie puis par séquençage des gènes connus de myopathie pour identifier le gène impliqué dans la maladie. Les gènes connus dans les myopathies congénitales sont variés et comprennent par exemple pour les CNM, les gènes *MTM1*, *BINI*, *DNM2*, *TTN*, *RYR1*, *CCDC78*, *SPEG* et pour les CCD, les gènes *RYR1*, *SEPNI*, *ACTA1*, *MYH7*, *MEGF10*.

I.2 Question biologique : Identification de nouveaux gènes de myopathies

Le diagnostic moléculaire est essentiel pour les patients afin de leur permettre une bonne prise en charge, un conseil génétique et un accès à des thérapies existantes ou en développement. Cependant, près de la moitié des patients n'a toujours pas de diagnostic moléculaire et cela suggère l'implication d'autres gènes de myopathies. Le but de ce projet était donc d'identifier de nouveaux gènes de myopathies.

Ce projet présente des enjeux médicaux et sociétaux pour les patients et leur famille mais également des enjeux scientifiques dans la compréhension des mécanismes pathologiques de ces maladies et de nouvelles voies impliquées dans la physiologie du muscle en général.

I.3 Myocapture : un consortium français

Afin d'identifier des nouveaux gènes de myopathies, le projet français « Myocapture » a été mis en place par l'équipe de Jocelyn Laporte et par plusieurs équipes de recherche françaises en collaboration avec le centre national de génotypage (CNG). Chaque équipe est experte dans un type de myopathie (notre équipe : myopathies congénitales) et nous travaillons avec les cliniciens et des experts en histopathologie des myopathies. L'objectif était de séquencer 1000 exomes de patients atteints de différents types de myopathies et de leurs apparentés sains.

I.4 Séquençage haut-débit et traitement des données

Le séquençage a été effectué au CNG par une technique d'enrichissement des exons en utilisant la librairie d'Agilent « SureSelect Human all Exon 50Mb capture library v5 » et le séquençage a été effectué par le séquenceur Illumina HiSeq2500. Les données brutes (fichiers « fastq ») ont ensuite été analysées et alignées contre le génome de référence GRCh37/hg19 (fichiers « bam ») et l'extraction des variants a été faite par le logiciel SAMtools (fichiers « vcf »). A partir des fichiers de variants « vcf », l'annotation et le filtre des variants a été fait à l'aide du logiciel VaRank en collaboration entre notre équipe et un bioinformaticien (Geoffroy et al., 2015). Le filtre nous permet de garder uniquement les variants :

- Qui ont une profondeur de lecture supérieure à 10 et qui représentent au moins 25 % de la totalité des reads (1 variant pour 4 bases lues)
- Qui sont rares (fréquence < 0.5%) dans les bases de données publiques (EVS, ExAC, gnomAD, ...) et rares (< 10 hétérozygote et < 3 homozygote) dans notre base de données interne d'exomes (350 exomes à mon arrivée ; et maintenant 1662 exomes)
- Selon la ségrégation lorsque les exomes des parents sont disponibles : variants liés au chromosome X, variants *de novo*, variants dominants, variants récessifs homozygote ou hétérozygotes composite.

Lorsque les variants sont filtrés, il reste entre 0 et 1000 variants / patient selon la ségrégation étudiée. Le classement des variants par pertinence est réalisé :

- Selon un score attribué par VaRank (du variant prédit le plus pathogénique au moins pathogénique) en tenant compte des données disponibles dans ClinVar, et des prédictions d'impact sur l'épissage et/ou sur la protéine)
- L'expression dans le muscle
- D'autres données telles que le pourcentage de mutation tronquante observé dans le gène dans les bases de données des contrôles non myopathes (liste complète des annotations dans le **tableau 3**).

Lors de mon arrivée dans l'équipe, j'ai participé à l'analyse génétique d'une partie des données d'exomes de notre cohorte « myopathies congénitales ». Pour les cas que j'ai analysés, j'ai utilisé une stratégie « famille par famille » ; c'est-à-dire que je recherchais les meilleurs gènes candidats dans chaque famille dont les exomes avaient été séquencés.

Après l'analyse génétique, je me suis concentrée plus particulièrement sur l'étude de deux gènes identifiés dans deux cohortes homogènes.

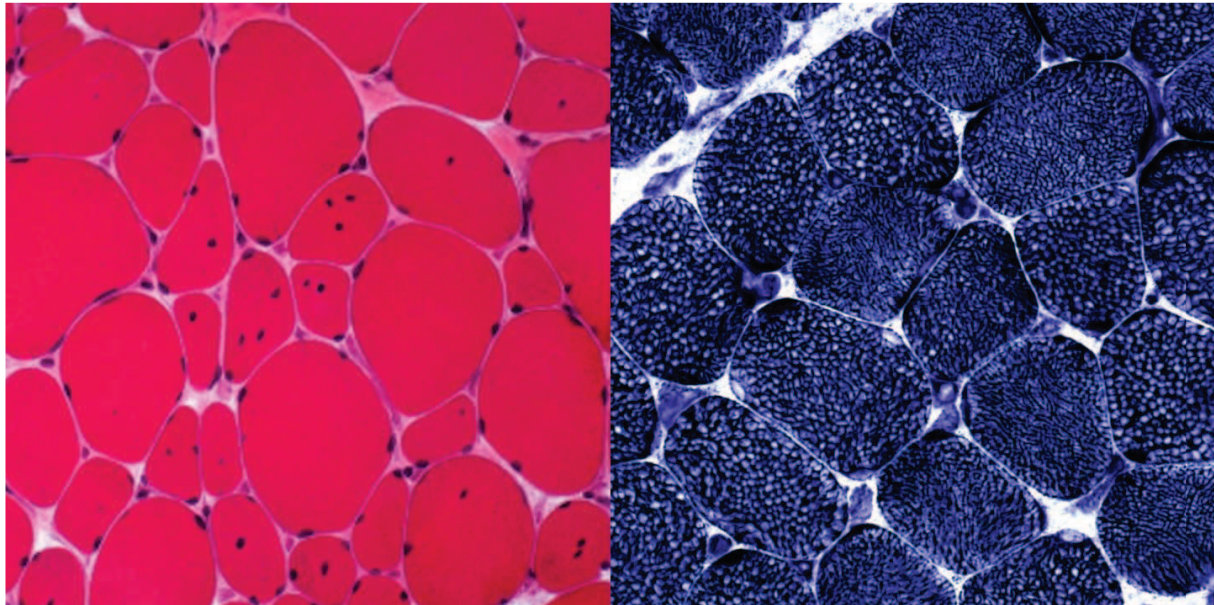
La première cohorte homogène de 4 familles avait une caractéristique histologique commune : un aspect « alvéolaire » des fibres, et des caractéristiques de CNM et CCD. Les gènes connus de CNM (*MTM1*, *BINI*, *DNM2*) avaient été exclus et les gènes connus de CCD (*RYR1* et *SEPN1*) ont été entièrement exclus pour deux familles. Parmi les gènes candidats identifiés, j'ai identifié un gène qui était muté dans ces quatre familles.

J'ai également travaillé sur un gène qui a été identifié dans une famille de notre cohorte et quatre familles rapportées par des collaborateurs. Cette deuxième cohorte homogène correspondait à un type de myopathie non définie car elle incluait des spécificités communes aux CNM, CCD et NM. Les gènes exclus incluaient *ACTA1*, *TPM2*, *TPM3*, *RYR1*, *BINI*.

II. Cohorte 1 : myopathie avec noyaux internalisés et « cores »

Publication : « Dihydropyridine receptor (DHPR, CACNA1S) congenital myopathy. »

La première cohorte analysée est composée de 11 patients dans 7 familles non apparentées. Quatre familles étaient incluses dans le projet myocapture et 3 familles ont été rapportées et analysées par différents collaborateurs. Les symptômes cliniques sont similaires entre tous les patients et comprennent différents signes de myopathies congénitales. Les symptômes apparaissent à la naissance ou très tôt dans l'enfance. Nous retrouvons chez tous les patients une hypotonie néonatale, une faiblesse musculaire progressive, un défaut de déglutition, une faiblesse faciale et pas d'atteinte cardiaque. Chez certains patients seulement, nous pouvons observer une atteinte respiratoire (1 patient), une ophtalmoplégie (4 patients), un niveau de créatine kinase (CPK) élevé (2 patients) ou des symptômes de paralysie périodique (1 patient). Nous avons majoritairement collaboré avec l'équipe de Dr Norma Romero (Institut de Myologie, Paris) pour caractériser les défauts histologiques des patients de cette cohorte. L'étude des biopsies musculaires a montré des régions de désorganisations focales, similaires à des « cores », des noyaux internalisés ou centralisés, parfois un profil dystrophique et surtout un aspect caractéristique « alvéolaire » en coloration NADH (Figure 11). L'étude des biopsies en microscopie électronique montre une dilation du réticulum sarcoplasmique autour des myofibrilles, ce qui suggère que cette dilation cause le profil alvéolaire observé en histologie. Malgré ce défaut, nous pouvons observer une structure de la jonction triadique qui semble intacte car les « pieds » de RYR1 encore présent entre le RS et le tubule T. Ces résultats montrent que le profil histologique est homogène et spécifique dans cette cohorte.



Photos de Norma Romero

Figure 11. Exemple d'histologie de biopsie musculaire de la cohorte 1 (*CACNA1S*). A gauche, inégalité de taille des fibres et noyaux centralisés (coloration HE). A droite, aspect « alvéolaire » des fibres (coloration NADH).

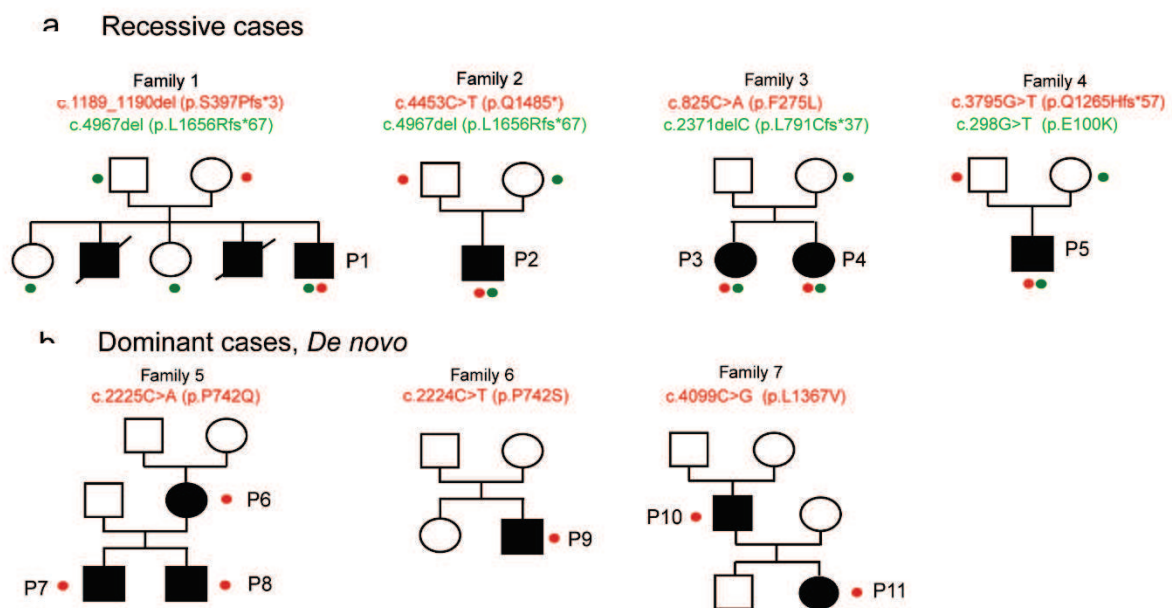


Figure 12. Arbres généalogiques de la cohorte 1 et mutations identifiées.

II.1 Analyse génétique

Parmi les 4 familles présentes dans la cohorte « Myocapture » que j'ai analysé, 1 famille montrait une ségrégation dominante (famille 5) et les 3 autres cas étaient sporadiques (seul un enfant était atteint dans les familles 1, 2 et 6) (**Figure 12**).

Les deux premiers cas sont des patients sporadiques, avec parents et fratrie non atteints donc plusieurs types de ségrégation pouvaient être envisagés. Pour le premier cas (P2), le séquençage n'a été effectué que pour le patient donc j'ai réalisé les analyses de ségrégation des différents variants potentiellement pathologiques par séquence Sanger dans la famille. Le nombre total de variants chez ce patient était de 459. Parmi ces variants se trouvaient 0 homozygote, 1 variant lié au chromosome X, 10 variants hétérozygotes composites (5 gènes). Pour le deuxième cas (P1), j'ai pu faire une analyse « en trio » grâce aux données d'exomes de ses parents. Parmi les variants potentiellement pathologiques se trouvaient 0 variant homozygote, 3 variants liés au chromosome X, 2 variants *de novo*, 4 variants hétérozygotes composites (2 gènes).

Le meilleur gène candidat chez ces deux familles était *CACNA1S* car il s'agissait d'un gène déjà connu dans d'autres pathologies musculaires (hyperthermie maligne et paralysie périodique hypokaliémique) ; et que ce gène code pour la protéine majeure de DHPR, qui interagit avec RYR1, impliqué dans des myopathies congénitales. Les deux variants trouvés chez P2 sont un non-sens conduisant à un codon stop prématuré c.4453C>T (p.Gln1485*, exon 37) et une délétion d'un nucléotide conduisant au décalage du cadre de lecture c.4967del (p.Leu1656Argfs*67, exon 40). P1 est porteur de d'une délétion de 2 nucléotides conduisant au décalage du cadre de lecture c.1189_1190del (p.Ser397Profs*3, exon 9) et une délétion d'un nucléotide conduisant au décalage du cadre de lecture c.4967del (p.Leu1656Argfs*67, exon 40). Ces variants sont absents des bases de données publiques et la ségrégation est récessive, les parents sont chacun porteur sain d'un variant. Les deux patients sont porteurs du même variant dans l'exon 40 mais n'ont pas la même origine ethnique. Nous avons tout de même vérifié si les familles étaient apparentées et avons montré que les haplotypes pour 4 marqueurs microsatellites étaient différents de part et d'autre du variant. Cela suggère que ce variant n'est

pas un polymorphisme rare présent dans une petite population et conforte l'idée que ce variant est une mutation pathogénique.

CACNAIS étant un bon gène candidat par sa fonction et par la présence de variants prédits pathogéniques dans deux familles, j'ai recherché d'autres patients potentiellement affectés par des mutations dans ce gène. J'ai fait une recherche « gène par gène » dans notre base de données de 1662 exomes afin d'obtenir la liste de tous les variants présents dans ce gène ainsi que les individus portant ces variants.

Je n'ai pas trouvé d'autres patients présentant deux variants tronquants, mais en revanche, j'ai observé deux patients chacun porteur d'un seul variant rare tronquant. Afin de vérifier si ces deux patients étaient porteurs d'une deuxième mutation non identifiée par l'analyse bio-informatique comme un variant non détecté par les logiciels de recherche de variants ou une grande délétion, j'ai ré analysé les fichiers « bam ». Les exons étaient bien couverts par le séquençage et aucun autre variant n'était présent. De plus, un patient possédait déjà un diagnostic moléculaire et le deuxième patient était atteint d'une myopathie avec des caractéristiques histologiques tout à fait différents de notre cohorte. En conclusion, ces deux patients sont probablement porteurs sains de ces variants tronquants. Je n'ai pas trouvé d'autres patients porteurs de deux mutations tronquantes dans notre cohorte.

J'ai recherché ensuite des patients porteurs de variants rares prédits pathogéniques et j'ai identifié deux variants faux-sens hétérozygotes affectant le même acide aminé. Le premier variant faux-sens hétérozygote c.2225C>A (p.Pro742Gln, exon 16) est présent chez plusieurs patients d'une même famille dominante (P6 : une mère et P7, P8 : ses deux enfants). L'analyse génétique de cette famille avait mis en évidence 25 variants autosomiques dominants et 2 variants liés à l'X communs à tous les affectés et absent chez le père sain. *CACNAIS* est le meilleur gène candidat dans cette famille.

Variant (génomique)	Variant (protéine)	Effet	Exon	Patients
1_201012489_A_-	p.Leu1656Argfs*67	Décalage du cadre de lecture	40	P1 et P2
1_201016743_G_A	p.Gln1485*	Non-sens	37	P2
1_201054120_CT_-	p.Ser397Profs*3	Décalage du cadre de lecture	9	P1
1_201041886_G_A	p.Pro742Ser	Faux-sens	16	P9
1_201041885_G_T	p.Pro742Gln	Faux-sens	16	P6, P7 et P8
1_201058461_G_T	p.Phe275Leu	Faux-sens	6	P3 et P4
1_201038719_G_-	p.Leu 791Cysfs*37	Décalage du cadre de lecture	18	P3 et P4
1_201063110_C_T	p.Glu100Lys	Faux-sens	3	P5
1_201022587_C_A	p.Gln1265Hisfs*57	Décalage du cadre de lecture	30	P5
1_201020126_G_C	p.Leu1367Val	Faux-sens	33	P10 et P11

Notre cohorte (P1-P9)
 Collaborateurs (P3, P4, P5, P10, P11)

Tableau 4 : Identification de 10 variants rares du gène *CACNA1S* dans une cohorte de 11 patients atteints de myopathie congénitale

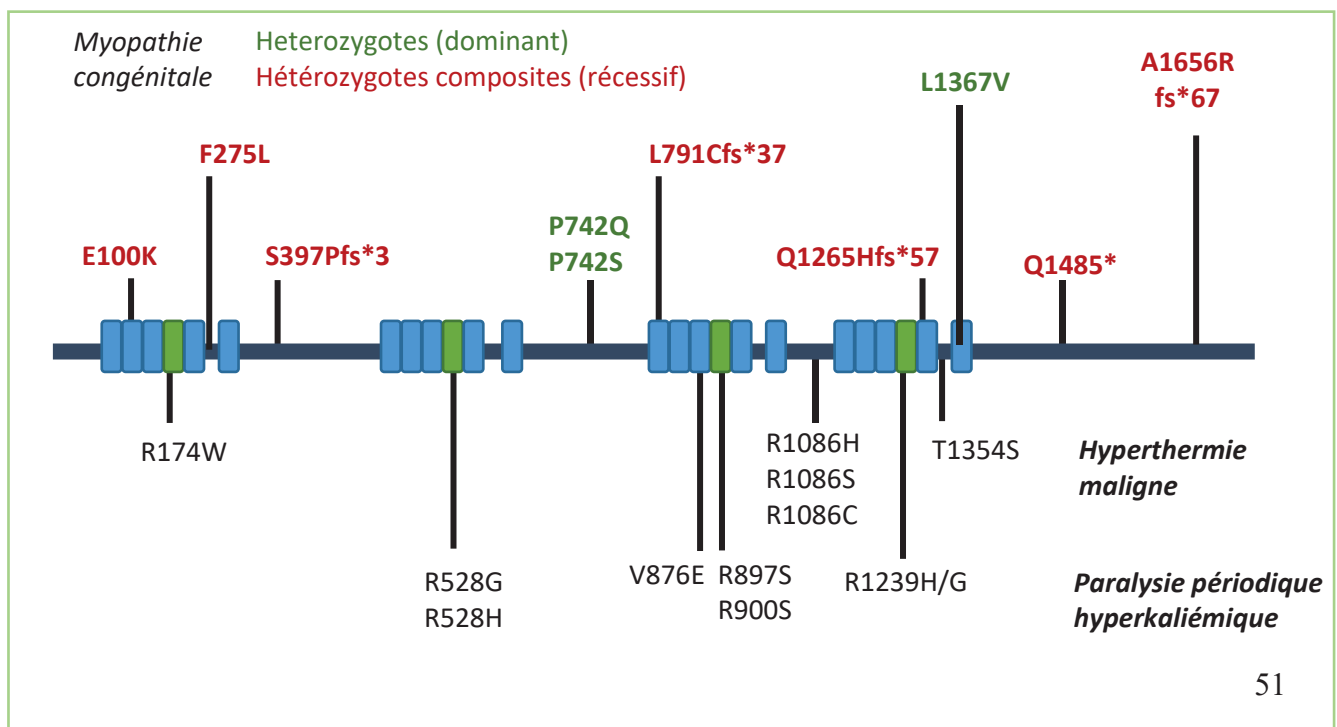


Figure 13 : Représentation schématique de la localisation des variants pathogéniques de *CACNA1S*.

Le deuxième variant faux-sens hétérozygote a été identifié dans un patient sporadique P9 (les parents et fratrie non atteints). Ce variant est différent mais affecte le même acide aminé c.2224C>T (p.Pro742Ser, exon 16) et a été trouvé comme *de novo* (absent chez les parents et fratrie). L'analyse génétique du patient et de ses parents indiquait 4 variants sur le chromosome X, 2 variants de novo, 16 variants hétérozygotes composites et 0 variants homozygotes. CACNA1S était le meilleur gène candidat. La proline 742, muté dans les deux familles, est un acide aminé important et critique pour la fonction de CACNA1S. De plus, aucun variant dans cet acide aminé n'a été rapporté dans les bases de données publiques. La présence de deux variants différents touchant le même acide aminé important (proline 742) dans CACNA1S dans deux familles différentes suggère que ces variants sont pathogéniques. J'ai cherché la présence d'un deuxième variant pathogéniques dans CACNA1S chez ces 4 patients mais il n'y en avait pas. Il s'agit donc de deux variants faux-sens prédits pathogéniques à l'état hétérozygote.

Nous avons eu l'opportunité de collaborer avec d'autres équipes qui avaient identifiés des variants dans CACNA1S. Les 3 cas supplémentaires comprenaient :

- P10 et P11 porteurs d'un variant hétérozygote, dominant *de novo* (p.Leu1367Val)
- P3 et P4, porteurs récessifs de c.3795G>T (p.Leu 791Cysfs*37, exon 18) et c.3795G>T (p.Phe275Leu, exon 6)
- P5 porteur récessif de c.298G>T (p.Glu100Lys, exon 3) et c.3795G>T (p.Gln1265Hisfs*57, exon 30)

Le résumé des variants identifiés se trouvent dans le **tableau 4** et la **figure 13**.

Le gène CACNA1S est localisé sur le chromosome 1 au locus 1q32.1. Il est exclusivement exprimé dans le muscle squelettique et code pour la sous-unité majeure du complexe DHPR qui est essentielle pour le couplage excitation-contraction. La protéine CACNA1S est formée de 4 domaines similaires contenant 6 segments transmembranaires dont le 4^{ème} segment (S4) de chaque domaine est le domaine senseur du voltage. Des mutations faux-sens dominantes sont impliquées dans l'hyperthermie maligne et la paralysie périodique

hyperkaliémique et sont localisées dans plusieurs domaines de la protéine (**Figure 13**). Les mutations identifiées dans notre étude sont localisées dans des régions différentes.

Les analyses génétiques de cette première cohorte de patients ont mis en évidence 10 variants rares et prédits pathogéniques dans *CACNA1S*. Les variants incluent 4 variants tronquants et 6 faux-sens et sont tous présents dans les deux transcrits de *CACNA1S*. Les variants sont retrouvés dans des cas récessifs et dominants.

II.2 Etude fonctionnelle des mutations de *CACNA1S*

Afin de valider l'impact de la pathogénicité des variants et comprendre les mécanismes pathologiques entre les ségrégations récessives et dominantes nous avons effectué plusieurs expériences fonctionnelles. Les résultats se trouvent dans la figure 5 de la publication de *CACNA1S*, en annexe.

J'ai tout d'abord étudié l'effet des variants tronquants sur l'ARN. J'ai montré que les variants tronquants des exons 9, 30 et 40 n'induisent pas une dégradation complète de l'ARN. Au niveau protéique, nous avons montré une diminution de la quantité de protéine chez plusieurs patients atteints de forme dominante ou récessive. Cela suggère que les mutations dominantes et récessives conduisent au même résultat : un niveau de protéine réduit.

Nous voulions également regarder si la localisation de la protéine était altérée. Nous avons montré dans des myotubes différenciés d'un patient récessif (deux mutations tronquantes) que RYR1, Amphiphysin-2 et Dysferlin, des protéines de la triade, étaient localisées de la même manière que dans des cellules contrôles. Cependant, aucun signal n'était visible pour *CACNA1S* (avec un anticorps N-terminal), ce qui signifie que la quantité de protéine doit être très diminuée ou que le domaine ciblé par l'anticorps n'est plus accessible.

CACNA1S a un rôle majeur dans le couplage excitation-contraction (CEC) en activant RYR1 pour le relargage de calcium du RS lors de la dépolarisation de la membrane plasmique. En collaboration avec l'équipe de Susan Treves à Bâle (Suisse), nous avons étudié le CEC dans deux lignées cellulaires de patients (un atteint de forme dominant et l'autre de forme récessive)

en mesurant la quantité de calcium cytosolique grâce à un marqueur fluorescent. Nous avons montré que les mutations dans *CACNA1S* n'altèrent pas l'homéostasie calcique au repos, contrairement aux mutations identifiées dans *RYR1* dans des cas de myopathies (Zhou et al., 2013). Cependant, lors de l'activation de *CACNA1S* par du KCl, le relargage de calcium du RS vers le cytosol est réduit de moitié dans les cellules de patients par rapport aux cellules contrôles. Nous avons également pu montrer que l'utilisation d'un agoniste de RYR1 conduit également à une diminution du calcium relargué. Cela suggère que les mutations dans *CACNA1S* pourraient affecter le niveau protéique de RYR1 ou d'autres protéines de la triade, ce qui conduit à un CEC fonctionnel mais réduit.

II.3 Conclusion de l'étude

Cette étude a permis l'identification d'un nouveau gène de myopathie congénitale : *CACNA1S* ; et a mis en évidence deux ségrégations différentes (récessive et dominante) conduisant à un phénotype similaire dans plusieurs familles. Le gène *CACNA1S* était déjà connu comme la cause de plusieurs maladies musculaires et ces résultats permettent donc d'élargir le spectre phénotypique des mutations dans ce gène. Des mutations dans plusieurs gènes de la triade avaient déjà été identifiées dans des myopathies congénitales et l'implication de ce gène majeur vient compléter la liste de gènes candidats à séquencer chez des patients ayant des caractéristiques de myopathies centronucléaire ou à cores, et chez des patients dystrophiques. Les données cliniques et histologiques recueillis dans cette cohorte de patients sont plutôt homogènes entre les patients. Néanmoins, il a été observé quelques différences selon le type de mutation et l'âge du patient au moment de la biopsie. Ceci est à prendre en compte pour le diagnostic moléculaire de patients atteints de dystrophie ou de myopathie congénitale.

Les expériences fonctionnelles effectuées durant cette étude ont permis de montrer une diminution de la quantité de protéine chez les patients et un défaut du CEC. Ce défaut de couplage semble altérer l'organisation ou la stabilité des protéines de la triade, puisqu'une activation de RYR1 par son agoniste (indépendamment de *CACNA1S*) ne permet pas de rétablir des niveaux de relargage calciques normaux. Les défauts de stabilité de protéines de la triade et les défauts de CEC sont également observés dans des myopathies congénitales liées à

RYR1, MTM1, STAC3, BIN1, mais le mécanisme pathologique exact devra être caractérisé plus précisément.

L'étude des mutations dans *CACNAIS* et de leurs effets permettra de contribuer à la compréhension des mécanismes pathologiques des myopathies congénitales impliquant les triades et d'établir des perspectives thérapeutiques.

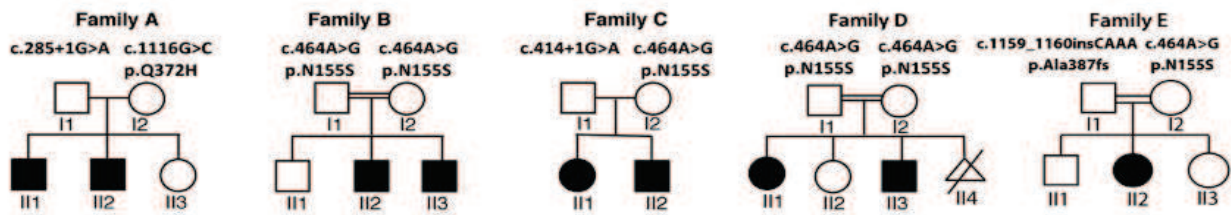


Figure 14 : Arbres généalogiques de la cohorte 2 et mutations identifiées dans *PYROXD1*.

Variant (cDNA; transcrit NM_024854.3)	Variant (protéine)	Effet	Exon/intron		
c.464_A_G	p.Asn155Ser	Faux-sens	Exon 5	Notre cohorte	
c.285+1_G_A	-	Défaut d'épissage (site donneur)	Intron 3		
c.1116_G_C	p.Gln372His	Faux-sens	Exon 10		Collaborateurs
c.414+1_G_A	-	Défaut d'épissage (site donneur)	Intron 4		
c.1159_1160_-_CAAA	p.Lys387Asnfs*14	Décalage du cadre de lecture	Exon 11		

Tableau 5 : Identification de 5 variants rares du gène *PYROXD1* dans une cohorte de 9 patients atteints de myopathie congénitale

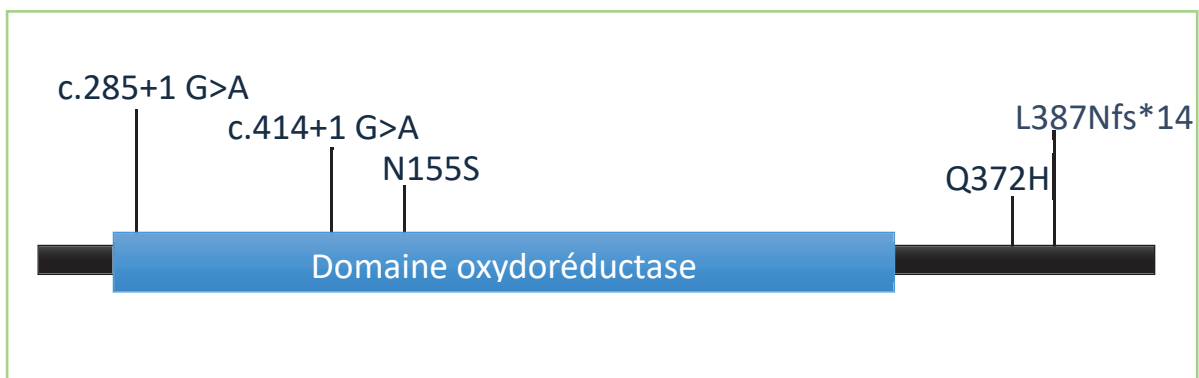


Figure 15 : Représentation schématique de la localisation des variants pathogéniques de *PYROXD1*

III. Cohorte 2 : myopathie myofibrillaire avec noyaux internalisés, cores, et bâtonnets

Publication : “Variants in the Oxidoreductase PYROXD1 Cause Early-Onset Myopathy with Internalized Nuclei And Myofibrillar Disorganization”

Cette cohorte comprend 9 patients de 5 familles différentes. Une famille a été identifiée dans le projet myocapture et les autres familles ont été rapportées et caractérisées par des collaborateurs. La caractérisation clinique et histologique des patients montre une homogénéité entre tous les patients. En effet, ils ont tous une faiblesse musculaire progressive débutant dans l'enfance avec difficulté à monter les escaliers, une faiblesse faciale sans ophtalmoplégie, une voix nasale. Certains ont des défauts de déglutition, un niveau de créatine kinase (CPK) élevée, de légers défauts cardiaques ou respiratoires. L'étude des biopsies musculaires de toutes les familles montrent des noyaux internalisés, des « cores », des inclusions myofibrillaires (agrégats protéiques de desmin, myotilin, alpha-actin), une désorganisation sarcomérique avec accumulation des filaments fins, et des bâtonnets (némaline). Cette description est spécifique et suggérerait une cause génétique commune.

III.1 Analyse génétique

La famille de notre cohorte est une famille consanguine comprenant deux frères atteints et des parents sains (famille B, **Figure 14**) donc l'analyse génétique, effectuée avant mon arrivée, s'est focalisée sur les variants homozygotes. Trois gènes candidats portaient des variants faux-sens rares homozygotes. Parmi les 3, le meilleur gène candidat était *PYROXD1*. Il portait le variant rare c.464_A_G (p.Asn155Ser, exon 5). Notre équipe a eu l'opportunité de collaborer avec d'autres équipes (équipe de Dr Nigel Clarke et Dr Sandra Cooper en Australie, et Dr Carsten Bönnemann aux USA) qui avaient également identifiées des variants de *PYROXD1* dans des familles récessives. Un patient portait également le variant homozygote rare c.464_A_G (p.Asn155Ser, exon 5), un patient portait à l'état hétérozygote composite les variants c.464_A_G (p.Asn155Ser, exon 5) et c.414+1_G_A (intron 4), un patient portait des variants hétérozygotes composites c.285+1_G_A (intron 3) et c.1116_G_C (p.Gln372His, exon

10) et le dernier patient portait les variants hétérozygotes composites c.1159_1160_- _CAA (p.Lys387Asnfs*14, exon 11) et c.464_A_G (p.Asn155Ser, exon 5).

Cette analyse a mis en évidence 5 variants rares dans *PYROXD1* (**Tableau 5 et Figure 15**). Les variants comprennent un décalage du cadre de lecture, deux variants sur des positions canoniques de sites d'épissage, et deux variants faux-sens. L'identification de ces variants dans plusieurs familles avec une ségrégation récessive fait de *PYROXD1* un très bon gène candidat.

En parallèle à cette étude, nous avons continué à chercher d'autres cas *PYROXD1* dans notre cohorte de patients dont l'exome a été séquencé mais également chez des patients qui avaient une clinique et une histologie plus ou moins similaire mais dont l'exome n'a pas été séquencé. Nous avons trouvé deux familles qui portent chacune une seule mutation dans *PYROXD1* qui a déjà été identifiée dans les précédentes familles. La recherche d'une deuxième mutation (intronique ou délétion / duplication) dans ces familles est en cours.

III.2 Analyse fonctionnelle

Comme la fonction de *PYROXD1* n'était pas connue, les questions qui se posaient étaient la caractérisation de l'impact fonctionnel des variants sur la protéine, la compréhension de la fonction de la protéine dans le muscle.

L'impact des mutations d'épissage a été étudié par nos collaborateurs des équipes de Dr Sandra Cooper (Sydney, Australie) et Dr Carsten Bönnemann (Bethesda, USA). L'étude a montré que les mutations c.285+1G>A et c.414+1G>A impactent des sites d'épissages conduisant respectivement à des sauts des exons 3 et 4, qui sont en phase et conduisent à un produit ARN présent mais plus court. Mon implication a été d'étudier l'impact des mutations faux-sens. Grâce à l'ARN extrait de cellules de patients, j'ai testé différentes combinaisons afin de rechercher une altération de l'épissage, au niveau de l'exon muté, et des autres exons. Nous avons montré que ces mutations n'altèrent pas l'épissage. Afin de rechercher une possible altération au niveau protéique, j'ai développé un anticorps contre *PYROXD1* avec l'aide de la plateforme de production de l'IGBMC. En utilisant cet anticorps et plusieurs anticorps commerciaux (qui n'avaient jamais été validés) par western blot, j'ai pu montrer que le niveau

protéique était peu voire pas altéré selon les patients. La 3^{ème} étape était de rechercher un problème de localisation de la protéine, en utilisant plusieurs types cellulaires transfectées par le cDNA de PYROXD1 normal ou muté ainsi que des cellules musculaires de patients. J'ai observé une localisation nucléaire et cytoplasmique qui est similaire entre la protéine normale et muté. Ces résultats suggèrent que les mutations n'impactent pas la localisation ou la stabilité de la protéine mais pourraient impacter la fonction de la protéine.

La fonction de la protéine n'était pas connue mais les sites de prédictions de domaines protéiques indiquaient que PYROXD1 possédait un domaine d'oxidoreduction. Afin d'évaluer si PYROXD1 avait une fonction d'oxidoreductase, nous avons collaboré avec l'équipe de Dr Sylvie Friant à Strasbourg qui est experte en modèle de myopathie dans des levures. Nous avons recherché un homologue d'une oxydoréductase dans la levure. Nous avons en effet trouvé que l'oxydoréductase cytosolique Glr1 dans la levure pouvait avoir une fonction similaire. La levure déficiente pour Glr1 est sensible à l'H₂O₂. Nous avons effectué une expérience de complémentation en transférant le gène humain de PYROXD1 dans la levure déficiente. La sensibilité à l'H₂O₂ était réduite ce qui suggérait que PYROXD1 a une activité réductrice. Cependant, en transférant les cDNA muté de PYROXD1 dans ces levures, la sensibilité à l'H₂O₂ était toujours présente. Ces résultats montrent que PYROXD1 a une activité d'oxydoréduction et que les mutations faux-sens testées altèrent cette fonction.

En collaboration avec l'équipe de Dr Robert Bryson-Richardson en Australie, nous avons également montré l'importance du gène PYROXD1 dans le poisson-zèbre déficient en PYROXD1, qui a des défauts de mouvements et récapitule les phénotypes histologiques des patients (désorganisation sarcomérique, agrégats myofibrillaires). Le transfert de l'ARN humain de PYROXD1 rétablit des mouvements normaux du poisson et l'histologie est moins sévère.

III.3 Conclusion de l'étude

Cette étude a permis l'identification d'un nouveau gène de myopathie : *PYROXD1*. Grâce à une cohorte de 9 patients dans 5 familles, nous avons montré que des mutations récessives dans ce gène conduisent à une myopathie spécifique. En effet, la clinique est très

similaire entre tous les patients, malgré quelques différences mais l'étude des biopsies musculaires a mis en évidence un profil très spécifique qui inclue simultanément des « cores », des noyaux internalisés, des corps de némaline et des inclusions myofibrillaires spécifiques. Nous avons montré pour la première fois que PYROXD1 est localisée à la fois dans le noyau et le cytoplasme et a une activité d'oxydoréductase qui est altérée par certaines mutations. Cette découverte est importante car la régulation de l'oxydoréduction était déjà connue pour être altérée dans certaines myopathies à cores.

L'implication de PYROXD1 pourra donc aider à comprendre les mécanismes pathologiques impliquant la régulation de l'oxydoréduction. De plus, grâce à la découverte de ce nouveau gène de myopathie, de nouveaux patients pourront être diagnostiqués. Des pistes thérapeutiques peuvent être envisagées avec des molécules réduisant le stress oxydatif déjà testées pour d'autres myopathies, comme le N-acetyl-cysteine.

Discussion

I. Impact des mutations identifiées dans *CACNAIS*

I.1. Impact des mutations tronquantes dans *CACNAIS*

I.1.a Etude des mutations tronquantes de *CACNAIS* dans notre cohorte

Le gène *CACNAIS* est composé de 44 exons et 1873 acides aminés. Dans notre étude, nous avons identifié des mutations récessives qui sont prédites « tronquantes ». Les mutations tronquantes peuvent conduire au processus naturel de dégradation de l'ARN médié par un codon stop (non-sense mediated decay, NMD). Est-ce que deux mutations tronquantes conduisent à une dégradation de l'ARN et à une déficience totale de la protéine ? Est-ce que ces mutations échappent au mécanisme de dégradation de l'ARN et conduisent à une protéine stable fonctionnelle ou toxique ?

Je pose la question de l'implication pathologique de ces mutations tronquantes.

Les mutations tronquantes en question incluent une mutation non-sens dans l'exon 37, qui conduit à un changement d'un acide aminé en un codon stop, de plusieurs délétions hors phase et un défaut d'épissage qui conduisent à un décalage du cadre de lecture conduisant à un codon stop prématuré dans les exons 9, 18, 30, 40. Le NMD est un processus naturel qui permet la dégradation des ARN qui contiennent un codon stop prématurés (Peltz et al, 1993 ; Maquat, 1995). Il a été montré que ce mécanisme peut être inactif si le codon stop prématuré est présent dans le dernier exon ou la fin de l'avant-dernier exon. L'étude de l'ARN que j'ai effectué a montré que les mutations dans les exons 9, 30 et 40 ne conduisent pas à une dégradation complète de l'ARN muté. En effet, après avoir amplifié et séquencé le cDNA issu de l'ARN, nous pouvions voir une diminution de la quantité de l'ARN muté mais pas une dégradation complète, avec une méthode semi-quantitative. Il est donc probable que l'ARN contenant un

codon stop prématuré soit dégradé par le mécanisme NMD en grande partie et qu'une quantité résiduelle puisse être traduite en protéine.

En utilisant les bases de données publiques de séquençage d'exomes et de génomes, (ExAC et gnomAD), j'ai pu observer que le gène *CACNA1S* contient 52 variants tronquant hétérozygotes, et 1 homozygote dans le dernier exon (1_201009083 AGTAGCTCT_A ; p.Leu1832Argfs*67). Ce variant est présent chez 475 individus à l'état hétérozygote et 4 individus à l'état homozygote, et est prédit bénin par les logiciels. A part ce variant, on ne retrouve pas d'autres variants tronquants homozygotes dans les bases de données, ce qui suggère que la présence de deux variants tronquants sur des allèles différents peut être pathogénique.

Mon hypothèse est que la présence de la protéine CACNA1S est nécessaire pour la fonction du muscle, même en quantité résiduelle. La perte totale de la protéine pourrait être létale due à sa fonction essentielle. Les mutations tronquantes pourraient conduire à une protéine tronquée partiellement fonctionnelle.

I.1.b. Que sait-on sur la partie C-terminale de CACNA1S ?

Il existe un modèle spontané de souris déficiente pour *Cacna1s* (*mdg/mdg*). Le gène *Cacna1s* de la souris a 44 exons, 2 isoformes et présente 91 % d'homologie avec le gène humain. Ce modèle animal porte une mutation tronquante homozygote dans l'exon 33 (une délétion d'un nucléotide à la position 4010, qui conduit à un décalage du cadre de lecture) et est létale embryonnaire (Pai, 1965a; Pai, 1965b). L'exon 33 est situé dans le dernier segment du domaine IV et la mutation pourrait donc altérer l'intégrité du canal et/ou conduire à une dégradation de la protéine. Le niveau protéique n'est pas détectable chez la souris. Les patients de notre étude qui ont deux mutations tronquantes ont au moins une mutation tronquante dans des exons se situant après l'exon 33 (P1 : 37 et 40 et P2 : 9 et 40). Les trois autres patients ayant une forme récessive sont porteurs hétérozygotes composites d'une mutation faux-sens et d'une mutation tronquante avant l'exon 33 (exon 18 et exon 30). Le phénotype des patients porteurs de deux mutations tronquantes est moins sévère que celui de la souris. Par western-blot, le

niveau de protéine n'était pas détectable dans le patient P1 et nous n'avions pas de matériel biologique pour P2. La comparaison des phénotypes des patients et de la souris suggère que les mutations tronquantes identifiées ne conduisent pas à une dégradation complète de la protéine car cela pourrait être létale. Les mutations pourraient conduire à une faible quantité de protéine tronquée qui contiendrait encore les 4 domaines fonctionnels mais avec une activité réduite. Dans cette hypothèse-là, la partie C-terminale aurait donc un rôle non essentiel pour le CEC et la réduction du CEC observé chez les patients pourrait être due à une diminution de la quantité de complexes DHPR.

Allant dans ce sens, certaines études montrent la présence de deux formes de CACNA1S dont une forme tronquée à la position 1662 dans l'exon 40 qui serait encore capable d'activer le CEC et de laisser passer le Ca^{2+} d'après des expériences *in vitro* (Beam et al., 1992; De Jongh et al., 1991; Hulme et al., 2005). La structure 3D de DHPR a récemment été déterminée et la partie C-terminale n'est pas détectable, ce qui suggère un domaine dynamique (Wu et al., 2016). Une étude de CACNA1C (sous-unité alpha1 du DHPR cardiaque) a montré que la partie C-terminale tronquée peut se fixer sur la protéine tronquée afin de réguler la fonction de la protéine (Gao et al., 2001). Dans cette étude, il est montré que la partie C-terminale est également importante pour le trafic membranaire de la protéine. D'autres domaines de CACNA1S pourraient suffire au bon trafic membranaire. L'étude du trafic membranaire pourra également être étudié dans des modèles *in vitro* afin de comprendre son implication dans les mécanismes pathologiques.

Dans cette hypothèse, la protéine tronquée pourrait être exprimée et activer le CEC, de façon moins efficace.

I.2 Impact des mutations faux-sens

Cinq mutations faux-sens ont été identifiées. Il s'agit de trois mutations dominantes (P742Q, P742S, L1367V) et deux mutations récessives (E100K et F275L). Dans les cas récessifs les mutations sont présentes en association avec une mutation tronquante et les parents porteurs du faux-sens ne sont pas affectés. Les mutations sont présentes dans différents

domaines de la protéine et il est donc difficile de prédire l'effet pathogénique de ces mutations. Pour ce faire, il peut être intéressant de les comparer aux mutations faux-sens dominants identifiés dans la paralysie périodique hypokaliémique (PPH) ou l'hyperthermie maligne (HM).

I.2.a Comment différentes mutations « faux-sens » de *CACNA1S* conduisent-elles à différentes maladies ?

Dans les cas de l'hyperthermie maligne, le mécanisme pathologique est un relargage excessif de calcium du RS en contact d'un anesthésiant volatile auquel le canal RYR1 est hypersensible (Robinson et al., 2006). La cause génétique majeure de cette maladie est des

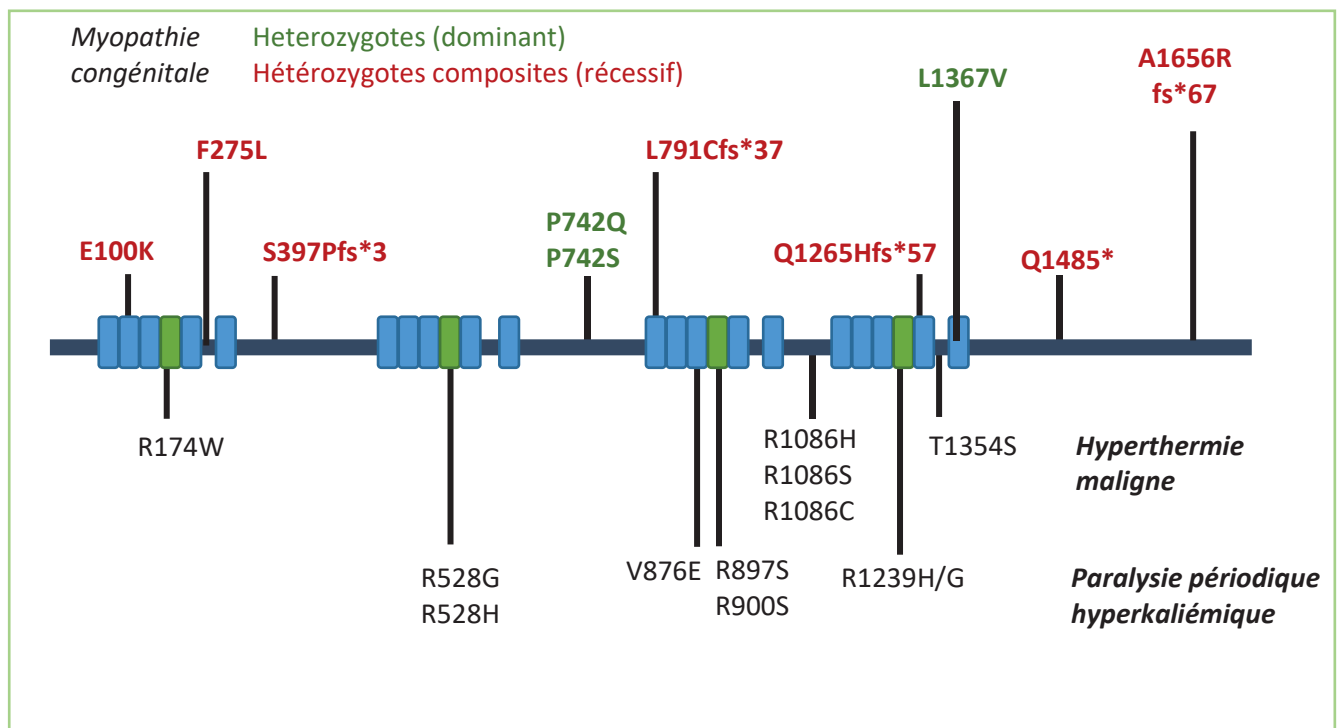


Figure 16 : Représentation schématique de la localisation des mutations de *CACNA1S*.

mutations faux-sens dominantes dans *RYR1* mais dans certains cas, des mutations faux-sens dominantes dans *CACNA1S* ont été identifiées et les études fonctionnelles montrent également un relargage excessif de calcium (Carpenter et al., 2009; Monnier et al., 1997). Les mutations sont majoritairement localisées dans la boucle cytosolique entre les domaines III et IV et affectent l'arginine 1086 (Figure 16). D'après une étude, cette boucle III-IV servirait de

régulateur négatif de RYR1 pour empêcher la sortie excessive de calcium et la mutation dominante R1086H dans cette boucle altère cette fonction et conduit donc à une augmentation du calcium cytosolique et rend le canal RYR1 hypersensible à certains agents (Weiss et al., 2004). De plus, cette mutation altère également légèrement le CEC. La mutation R174W dans le segment S4 du domaine I (senseur du voltage) est également impliquée dans des cas de HM. Les études fonctionnelles *in vitro* montrent que la mutation diminue fortement l'entrée de calcium sans altérer le CEC ; mais elle cause cependant une altération de l'inhibition de RYR1. En effet, le niveau calcique cytosolique au repos est augmenté dans les cellules portant la mutation, ce qui rend RYR1 hypersensible. De plus ce niveau de calcium élevé peut être pathogénique, comme dans certains cas CCD où le canal RYR1 relargue du calcium au repos. La troisième mutation connue de HM, T1354S, est présente dans la boucle S5-S6 (domaine IV). L'étude dans un modèle *in vitro* montre que la mutation induit une activation accélérée du canal après dépolarisation, ce qui conduit à une plus grande entrée de calcium par le canal. Cette entrée de calcium au niveau de la jonction permettrait une activation de RYR1, seulement en coordination avec les agents déclencheurs de HM (Pirone et al., 2010).

Dans les cas de la paralysie périodique hypokaliémique, les mutations identifiées se retrouvent dans les segments S4 des domaines II, III et IV et le segment S3 du domaine III. Les segments S4 permettent de sentir la dépolarisation grâce à des acides aminés chargés positivement et permettent un changement de conformation de chaque pore formé par chacun des domaines afin d'ouvrir le pore principal du canal. Les mutations dans ces segments induiraient une perte de fonction par une perte de la sensibilité de CACNA1S à la dépolarisation. Ceci conduirait à une diminution de l'activation de RYR1 et un CEC réduit.

Il est intéressant de noter que des études de biopsies musculaires de patients HM ou PPH montrent des défauts structuraux de type myopathiques. En effet, une étude de biopsies de patients HM montre la présence de défauts structuraux mineurs de type contractures localisées, probablement due au défaut d'homéostasie calcique (Lavorato et al., 2016). De plus, certaines études montrent que la majorité des patients PPH développent une myopathie vacuolaire à l'âge adulte (Basali and Prayson, 2015; Cavel-Greant et al., 2012; Gold and Reichmann, 1992).

I.2.b Impact des mutations « faux-sens » dans les cas récessifs de notre étude

Dans notre cohorte, nous avons deux familles dont les patients sont porteurs hétérozygotes composites d'une mutation conduisant à un décalage du cadre de lecture et d'une mutation faux-sens. Les deux mutations faux-sens sont localisées dans le domaine I : E100K (S2) et F275L (boucle S5-S6). Afin de comprendre l'implication de ces mutations dans la protéine, je me suis basée sur l'analyse de la structure 3D de DHPR récemment déterminée et les données connues des mutations de PPH et HM (Wu et al., 2016). Pour rappel, chaque domaine est structuré de manière que les segments 1 à 4 forment un pore « senseur du voltage » (1 par domaine) et que les segments S5 et S6 de chaque domaine forment ensemble un pore unique pour les ions.

Pour la mutation E100K, l'étude de la structure montre que le glutamate 100 est orienté vers l'intérieur du pore I et serait en face de l'arginine 174 (muté dans des cas de HM). Dans l'hypothèse que la localisation des acides aminés E100 et R174 est importante pour la structure du pore, une altération d'un des deux acides aminés conduirait à un pore non fonctionnel. Le patient porte également une mutation tronquante dans l'exon 30. Cette troncation se trouve dans le domaine IV et pourrait conduire à une protéine instable, comme celle de la souris *mdg/mdg* qui est porteuse homozygote d'une troncation dans l'exon 33. Cela voudrait dire que la protéine majoritaire chez ce patient est la protéine mutée E100K et que le phénotype du patient est dû essentiellement à la mutation E100K car la protéine contenant la mutation tronquante serait instable ou non fonctionnelle. La mutation E100K à l'état hétérozygote ne semble pas pathogénique car le parent porteur hétérozygote de la mutation E100K ne montre pas de signes cliniques. Le patient E100K subit en plus de la myopathie, des épisodes de faiblesse musculaire, comme les patients PPH. En effet, les autres mutations PPH sont également présentes dans les domaines S4 senseurs de voltages des autres domaines. Le domaine I est une exception car la mutation R174W conduit à un phénotype de HM. Cela suggère que selon les acides aminés affectés, différents changements de la structure des pores senseurs de voltage conduisent à différents phénotypes.

Pour la mutation F275L, l'étude de la structure 3D de CACNA1S montre qu'elle pourrait avoir un rôle important dans la structure de la boucle S5-S6 du domaine I. La mutation

HM T1354S se trouve également dans une boucle S5-S6 (domaine IV) ce qui nous montre l'importance de cette boucle. Je peux tirer la même hypothèse que pour P5 savoir que la deuxième mutation présente chez les patients porteurs de F275L (mutation tronquante dans l'exon 18) pourrait conduire à une protéine non fonctionnelle. Les patients de notre cohorte porteurs de F275L ont donc majoritairement la protéine F275L car la protéine contenant la mutation tronquante est instable ou non-fonctionnelle. Ceci peut expliquer le phénotype différent des patients porteurs de F275L par rapport aux patients HM porteurs de la mutation T1354S.

I.2.c Impact des mutations « faux-sens » dans les cas dominants de notre étude

Les 3 mutations dominantes sont P742S, P742Q et L1367V, et toutes apparaissent de novo avec la maladie

La proline 742 est localisée au niveau de la boucle entre le domaine II et le domaine III de CACNA1S (boucle II-III), qui est essentielle pour le couplage excitation-contraction (Kugler et al., 2004; Nakai et al., 1998; Wilkens et al., 2001). Il a été montré que les acides aminés entre les positions 720 et 760 étaient nécessaires pour le CEC et qu'en particulier un changement des acides aminés Ala739, Phe741, Pro742, et Asp744 réduisait fortement le CEC. Certaines études biochimiques montrent une liaison directe entre cette boucle (région entre les acides aminés Arg681-Leu690) et RYR1 tandis que d'autres études montrent plutôt une interaction indirecte qui inclue un ou plusieurs partenaires (el-Hayek et al., 1995a; El-Hayek and Ikemoto, 1998; Proenza et al., 2000).

La mutation L1367V est localisée dans le segment S6 du domaine IV de la protéine. D'après l'étude de la structure 3D de la protéine, les segments S5 et S6 forment le pore central de la protéine (Wu et al., 2016). Comme décrit dans l'introduction, l'orientation des acides aminés semble très importante pour la structure de la protéine ; on peut donc imaginer que ce changement d'acide aminé est critique et conduit à une protéine non fonctionnelle.

En sachant que les complexes DHPR forment des tétrades et que la structure est très importante pour l'activation de RYR1, on peut penser que l'inclusion d'au moins une protéine

CACNA1S muté conduit à une tétrade non fonctionnelle. Une tétrade fonctionnelle contiendrait donc quatre protéines CACNA1S non mutées, ce qui, dans le cas des mutations dominantes correspond statistiquement à 1/16 de tétrades fonctionnelles. Cette proportion faible de tétrades fonctionnelles correspondrait à notre observation d'un CEC réduit mais fonctionnel.

I.2.d Mécanismes physiopathologiques

Nous observons un phénotype similaire entre les patients récessifs et dominants. Le mécanisme pathologique semble similaire. Le mécanisme n'a pas été étudié en détail mais nous avons quelques résultats de mesure de l'homéostasie calcique dans des cellules musculaires du patient dominant P10 porteur de la mutation L1367V et du patient P1 récessif porteurs de deux mutations tronquantes (exon 9 et exon 40).

Le niveau calcique cytosolique au repos est normal et similaire entre les cellules des patients et les cellules contrôles. Les résultats diffèrent des cas de HM due à des mutations de CACNA1S et des cas de CCD dues à des mutations de RYR1, dans lesquels le niveau calcique cytosolique est plus élevé (Monnier et al, 1997 ; Carpenter et al, 2009 ; Weiss et al, 2004). Ce résultat suggère que les mutations testées de *CACNA1S* n'induisent pas d'ouverture de RYR1 au repos.

Après dépolarisation des membranes par un traitement au KCl, nous observons un relargage de calcium du SR ce qui montre que le CEC est fonctionnel. Le défaut observé pour les deux lignées de patient est que la quantité maximale de calcium relargué est réduite par rapport à celle des cellules contrôles. Ce défaut est également observé dans certains cas de CCD (Ducreux et al, 2004). La quantité de calcium dans le RS est normal, ce qui indique bien un CEC réduit dans les deux lignées de patients.

Nous avons également testé l'activation de RYR1 par un agoniste (4-chloro-*m*-cresol), seulement dans la lignée portant les deux mutations tronquantes, et nous avons observé un relargage de calcium diminué, comme celui observé après traitement par du KCl. Cela suggère que l'activité de RYR1 est également affectée chez le patient. Une caractérisation plus poussée pourra avoir lieu afin de tester si ce sont les niveaux protéiques de RYR1 qui sont directement

altérés ou si les mutations de *CACNA1S* induisent une altération de la structure qui engendre une inhibition de la fonction de RYR1.

Un modèle de souris adulte déficiente en *CACNA1S* a été développé et étudié et montre que, contrairement à la souris *mdg/mdg* déficiente en *CACNA1S* qui est létal embryonnaire, la souris adulte est vivante. Le modèle adulte, en utilisant une stratégie d'exon-skipping permet la présence de la protéine à faible dose (Piétri-Rouxel et al., 2010). Ce modèle présente une forte atrophie musculaire tandis que le CEC est toujours fonctionnel. La localisation de *CACNA1S* est altérée, ce qui pourrait altérer sa fonction majeure (CEC) et induire d'autres fonctions, comme l'autophagie qui conduirait à l'atrophie musculaire. Les résultats des 2 modèles de souris montrent que *CACNA1S* a un rôle majeur pour le développement et le maintien à du muscle fonctionnel à l'âge adulte, ce qui concorde avec la myopathie congénitale observée.

Les résultats obtenus lors de l'étude d'une lignée cellulaire dominante et une lignée récessive indiquent un défaut de CEC similaire pour les deux types de ségrégation. Le CEC semble fonctionnel mais réduit. Pour étudier plus en détail les différentes mutations, il serait intéressant de faire des expériences fonctionnelles supplémentaires afin de tester l'impact de toutes les mutations.

I.3 Histologie et ultrastructure des muscles des patients *CACNA1S*

L'identification des mutations *CACNA1S* dans un type de myopathie congénitale vient ajouter un nouveau gène à tester pour le diagnostic des patients atteints de myopathie congénitale ou de dystrophie. Les défauts observés sur les biopsies musculaires incluent les noyaux internalisés, des « cores » et surtout un aspect alvéolaire observé en coloration NADH. Chez deux patients, nous avons également pu observer des aspects dystrophiques. En microscopie électronique, nous pouvons voir une dilation du RS mais la structure de la jonction triadique semble intacte ; ainsi que des désorganisations focales de la structure. Ce qui est intéressant est que ces observations diffèrent de ce qu'on observe classiquement dans les myopathies dues à des mutations RYR1, ou d'autres myopathies. Ces observations montrent que la myopathie liée à *CACNA1S* ne peut donc pas être classée dans l'un de deux sous-groupes CNM ou CCD mais est spécifique.

Cependant, nous pouvons observer des similarités entre les différents groupes.

Les défauts histologiques entre les CNM et la myopathie liée à CACNA1S possèdent des similarités. En effet, dans la myopathie liée CACNA1S, nous pouvons observer des noyaux centralisés ainsi que des défauts des triades (dilatations des RS). Dans les CNM, il est observé des défauts de la structure des triades ainsi que des défauts calciques et une diminution du niveau protéique de CACNA1S.

Les « cores » observés en histologie correspondent également à ce qui est observé dans les myopathies liées à RYR1, le partenaire de CACNA1S.

Pour 2 familles, nous observons également des défauts de type « dystrophiques ». Cela est intéressant car il a été rapporté chez des patients atteints de dystrophie myotonique, des défauts d'épissage de CACNA1S. Chez ces patients, le transcrit majoritaire à l'âge adulte est en fait le transcrit fœtal (Zang et al, 2012). Le transcrit fœtal de CACNA1S ne possède pas l'exon 29, qui est localisé dans une boucle extracellulaire du domaine IV. Des altérations dans certains domaines de CACNA1S pourraient donc conduire à des défauts histologiques.

Ces observations posent la question de l'implication de CACNA1S dans différentes voies moléculaires conduisant à ces différents aspects histologiques.

II. Impact des mutations de *PYROXD1*

Notre étude a mis en évidence 5 mutations différentes dans le gène *PYROXD1* dont deux faux-sens, deux mutations d'épissage et une insertion conduisant à un décalage du cadre de lecture. Dans toutes les familles analysées la ségrégation est récessive et les patients portent des mutations homozygotes ou hétérozygotes composites. Ces mutations conduisent à un phénotype spécifique et homogène. Les patients ont une faiblesse musculaire progressive qui débute dans l'enfance associée à une faiblesse faciale, une difficulté à déglutir, et une voix nasale. Les caractéristiques histologiques sont des noyaux internalisés, des « cores », des désorganisation sarcomériques et des agrégats myofibrillaires.

II.1 Quel est le rôle de PYROXD1 ?

La fonction de PYROXD1 n'est pas connue et aucune étude ne fait référence à cette protéine. Le transcrit majoritaire serait exprimé de façon ubiquitaire (données Gtex) et code pour une protéine de 500 acides aminés. Les sites de prédictions de domaines protéiques classent cette protéine dans la famille des « pyridine nucleotide-disulphide reductases » (PNDR), grâce à son domaine d'oxydoreduction. Cette famille de protéine regroupe des enzymes qui permettent de réguler le statut redox de leur substrat par la réduction de leur co-facteurs NAD et FAD. D'autres membres de cette famille incluent la glutathione reductase, la dihydrolipoamide dehydrogenase et les reductases thioredoxin.

La première question était de savoir quel était la fonction de PYROXD1.

Grâce à une expérience de complémentation dans une levure déficiente pour la glutathione reductase, nous avons pu mettre en évidence l'activité réductrice de PYROXD1, qui dans notre expérience a pu réduire l' H_2O_2 . Les expériences de localisation sur des biopsies musculaires et dans différents modèles cellulaires montrent la localisation de PYROXD1 dans le noyau et le cytosol.

Notre étude a donc montré que PYROXD1 est une oxydoréductase exprimée dans le noyau et le cytosol.

II.2 Quel est l'impact des mutations identifiées ?

Notre étude a mis en évidence 2 mutations faux-sens, 2 mutations d'épissage (conduisant à un saut d'exon en phase) et une insertion conduisant à un décalage du cadre de lecture. Chaque patient est porteur d'au moins une mutation faux-sens. Les études du niveau protéique par western blot ne montre pas la présence d'une protéine tronquée causée par les

mutations d'épissage. Ceci signifie que les protéines majoritaires chez tous les patients sont les protéines mutées N155S et Q372H et qu'il y a une haploinsuffisance d'une partie des protéines.

Les expériences fonctionnelles des deux mutations faux-sens montrent une altération de l'activité réductrice de PYROXD1. Les deux acides aminés mutés N155 et Q372 sont très conservés dans l'évolution. N155 est localisé dans le domaine d'oxydoréduction tandis que Q372 est prédit pour être en dehors du domaine. La mutation de Q372 pourrait altérer la structure de l'enzyme ou affecter un domaine d'interaction.

Dans les bases de données publiques, il n'existe pas de contrôles porteurs de mutations tronquantes homozygotes, ce qui suggère que la perte complète de la protéine est délétère et en effet, la délétion totale de la protéine est létale embryonnaire chez la souris (The International Mouse Phenotyping Consortium, IMPC), ce qui montre l'importance cruciale de la protéine durant le développement.

Les analyses génétiques et fonctionnelles montrent l'impact pathogénique de mutations faux-sens récessives dans des acides aminés critiques (N155 et Q372) qui altèrent l'activité réductrice de PYROXD1.

II.3 Mécanismes physiopathologiques

Comme décrit en introduction, la balance redox dans le muscle est très importante et la découverte de mutations dans *PYROXD1* impliquées dans les myopathies congénitales suggère que PYROXD1 a un rôle majeur dans le muscle. Pour comprendre le mécanisme pathologique, une perspective importante est de caractériser le(s) substrat(s) de PYROXD1 et son implication dans la balance redox du muscle.

Les mutations dans *RYR1* peuvent conduire à des « cores » et des noyaux internalisés sur les biopsies musculaires, qui sont des caractéristiques également observées chez les patients mutés dans *PYROXD1*. Plusieurs études montrent la régulation redox de RYR1 dans des régions importantes de la protéine (Zable et al, 1997 ; Sun et al, 2013). Une oxydation trop élevée peut activer RYR1 et induire un relargage élevé de calcium du RS (Marengo et al, 1998 ; Feng et al, 2000).

Certaines études suggèrent que SEPNI peut réguler le statut redox de RYR1 car l'homéostasie calcique est dérégulée dans la myopathie liée à SEPNI, ce qui expliquerait le lien entre la balance redox et le calcium (Jurynek et al, 2008 ; Oba et al, 2002). De plus, la réduction de SEPNI dans le poisson-zèbre conduit à une désorganisation des myofibrilles et de la ligne Z (Jurynek et al, 2008).

D'après notre étude, PYROXD1 semble avoir un rôle majeur dans la balance redox du muscle qu'il faut encore caractériser. À la vue de toutes les caractéristiques observées lors de l'étude des biopsies musculaires, l'altération de PYROXD1 semble avoir des conséquences à plusieurs niveaux (altération de la balance redox et défauts structuraux). Il faudra également comprendre pourquoi seul le muscle squelettique est affecté alors que PYROXD1 est exprimé dans tous les tissus.

II.4 Les antioxydants : une approche thérapeutique à envisager

L'hypothèse du stress oxydatif dans les cellules est quelque chose qui a déjà été observé dans plusieurs types de myopathies impliquant des mutations dans *SEPNI* et *RYR1* (Dowling et al, 2012). Des cellules en cultures de patients muté dans *SEPNI* ou *RYR1* ont un niveau de stress oxydatif élevé et sont plus sensibles à l'H₂O₂ (Arbogast et al, 2009 ; Dowling et al, 2012).

Un traitement qui est a été testé *in vitro* et dans le poisson-zèbre est l'antioxydant N-acetylcysteine (NAC) qui corrige le stress oxydatif et la pathologie musculaire dans les modèles de poisson-zèbre *ryr1* et la souris *mdx*, modèle dystrophique (Dorchies et al, 2006 ; Dowling et al, 2012).

Ce traitement pourrait dans le cas de PYROXD1 diminuer le stress oxydatif engendré par l'altération de sa fonction enzymatique.

III. Conclusion générale

Les myopathies congénitales sont une classe de maladies neuromusculaires rares et très hétérogènes. Dans les myopathies congénitales se trouvent différents sous-groupes : les myopathies à noyaux centralisés (CNM), les myopathies à « cores » (CCD), les myopathies à némaline (NM) et un dernier sous-groupe comprenant différentes myopathies. L'hétérogénéité des myopathies congénitales signifie qu'un gène peut être impliqué dans différents phénotypes et un phénotype peut être associé à plusieurs gènes. Il y a plus de 25 gènes identifiés et associés à différents sous-groupes. La classification des myopathies congénitales selon les défauts histologiques permet de prioriser les gènes à séquencer selon le groupe de myopathie.

Cependant, il reste encore beaucoup de patients non diagnostiqués, ce qui suggère l'implication d'autres gènes.

Le but de mon projet de thèse était donc d'identifier de nouveaux gènes de myopathies.

J'ai pu participer à la caractérisation de deux nouveaux gènes de myopathies : *CACNAIS* et *PYROXDI*.

J'ai pu identifier des mutations récessives et dominantes dans *CACNAIS* conduisant à une myopathie spécifique, reconnaissable en histologie par un aspect alvéolaire en coloration NADH, des noyaux internalisés et des « cores ». Les symptômes cliniques étaient une hypotonie natale, une faiblesse musculaire généralisée, une faiblesse faciale et des défauts de déglutition. Les études fonctionnelles ont montré que les mutations conduisent à un défaut de CEC. Ces résultats sont importants car ils caractérisent une nouvelle maladie due à des mutations de *CACNAIS* et indiquent de nouvelles pistes pour l'étude de la fonction de *CACNAIS* et ses mécanismes pathologiques. Les données histologiques permettent de penser qu'il peut exister des voies communes entre les protéines de la triade (myopathies à « cores ») et les protéines du transport intracellulaire (myopathies à noyaux internalisés).

J'ai également participé à l'étude génétique et fonctionnelle de mutations identifiées dans le nouveau gène de myopathie *PYROXD1*. Nous avons pu montrer que des mutations récessives conduisent à une myopathie spécifique incluant des noyaux internalisés, des « cores », des désorganisation sarcomériques et des agrégats myofibrillaires. Cette myopathie conduit à une faiblesse musculaire progressive qui débute dans l'enfance associée à une faiblesse faciale, une difficulté à avaler, et une voix nasale. Les données fonctionnelles montrent que *PYROXD1* est une oxydoréductase dont l'activité est altérée par les mutations identifiées. Un modèle de poisson-zèbre nous a permis de valider l'importance de *PYROXD1* dans le muscle. Cependant, nous n'avons pas pu déterminer son rôle précis dans le muscle. Des recherches supplémentaires permettront de comprendre l'importance de *PYROXD1* dans la balance redox du muscle et de trouver une voie commune avec les dérégulations redox trouvées dans d'autres myopathies.

L'identification de ces deux nouveaux gènes est importante pour l'amélioration du diagnostic des patients et le développement de nouvelles thérapies basées sur ces nouvelles voies. Au niveau scientifique, il était intéressant de mettre en évidence l'implication de *CACNA1S* dans une myopathie congénitale alors que des mutations dans d'autres protéines de la triade étaient connues. Cela permettra l'étude plus approfondie des mécanismes pathologiques de défauts de la triade.

L'identification de *PYROXD1* montre l'implication directe d'une oxydoréductase dans les myopathies et des études approfondies permettront de comprendre cette voie moléculaire.

Plus globalement, ces résultats montrent l'importance de la caractérisation clinique et histologique dans le séquençage d'exomes pour l'identification de nouveaux gènes de myopathie. Cette étude montre également l'importance d'expériences fonctionnelle pour la validation de l'impact des mutations.

Bibliographie

- Al-Qusairi, L., Weiss, N., Toussaint, A., Berbey, C., Messaddeq, N., Kretz, C., Sanoudou, D., Beggs, A. H., Allard, B., Mandel, J. L., *et al.* (2009). T-tubule disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin lipid phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 18763-18768.
- Arbogast, S., Beuvin, M., Fraysse, B., Zhou, H., Muntoni, F., and Ferreiro, A. (2009). Oxidative stress in SEPNI-related myopathy: from pathophysiology to treatment. *Ann Neurol* *65*, 677-686.
- Avila, G., and Dirksen, R. T. (2001). Functional effects of central core disease mutations in the cytoplasmic region of the skeletal muscle ryanodine receptor. *J Gen Physiol* *118*, 277-290.
- Avila, G., O'Brien, J. J., and Dirksen, R. T. (2001). Excitation--contraction uncoupling by a human central core disease mutation in the ryanodine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 4215-4220.
- Balaban, R. S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* *120*, 483-495.
- Barbieri, E., and Sestili, P. (2012). Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling. *J Signal Transduct* *2012*, 982794.
- Barouki, R. (2006). [Ageing free radicals and cellular stress]. *Med Sci (Paris)* *22*, 266-272.
- Basali, D., and Prayson, R. A. (2015). Episodic weakness and vacuolar myopathy in hypokalemic periodic paralysis. *J Clin Neurosci* *22*, 1846-1847.
- Beam, K. G., Adams, B. A., Niidome, T., Numa, S., and Tanabe, T. (1992). Function of a truncated dihydropyridine receptor as both voltage sensor and calcium channel. *Nature* *360*, 169-171.
- Bevilacqua, J. A., Monnier, N., Bitoun, M., Eymard, B., Ferreiro, A., Monges, S., Lubieniecki, F., Taratuto, A. L., Laquerriere, A., Claeys, K. G., *et al.* (2011). Recessive RYR1 mutations cause unusual congenital myopathy with prominent nuclear internalization and large areas of myofibrillar disorganization. *Neuropathol Appl Neurobiol* *37*, 271-284.
- Bitoun, M., Maugenre, S., Jeannet, P. Y., Lacene, E., Ferrer, X., Laforet, P., Martin, J. J., Laporte, J., Lochmuller, H., Beggs, A. H., *et al.* (2005). Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat Genet* *37*, 1207-1209.
- Block, B. A., Imagawa, T., Campbell, K. P., and Franzini-Armstrong, C. (1988). Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J Cell Biol* *107*, 2587-2600.

Bohm, J., Biancalana, V., Dechene, E. T., Bitoun, M., Pierson, C. R., Schaefer, E., Karasoy, H., Dempsey, M. A., Klein, F., Dondaine, N., *et al.* (2012). Mutation spectrum in the large GTPase dynamin 2, and genotype-phenotype correlation in autosomal dominant centronuclear myopathy. *Hum Mutat* 33, 949-959.

Bohm, J., Bulla, M., Urquhart, J. E., Malfatti, E., Williams, S. G., O'Sullivan, J., Szlauner, A., Koch, C., Baranello, G., Mora, M., *et al.* (2017). ORAI1 Mutations with Distinct Channel Gating Defects in Tubular Aggregate Myopathy. *Hum Mutat*.

Bohm, J., Chevessier, F., Maues De Paula, A., Koch, C., Attarian, S., Feger, C., Hantai, D., Laforet, P., Ghorab, K., Vallat, J. M., *et al.* (2013a). Constitutive activation of the calcium sensor STIM1 causes tubular-aggregate myopathy. *Am J Hum Genet* 92, 271-278.

Bohm, J., Vasli, N., Maurer, M., Cowling, B. S., Shelton, G. D., Kress, W., Toussaint, A., Prokic, I., Schara, U., Anderson, T. J., *et al.* (2013b). Altered splicing of the BIN1 muscle-specific exon in humans and dogs with highly progressive centronuclear myopathy. *PLoS Genet* 9, e1003430.

Bohm, J., Yis, U., Ortac, R., Cakmakci, H., Kurul, S. H., Dirik, E., and Laporte, J. (2010). Case report of intrafamilial variability in autosomal recessive centronuclear myopathy associated to a novel BIN1 stop mutation. *Orphanet J Rare Dis* 5, 35.

Brickley, K., Campbell, V., Berrow, N., Leach, R., Norman, R. I., Wray, D., Dolphin, A. C., and Baldwin, S. A. (1995). Use of site-directed antibodies to probe the topography of the alpha 2 subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels. *FEBS Lett* 364, 129-133.

Buraei, Z., and Yang, J. (2010). The ss subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Physiol Rev* 90, 1461-1506.

Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J. P., Ravanat, J. L., and Sauvaigo, S. (1999). Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res* 424, 9-21.

Campiglio, M., and Flucher, B. E. (2017). STAC3 stably interacts through its C1 domain with CaV1.1 in skeletal muscle triads. *Sci Rep* 7, 41003.

Canton, M., Menazza, S., and Di Lisa, F. (2014). Oxidative stress in muscular dystrophy: from generic evidence to specific sources and targets. *J Muscle Res Cell Motil* 35, 23-36.

Carpenter, D., Ringrose, C., Leo, V., Morris, A., Robinson, R. L., Halsall, P. J., Hopkins, P. M., and Shaw, M. A. (2009). The role of CACNA1S in predisposition to malignant hyperthermia. *BMC Med Genet* 10, 104.

Caswell, A. H., Brandt, N. R., Brunschwig, J. P., and Purkerson, S. (1991). Localization and partial characterization of the oligomeric disulfide-linked molecular weight 95,000 protein (triadin) which binds the ryanodine and dihydropyridine receptors in skeletal muscle triadic vesicles. *Biochemistry* 30, 7507-7513.

Catterall, W. A. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a003947.

Cavel-Greant, D., Lehmann-Horn, F., and Jurkat-Rott, K. (2012). The impact of permanent muscle weakness on quality of life in periodic paralysis: a survey of 66 patients. *Acta Myol* 31, 126-133.

Cheng W., Altafaj X., Ronjat M., Coronado R. (2005) Interaction between the dihydropyridine receptor Ca²⁺ channel β -subunit and ryanodine receptor type 1 strengthens excitation-contraction coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 19225–19230

Claeys, K. G., Maisonobe, T., Bohm, J., Laporte, J., Hezode, M., Romero, N. B., Brochier, G., Bitoun, M., Carlier, R. Y., and Stojkovic, T. (2010). Phenotype of a patient with recessive centronuclear myopathy and a novel BIN1 mutation. *Neurology* 74, 519-521.

Cowling, B. S., Toussaint, A., Amoasii, L., Koebel, P., Ferry, A., Davignon, L., Nishino, I., Mandel, J. L., and Laporte, J. (2011). Increased expression of wild-type or a centronuclear myopathy mutant of dynamin 2 in skeletal muscle of adult mice leads to structural defects and muscle weakness. *Am J Pathol* 178, 2224-2235.

De Jongh, K. S., Warner, C., Colvin, A. A., and Catterall, W. A. (1991). Characterization of the two size forms of the alpha 1 subunit of skeletal muscle L-type calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10778-10782.

Dib, C., Faure, S., Fizames, C., Samson, D., Drouot, N., Vignal, A., Millasseau, P., Marc, S., Hazan, J., Seboun, E., *et al.* (1996). A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 380, 152-154.

Dirksen, R. T., and Avila, G. (2002). Altered ryanodine receptor function in central core disease: leaky or uncoupled Ca(2+) release channels? *Trends Cardiovasc Med* 12, 189-197.

Dolphin, A.C. (2013) The $\alpha 2\delta$ subunits of voltage-gated calcium channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1828, 7, 1541-1549.

Dowling, J. J., Arbogast, S., Hur, J., Nelson, D. D., McEvoy, A., Waugh, T., Marty, I., Lunardi, J., Brooks, S. V., Kuwada, J. Y., and Ferreira, A. (2012). Oxidative stress and successful antioxidant treatment in models of RYR1-related myopathy. *Brain* 135, 1115-1127.

Dowling, J. J., Vreede, A. P., Low, S. E., Gibbs, E. M., Kuwada, J. Y., Bonnemann, C. G., and Feldman, E. L. (2009). Loss of myotubularin function results in T-tubule disorganization in zebrafish and human myotubular myopathy. *PLoS Genet* 5, e1000372.

Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 47-95.

Dubowitz, V., and Pearse, A. G. (1960). Oxidative enzymes and phosphorylase in central-core disease of muscle. *Lancet* 2, 23-24.

Dulhunty, A., Wei, L., and Beard, N. (2009). Junctin - the quiet achiever. *J Physiol* 587, 3135-3137.

el-Hayek, R., Antoniu, B., Wang, J., Hamilton, S. L., and Ikemoto, N. (1995a). Identification of calcium release-triggering and blocking regions of the II-III loop of the skeletal muscle dihydropyridine receptor. *J Biol Chem* 270, 22116-22118.

El-Hayek, R., and Ikemoto, N. (1998). Identification of the minimum essential region in the II-III loop of the dihydropyridine receptor alpha 1 subunit required for activation of skeletal muscle-type excitation-contraction coupling. *Biochemistry* 37, 7015-7020.

el-Hayek, R., Lokuta, A. J., Arevalo, C., and Valdivia, H. H. (1995b). Peptide probe of ryanodine receptor function. Imperatoxin A, a peptide from the venom of the scorpion *Pandinus imperator*, selectively activates skeletal-type ryanodine receptor isoforms. *J Biol Chem* 270, 28696-28704.

Felix, R., Gurnett, R., De Waard, M., Campbell, K.P. (1997) Dissection of functional domains of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha2delta subunit. *J. Neurosci.*, 17 6884-6891

Fliegel, L., Ohnishi, M., Carpenter, M. R., Khanna, V. K., Reithmeier, R. A., and MacLennan, D. H. (1987). Amino acid sequence of rabbit fast-twitch skeletal muscle calsequestrin deduced from cDNA and peptide sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 1167-1171.

Flucher, B. E., and Tuluc, P. (2011). A new L-type calcium channel isoform required for normal patterning of the developing neuromuscular junction. *Channels (Austin)* 5, 518-524.

Franzini-Armstrong, C. (1984). Freeze-fracture of frog slow tonic fibers. Structure of surface and internal membranes. *Tissue Cell* 16, 647-664.

Gao, T., Cuadra, A. E., Ma, H., Bunemann, M., Gerhardstein, B. L., Cheng, T., Eick, R. T., and Hosey, M. M. (2001). C-terminal fragments of the alpha 1C (CaV1.2) subunit associate with and regulate L-type calcium channels containing C-terminal-truncated alpha 1C subunits. *J Biol Chem* 276, 21089-21097.

Geoffroy, V., Pizot, C., Redin, C., Piton, A., Vasli, N., Stoetzel, C., Blavier, A., Laporte, J., and Muller, J. (2015). VaRank: a simple and powerful tool for ranking genetic variants. *PeerJ* 3, e796.

Gianni, P., Jan, K. J., Douglas, M. J., Stuart, P. M., and Tarnopolsky, M. A. (2004). Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle. *Exp Gerontol* 39, 1391-1400.

Gibbs, E. M., Davidson, A. E., Telfer, W. R., Feldman, E. L., and Dowling, J. J. (2014). The myopathy-causing mutation DNM2-S619L leads to defective tubulation in vitro and in developing zebrafish. *Dis Model Mech* 7, 157-161.

Giulivi, C., Ross-Inta, C., Omanska-Klusek, A., Napoli, E., Sakaguchi, D., Barrientos, G., Allen, P. D., and Pessah, I. N. (2011). Basal bioenergetic abnormalities in skeletal muscle from

ryanodine receptor malignant hyperthermia-susceptible R163C knock-in mice. *J Biol Chem* 286, 99-113.

Gold, R., and Reichmann, H. (1992). Muscle pathology correlates with permanent weakness in hypokalemic periodic paralysis: a case report. *Acta Neuropathol* 84, 202-206.

Gomez-Cabrera, M. C., Domenech, E., and Vina, J. (2008). Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med* 44, 126-131.

Gurnett, C. A., De Waard, M., and Campbell, K. P. (1996). Dual function of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha 2 delta subunit in current stimulation and subunit interaction. *Neuron* 16, 431-440.

Gurnett, C.A., Felix, R., Campbell, K.P. (1997) Extracellular interaction of the voltage-dependent Ca²⁺ channel $\alpha 2\delta$ and $\alpha 1$ subunits. *J. Biol. Chem.* 272, 18508-18512

Hernandez-Lain, A., Husson, I., Monnier, N., Farnoux, C., Brochier, G., Lacene, E., Beuvin, M., Viou, M., Manere, L., Claeys, K. G., *et al.* (2011). De novo RYR1 heterozygous mutation (I4898T) causing lethal core-rod myopathy in twins. *Eur J Med Genet* 54, 29-33.

Horstick, E. J., Linsley, J. W., Dowling, J. J., Hauser, M. A., McDonald, K. K., Ashley-Koch, A., Saint-Amant, L., Satish, A., Cui, W. W., Zhou, W., *et al.* (2013). Stac3 is a component of the excitation-contraction coupling machinery and mutated in Native American myopathy. *Nat Commun* 4, 1952.

Hulme, J. T., Konoki, K., Lin, T. W., Gritsenko, M. A., Camp, D. G., 2nd, Bigelow, D. J., and Catterall, W. A. (2005). Sites of proteolytic processing and noncovalent association of the distal C-terminal domain of CaV1.1 channels in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5274-5279.

Ishikawa, H. (1968). Formation of elaborate networks of T-system tubules in cultured skeletal muscle with special reference to the T-system formation. *J Cell Biol* 38, 51-66.

Jay, S.D., Sharp, A.H., Kahl, S.D., Vedvick, T.S., Harpold, M.M., Campbell, K.P. (1991). Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel $\alpha 2$ -subunit and the associated δ peptides. *J. Biol. Chem.*, 266, 3287-3293

Jungbluth, H., Zhou, H., Sewry, C. A., Robb, S., Treves, S., Bitoun, M., Guicheney, P., Buj-Bello, A., Bonnemann, C., and Muntoni, F. (2007). Centronuclear myopathy due to a de novo dominant mutation in the skeletal muscle ryanodine receptor (RYR1) gene. *Neuromuscul Disord* 17, 338-345.

Jurynek, M. J., Xia, R., Mackrill, J. J., Gunther, D., Crawford, T., Flanigan, K. M., Abramson, J. J., Howard, M. T., and Grunwald, D. J. (2008). Selenoprotein N is required for ryanodine receptor calcium release channel activity in human and zebrafish muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 12485-12490.

- Karunasekara Y, Rebbeck RT, Weaver LM, Board PG, Dulhunty AF, Casarotto MG. (2012) An α -helical C-terminal tail segment of the skeletal L-type Ca^{2+} channel $\beta 1\text{a}$ subunit activates ryanodine receptor type 1 via a hydrophobic surface. *FASEB J.* 12, 5049-59.
- Komazaki, S., Nishi, M., Takeshima, H., and Nakamura, H. (2001). Abnormal formation of sarcoplasmic reticulum networks and triads during early development of skeletal muscle cells in mitsugumin29-deficient mice. *Dev Growth Differ* 43, 717-723.
- Kraeva, N., Zvaritch, E., Rossi, A. E., Goonasekera, S. A., Zaid, H., Frodis, W., Kraev, A., Dirksen, R. T., MacLennan, D. H., and Riazi, S. (2013). Novel excitation-contraction uncoupled RYR1 mutations in patients with central core disease. *Neuromuscul Disord* 23, 120-132.
- Kugler, G., Weiss, R. G., Flucher, B. E., and Grabner, M. (2004). Structural requirements of the dihydropyridine receptor $\alpha 1\text{S}$ II-III loop for skeletal-type excitation-contraction coupling. *J Biol Chem* 279, 4721-4728.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- Lavorato, M., Gupta, P. K., Hopkins, P. M., and Franzini-Armstrong, C. (2016). Skeletal Muscle Microalterations in Patients Carrying Malignant Hyperthermia-Related Mutations of the e-c Coupling Machinery. *Eur J Transl Myol* 26, 6105.
- Lawler, J. M. (2011). Exacerbation of pathology by oxidative stress in respiratory and locomotor muscles with Duchenne muscular dystrophy. *J Physiol* 589, 2161-2170.
- Lee, E., Marcucci, M., Daniell, L., Pypaert, M., Weisz, O. A., Ochoa, G. C., Farsad, K., Wenk, M. R., and De Camilli, P. (2002). Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science* 297, 1193-1196.
- Leung, A. T., Imagawa, T., Block, B., Franzini-Armstrong, C., and Campbell, K. P. (1988). Biochemical and ultrastructural characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor from rabbit skeletal muscle. Evidence for a 52,000 Da subunit. *J Biol Chem* 263, 994-1001.
- Matthews, E., Labrum, R., Sweeney, M. G., Sud, R., Haworth, A., Chinnery, P. F., Meola, G., Schorge, S., Kullmann, D. M., Davis, M. B., and Hanna, M. G. (2009). Voltage sensor charge loss accounts for most cases of hypokalemic periodic paralysis. *Neurology* 72, 1544-1547.
- McEntagart, M., Parsons, G., Buj-Bello, A., Biancalana, V., Fenton, I., Little, M., Krawczak, M., Thomas, N., Herman, G., Clarke, A., and Wallgren-Pettersson, C. (2002). Genotype-phenotype correlations in X-linked myotubular myopathy. *Neuromuscul Disord* 12, 939-946.
- Monnier, N., Procaccio, V., Stieglitz, P., and Lunardi, J. (1997). Malignant-hyperthermia susceptibility is associated with a mutation of the $\alpha 1$ -subunit of the human dihydropyridine-sensitive L-type voltage-dependent calcium-channel receptor in skeletal muscle. *Am J Hum Genet* 60, 1316-1325.

Morrisette, J., Kratzschmar, J., Haendler, B., el-Hayek, R., Mochca-Morales, J., Martin, B. M., Patel, J. R., Moss, R. L., Schleuning, W. D., Coronado, R., and et al. (1995). Primary structure and properties of helothermine, a peptide toxin that blocks ryanodine receptors. *Biophys J* 68, 2280-2288.

Nakai, J., Tanabe, T., Konno, T., Adams, B., and Beam, K. G. (1998). Localization in the II-III loop of the dihydropyridine receptor of a sequence critical for excitation-contraction coupling. *J Biol Chem* 273, 24983-24986.

Nelson, B. R., Wu, F., Liu, Y., Anderson, D. M., McAnally, J., Lin, W., Cannon, S. C., Bassel-Duby, R., and Olson, E. N. (2013). Skeletal muscle-specific T-tubule protein STAC3 mediates voltage-induced Ca²⁺ release and contractility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 11881-11886.

Nicot, A. S., Toussaint, A., Tosch, V., Kretz, C., Wallgren-Pettersson, C., Iwarsson, E., Kingston, H., Garnier, J. M., Biancalana, V., Oldfors, A., et al. (2007). Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nat Genet* 39, 1134-1139.

Pai, A. C. (1965a). Developmental Genetics of a Lethal Mutation, Muscular Dysgenesis (Mdg), in the Mouse. I. Genetic Analysis and Gross Morphology. *Dev Biol* 11, 82-92.

Pai, A. C. (1965b). Developmental Genetics of a Lethal Mutation, Muscular Dysgenesis (Mdg), in the Mouse. II. Developmental Analysis. *Dev Biol* 11, 93-109.

Paolini, C., Quarta, M., Nori, A., Boncompagni, S., Canato, M., Volpe, P., Allen, P. D., Reggiani, C., and Protasi, F. (2007). Reorganized stores and impaired calcium handling in skeletal muscle of mice lacking calsequestrin-1. *J Physiol* 583, 767-784.

Phimister, A. J., Lango, J., Lee, E. H., Ernst-Russell, M. A., Takeshima, H., Ma, J., Allen, P. D., and Pessah, I. N. (2007). Conformation-dependent stability of junctophilin 1 (JP1) and ryanodine receptor type 1 (RyR1) channel complex is mediated by their hyper-reactive thiols. *J Biol Chem* 282, 8667-8677.

Piétri-Rouxel, F., Gentil, C., Vassilopoulos, S., Baas, D., Mouisel, E., Ferry, A., ... Garcia, L. (2010). DHPR α 1S subunit controls skeletal muscle mass and morphogenesis. *The EMBO Journal*, 29(3), 643-654.

Pirone, A., Schredelseker, J., Tuluc, P., Gravino, E., Fortunato, G., Flucher, B. E., Carsana, A., Salvatore, F., and Grabner, M. (2010). Identification and functional characterization of malignant hyperthermia mutation T1354S in the outer pore of the Cav α 1S-subunit. *Am J Physiol Cell Physiol* 299, C1345-1354.

Polster, A., Nelson, B. R., Olson, E. N., and Beam, K. G. (2016). Stac3 has a direct role in skeletal muscle-type excitation-contraction coupling that is disrupted by a myopathy-causing mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 10986-10991.

- Polster, A., Perni, S., Bichraoui, H., and Beam, K. G. (2015). Stac adaptor proteins regulate trafficking and function of muscle and neuronal L-type Ca²⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* *112*, 602-606.
- Powers, S. K., and Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* *88*, 1243-1276.
- Proenza, C., Wilkens, C. M., and Beam, K. G. (2000). Excitation-contraction coupling is not affected by scrambled sequence in residues 681-690 of the dihydropyridine receptor II-III loop. *J Biol Chem* *275*, 29935-29937.
- Reinholt, B. M., Ge, X., Cong, X., Gerrard, D. E., and Jiang, H. (2013). Stac3 is a novel regulator of skeletal muscle development in mice. *PLoS One* *8*, e62760.
- Robinson, R., Carpenter, D., Shaw, M. A., Halsall, J., and Hopkins, P. (2006). Mutations in RYR1 in malignant hyperthermia and central core disease. *Hum Mutat* *27*, 977-989.
- Robinson, R. L., Brooks, C., Brown, S. L., Ellis, F. R., Halsall, P. J., Quinnell, R. J., Shaw, M. A., and Hopkins, P. M. (2002). RYR1 mutations causing central core disease are associated with more severe malignant hyperthermia in vitro contracture test phenotypes. *Hum Mutat* *20*, 88-97.
- Romero, N. B. (2010). Centronuclear myopathies: a widening concept. *Neuromuscul Disord* *20*, 223-228.
- Romero, N. B., Monnier, N., Viollet, L., Cortey, A., Chevally, M., Leroy, J. P., Lunardi, J., and Fardeau, M. (2003). Dominant and recessive central core disease associated with RYR1 mutations and fetal akinesia. *Brain* *126*, 2341-2349.
- Rossi, D., Barone, V., Giacomello, E., Cusimano, V., and Sorrentino, V. (2008). The sarcoplasmic reticulum: an organized patchwork of specialized domains. *Traffic* *9*, 1044-1049.
- Ryan, M. M., Schnell, C., Strickland, C. D., Shield, L. K., Morgan, G., Iannaccone, S. T., Laing, N. G., Beggs, A. H., and North, K. N. (2001). Nemaline myopathy: a clinical study of 143 cases. *Ann Neurol* *50*, 312-320.
- Schiaffino, S., and Margreth, A. (1969). Coordinated development of the sarcoplasmic reticulum and T system during postnatal differentiation of rat skeletal muscle. *J Cell Biol* *41*, 855-875.
- Schneider, M. F., and Chandler, W. K. (1973). Voltage dependent charge movement of skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling. *Nature* *242*, 244-246.
- Schredelseker, J., Dayal, A., Schwerte, T., Franzini-Armstrong, C., Grabner, M. (2009) Proper restoration of excitation-contraction coupling in the dihydropyridine receptor β 1-null zebrafish relaxed is an exclusive function of the β 1a subunit. *J. Biol. Chem.* *284*, 1242-1251

Scott, B. T., Simmerman, H. K., Collins, J. H., Nadal-Ginard, B., and Jones, L. R. (1988). Complete amino acid sequence of canine cardiac calsequestrin deduced by cDNA cloning. *J Biol Chem* 263, 8958-8964.

Sheridan, D. C., Cheng, W., Ahern, C. A., Mortenson, L., Alsammarae, D., Vallejo, P., Coronado, R. (2003) Truncation of the carboxyl terminus of the dihydropyridine receptor β 1a subunit promotes Ca^{2+} dependent excitation-contraction coupling in skeletal myotubes. *Biophys. J.* 84, 220–237

Shuaib, A., Paasuke, R. T., and Brownell, K. W. (1987). Central core disease. Clinical features in 13 patients. *Medicine (Baltimore)* 66, 389-396.

Stamm, D. S., Aylsworth, A. S., Stajich, J. M., Kahler, S. G., Thorne, L. B., Speer, M. C., and Powell, C. M. (2008a). Native American myopathy: congenital myopathy with cleft palate, skeletal anomalies, and susceptibility to malignant hyperthermia. *Am J Med Genet A* 146A, 1832-1841.

Stamm, D. S., Powell, C. M., Stajich, J. M., Zismann, V. L., Stephan, D. A., Chesnut, B., Aylsworth, A. S., Kahler, S. G., Deak, K. L., Gilbert, J. R., and Speer, M. C. (2008b). Novel congenital myopathy locus identified in Native American Indians at 12q13.13-14.1. *Neurology* 71, 1764-1769.

Suh-Kim, H., Wei, X.Y., Birnbaumer, L. (1996) Subunit composition is a major determinant in high affinity binding of a Ca^{2+} channel blocker. *Mol. Pharmacol.* 50, 1330-1337

Takekura, H., Flucher, B. E., and Franzini-Armstrong, C. (2001). Sequential docking, molecular differentiation, and positioning of T-Tubule/SR junctions in developing mouse skeletal muscle. *Dev Biol* 239, 204-214.

Takekura, H., Nishi, M., Noda, T., Takeshima, H., and Franzini-Armstrong, C. (1995). Abnormal junctions between surface membrane and sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle with a mutation targeted to the ryanodine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3381-3385.

Takeshima, H., Iino, M., Takekura, H., Nishi, M., Kuno, J., Minowa, O., Takano, H., and Noda, T. (1994). Excitation-contraction uncoupling and muscular degeneration in mice lacking functional skeletal muscle ryanodine-receptor gene. *Nature* 369, 556-559.

Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T., and Numa, S. (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328, 313-318.

Terrill, J. R., Radley-Crabb, H. G., Iwasaki, T., Lemckert, F. A., Arthur, P. G., and Grounds, M. D. (2013). Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies. *FEBS J* 280, 4149-4164.

Toussaint, A., Cowling, B. S., Hnia, K., Mohr, M., Oldfors, A., Schwab, Y., Yis, U., Maisonobe, T., Stojkovic, T., Wallgren-Pettersson, C., *et al.* (2011). Defects in amphiphysin 2

(BIN1) and triads in several forms of centronuclear myopathies. *Acta Neuropathol* 121, 253-266.

Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., *et al.* (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.

Wang, L., Barylko, B., Byers, C., Ross, J. A., Jameson, D. M., and Albanesi, J. P. (2010). Dynamin 2 mutants linked to centronuclear myopathies form abnormally stable polymers. *J Biol Chem* 285, 22753-22757.

Wei, L., Gallant, E. M., Dulhunty, A. F., and Beard, N. A. (2009). Junctin and triadin each activate skeletal ryanodine receptors but junctin alone mediates functional interactions with calsequestrin. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 2214-2224.

Weiss, R. G., O'Connell, K. M., Flucher, B. E., Allen, P. D., Grabner, M., and Dirksen, R. T. (2004). Functional analysis of the R1086H malignant hyperthermia mutation in the DHPR reveals an unexpected influence of the III-IV loop on skeletal muscle EC coupling. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C1094-1102.

Wheeler, D. A., Srinivasan, M., Egholm, M., Shen, Y., Chen, L., McGuire, A., He, W., Chen, Y. J., Makhijani, V., Roth, G. T., *et al.* (2008). The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature* 452, 872-876.

Wilkins, C. M., Kasielke, N., Flucher, B. E., Beam, K. G., and Grabner, M. (2001). Excitation-contraction coupling is unaffected by drastic alteration of the sequence surrounding residues L720-L764 of the alpha 1S II-III loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5892-5897.

Williams, I. A., and Allen, D. G. (2007). The role of reactive oxygen species in the hearts of dystrophin-deficient mdx mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293, H1969-1977.

Wilmshurst, J. M., Lillis, S., Zhou, H., Pillay, K., Henderson, H., Kress, W., Muller, C. R., Ndondo, A., Cloke, V., Cullup, T., *et al.* (2010). RYR1 mutations are a common cause of congenital myopathies with central nuclei. *Ann Neurol* 68, 717-726.

Wu, J., Yan, Z., Li, Z., Qian, X., Lu, S., Dong, M., Zhou, Q., and Yan, N. (2016). Structure of the voltage-gated calcium channel Ca(v)1.1 at 3.6 Å resolution. *Nature* 537, 191-196.

Zhang, L., Kelley, J., Schmeisser, G., Kobayashi, Y. M., and Jones, L. R. (1997). Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 272, 23389-23397.

Zhou, H., Rokach, O., Feng, L., Munteanu, I., Mamchaoui, K., Wilmshurst, J. M., Sewry, C., Manzur, A. Y., Pillay, K., Mouly, V., *et al.* (2013). RyR1 deficiency in congenital myopathies disrupts excitation-contraction coupling. *Hum Mutat* 34, 986-996.

Zvaritch, E., Kraeva, N., Bombardier, E., McCloy, R. A., Depreux, F., Holmyard, D., Kraev, A., Seidman, C. E., Seidman, J. G., Tupling, A. R., and MacLennan, D. H. (2009). Ca²⁺

dysregulation in Ryr1(I4895T/wt) mice causes congenital myopathy with progressive formation of minicores, cores, and nemaline rods. Proc Natl Acad Sci U S A *106*, 21813-21818.

Resources WEB et logiciels :

dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>

ExAC Browser, <http://exac.broadinstitute.org/>

Gnomad Browser <http://gnomad.broadinstitute.org/>

GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

GeneTable of Neuromuscular Disorders, <http://www.musclegenetable.fr/>

GTEEx Portal, <http://www.gtexportal.org/>

International Mouse Phenotyping Consortium, <http://www.mousephenotype.org/>

OMIM, <http://www.omim.org/>

Alamut Visual <http://www.interactive-biosoftware.com/fr/alamut-visual/>

Publications

Variants in the Oxidoreductase PYROXD1 Cause Early-Onset Myopathy with Internalized Nuclei and Myofibrillar Disorganization

Gina L. O'Grady,^{1,2,3,25} Heather A. Best,^{1,2,25} Tamar E. Sztal,^{4,25} Vanessa Schartner,^{5,26} Myriam Sanjuan-Vazquez,^{6,26} Sandra Donkervoort,^{7,26} Osorio Abath Neto,⁵ Roger Bryan Sutton,⁸ Biljana Ilkovski,¹ Norma Beatriz Romero,^{9,10} Tanya Stojkovic,¹⁰ Jahannaz Dastgir,⁷ Leigh B. Waddell,¹ Anne Boland,¹¹ Ying Hu,⁷ Caitlin Williams,⁴ Avnika A. Ruparelia,⁴ Thierry Maissonobe,¹⁰ Anthony J. Peduto,¹² Stephen W. Reddel,¹³ Monkol Lek,^{14,15} Taru Tukiainen,^{14,15} Beryl B. Cummings,^{14,15} Himanshu Joshi,¹ Juliette Nectoux,^{16,17} Susan Brammah,¹⁸ Jean-François Deleuze,¹¹ Viola Oorschot Ing,¹⁹ Georg Ramm,^{19,20} Didem Ardicli,²¹ Kristen J. Nowak,²² Beril Talim,²¹ Haluk Topaloglu,²¹ Nigel G. Laing,²² Kathryn N. North,^{1,23} Daniel G. MacArthur,^{14,15} Sylvie Friant,⁶ Nigel F. Clarke,^{1,2} Robert J. Bryson-Richardson,⁴ Carsten G. Bönnemann,⁷ Jocelyn Laporte,^{5,24,27} and Sandra T. Cooper^{1,2,27,*}

This study establishes *PYROXD1* variants as a cause of early-onset myopathy and uses biospecimens and cell lines, yeast, and zebrafish models to elucidate the fundamental role of *PYROXD1* in skeletal muscle. Exome sequencing identified recessive variants in *PYROXD1* in nine probands from five families. Affected individuals presented in infancy or childhood with slowly progressive proximal and distal weakness, facial weakness, nasal speech, swallowing difficulties, and normal to moderately elevated creatine kinase. Distinctive histopathology showed abundant internalized nuclei, myofibrillar disorganization, desmin-positive inclusions, and thickened Z-bands. *PYROXD1* is a nuclear-cytoplasmic pyridine nucleotide-disulphide reductase (PNDR). PNDRs are flavoproteins (FAD-binding) and catalyze pyridine-nucleotide-dependent (NAD/NADH) reduction of thiol residues in other proteins. Complementation experiments in yeast lacking glutathione reductase *glr1* show that human *PYROXD1* has reductase activity that is strongly impaired by the disease-associated missense mutations. Immunolocalization studies in human muscle and zebrafish myofibers demonstrate that *PYROXD1* localizes to the nucleus and to striated sarcomeric compartments. Zebrafish with *ryroxD1* knock-down recapitulate features of *PYROXD1* myopathy with sarcomeric disorganization, myofibrillar aggregates, and marked swimming defect. We characterize variants in the oxidoreductase *PYROXD1* as a cause of early-onset myopathy with distinctive histopathology and introduce altered redox regulation as a primary cause of congenital muscle disease.

Introduction

Myopathies are a group of genetically heterogeneous conditions characterized by muscle weakness, with overlap in the clinical presentation and histopathological features of different genetic subtypes.¹ Within this group, congenital

myopathies are most commonly characterized by hypotonia and weakness, often from birth, commonly with the presence of facial weakness, with or without ptosis and ophthalmoplegia. There are 25 recognized genetic causes of congenital myopathy (see GeneTable in [Web Resources](#)); currently a genetic diagnosis is achieved in only ~50% of

¹Institute for Neuroscience and Muscle Research, Kid's Research Institute, Children's Hospital at Westmead, Sydney, NSW 2145, Australia; ²Discipline of Paediatrics and Child Health, Faculty of Medicine, University of Sydney, Sydney, NSW 2006, Australia; ³Paediatric Neurology Service, Starship Children's Health, Auckland 1023, New Zealand; ⁴School of Biological Sciences, Monash University, Melbourne, VIC 3800, Australia; ⁵Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), 67400 Illkirch, France; ⁶Department of Molecular and Cellular Genetics, UMR7156, Université de Strasbourg, CNRS, Strasbourg 67081, France; ⁷National Institute of Neurological Disorders and Stroke Neurogenetics Branch, Neuromuscular and Neurogenetic Disorders of Childhood Section, NIH, Bethesda, MD 20892-1477, USA; ⁸Department of Cell Physiology and Molecular Biophysics, and Center for Membrane Protein Research, Texas Tech University Health Sciences Center, Lubbock, TX 79430, USA; ⁹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM UMRS974, CNRS FRE3617, Center for Research in Myology, GH Pitié-Salpêtrière, 47 Boulevard de l'hôpital, 75013 Paris, France; ¹⁰Centre de Référence de Pathologie Neuromusculaire Paris-Est, Institut de Myologie, GHU La Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 7503 Paris, France; ¹¹Centre National de Génotypage, Institut de Génétique, CEA, CP5721, 91057 Evry, France; ¹²Department of Radiology, Westmead Hospital, Western Clinical School, University of Sydney, Sydney, NSW 1024, Australia; ¹³Department of Neurology, Concord Clinical School, University of Sydney, Sydney, NSW 2139, Australia; ¹⁴Analytic and Translational Genetics Unit, Massachusetts General Hospital, Boston, MA 02114, USA; ¹⁵Broad Institute of Harvard and Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02142, USA; ¹⁶Service de Biochimie et Génétique Moléculaire, HUPC Hôpital Cochin, Paris 75014, France; ¹⁷INSERM, U1016, Institut Cochin, CNRS UMR8104, Université Paris Descartes, Paris 75014, France; ¹⁸Electron Microscope Unit, Concord Repatriation General Hospital, Concord, NSW 2139, Australia; ¹⁹The Clive and Vera Ramaciotti Centre for Structural Cryo-Electron Microscopy, Monash University, Melbourne, VIC 3800, Australia; ²⁰Department of Biochemistry and Molecular Biology, Monash University, Melbourne, VIC 3800, Australia; ²¹Department of Pediatric Neurology, Hacettepe University Children's Hospital, 06100 Ankara, Turkey; ²²Centre for Medical Research, The University of Western Australia & the Harry Perkins Institute of Medical Research, Perth, WA 6009, Australia; ²³Murdoch Children's Research Institute, The Royal Children's Hospital, Flemington Road, Parkville, VIC 3052, Australia; ²⁴Université de Strasbourg, 67081 Illkirch, France

²⁵These authors contributed equally to this work

²⁶These authors contributed equally to this work

²⁷These authors contributed equally to this work

*Correspondence: sandra.cooper@sydney.edu.au
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.09.005>

© 2016 American Society of Human Genetics.

patients,^{2,3} driving ongoing gene discovery. The introduction of next-generation sequencing technologies has seen a rapid acceleration in the identification of new genetic causes of neuromuscular disorders.^{4,5}

Through international whole-exome sequencing programs in Australia, France, the United States, and Turkey, we identified five families (nine probands) with four different recessive variants (missense and splicing variants) in *PYROXD1*. *PYROXD1* is located at 12p12.1 and encodes pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase domain-containing protein 1, a 500 amino acid protein previously undescribed in published literature. Pyridine nucleotide-disulphide reductases (PNDRs) are flavoproteins (FAD-binding) and catalyze the pyridine nucleotide (NAD/NADH)-dependent reduction of cysteine residues in their substrates.⁶ PNDRs catalyze complex reduction reactions and use several steps of electron transfer via their enzymatic co-factors FAD and NAD. Although functionally uncharacterized, PYROXD1 is classified as a class 1 oxidoreductase and bears two putative enzymatic domains: a pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase domain (amino acids 39–361) and a NADH-dependent nitrite reductase domain (amino acids 447–494) (see Figure 3).

Herein we establish PYROXD1 as a nuclear-cytoplasmic oxidoreductase that underlies an early-onset myopathy characterized by generalized weakness with multiple internalized nuclei and myofibrillar aggregates on biopsy.

Subjects and Methods

Genetic Analysis

Family A was the index family identified through whole-exome sequencing of a large cohort of undiagnosed myopathy and dystrophy patients (367 individuals from 193 families) recruited from The Institute for Neuroscience and Muscle Research (Sydney, Australia). No further families were identified in this cohort with PYROXD1-related disease. Exome sequencing was performed on gDNA from both brothers and their unaffected parents at the Broad Institute using the XBrowse bioinformatics platform as described previously.⁷ Family B was identified through the French Myocapture project (1,000 exomes from 397 families with myopathies or dystrophies). Exome sequencing was performed for both affected brothers and their parents at Centre National de Génotypage (CNG, Evry, France). Common variants (>1%) found in dbSNP, 1000 Genomes, Exome Variant Server, and an internal database of 1,550 exomes including ethnically matched individuals were filtered out. The Varank pipeline was used for variants scoring and ranking.⁸ Data were filtered for homozygous recessive variants based on the known consanguinity of the family. Family B was the only family identified with recessive *PYROXD1* variants in the Myocapture cohort. For family C, exome sequencing was performed through the NIH Intramural Sequencing Center (NISC) on genomic DNA obtained from both affected siblings. Data were analyzed using a custom analysis program, MPG (Most Probable Genotype) based on a probabilistic Bayesian algorithm.⁹ For families D and E, exome sequencing was performed on gDNA from both siblings and unaffected par-

ents at the Theragen Etx Bio Institute. ANNOVAR was used to functionally annotate genetic variants.¹⁰ Table S1 provides a list of recessive variants shown to segregate with disease for each family.

Phylogenetic Analysis and Calculation of the PYROXD1 Homology Model

PYROXD1 sequence alignments were performed using CLUSTAL.¹¹ Identity and similarity were calculated using Sequence Manipulation Suite.^{12,13} Modeler¹⁴ was used to compare the primary sequence of PYROXD1 with homologous proteins in the PDB database. The primary sequence of PYROXD1 was aligned with eight of the most similar protein sequences determined from Modeler using Promals3D:¹⁵ *Shewanella* PV-4 NADH-dependent persulfide reductase (PDB: 3NTD), *Staphylococcus* Coenzyme A-disulfide reductase (PDB: 1YQZ), *Bacillus* Coenzyme A-disulfide reductase (PDB: 3CGC), *Novosphingobium* ferredoxin reductase (PDB: 3LXD), *Rhodospseudomonas* ferredoxin reductase (PDB: 3FG2), *Pseudomonas p.* putidaredoxin reductase (PDB: 1Q1R), *Pseudomonas sp.* ferredoxin reductase (PDB: 2GQW), and *Enterococcus* NADH peroxidase (PDB: 1NHQ). Modeler was used to compute the homology model of human PYROXD1 using information from all eight homologous crystal structures. The resulting model with the lowest energy was further refined using Modrefiner.¹⁶ FAD binding residues were determined via the 3DLigandSite server.¹⁷ Figures were generated with Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, v.1.8, Schrödinger, LLC).

Western Blot

Western blot of skeletal muscle and skin fibroblasts was carried out as described in Yuen et al.¹⁸ Primary antibodies used were anti-PYROXD1 (1:1,000; Abcam cat# ab122458; RRID: AB_11129858), β -tubulin (1:1,000; E7, Developmental Studies Hybridoma bank), GAPDH (1:10,000; Millipore cat# MAB374; RRID: AB_2107445), Emerin (NCL 1:300, Novocastra), and sarcomeric alpha-actinin (EA-53 1:2,500, Sigma-Aldrich). For zebrafish, embryos were devalved and protein extracted as described.¹⁹ 13 μ L of protein sample was reduced using NuPAGE Reducing Agent (Thermo Fisher) and equal amounts loaded onto a NuPAGE 4%–12% Bis-Tris Gel using MES SDS running buffer (Thermo Fisher). Membranes were blocked and probed with antibodies diluted in 1 \times phosphate-buffered saline, 0.1% Tween20 (Sigma-Aldrich), and 5% skim milk. Primary antibodies used were 1:1,000 anti-Ryrox1-C (Abmart), 1:1,000 anti-GFP (Abcam cat# ab137827), and 1:2,000 α -tubulin (Sigma-Aldrich cat# T6074; RRID: AB_477582). The secondary antibody used was 1:10,000 HRP-conjugated mouse IgG (Southern Biotech) and developed using chemiluminescent detection (GE Life Sciences). For yeast, total yeast extracts were obtained by NaOH lysis followed by TCA precipitation. The equivalent of 1.5 OD_{600nm} unit of yeast cells were resuspended in 50 μ L of 2 \times Laemmli buffer plus Tris Base. Samples were incubated 5 min at 37°C and analyzed by 10% SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-PYROXD1 (1:500), polyclonal R3500 produced in rabbit with human PYROXD1 immunogen amino acid 488–500 (Cys Leu Leu Asp Pro Asn Ile Asp Ile Glu Asp Tyr Phe Asp). Images were acquired with the ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad).

Immunostaining and Microscopy

For skeletal muscle, 8 μ m muscle cryosections were fixed in 3% paraformaldehyde for 15 min, extracted with cold methanol for

10 min, and probed with primary antibodies diluted in 2% BSA/PBS for 16 hr at 4°C: PYROXD1 (1:50; Abcam cat# ab122458 or ab204560; RRID: AB_11129858), desmin (1:50; NCL-Des, Novacastra), myosin (1:20; RS034, Novacastra), and lamin A/C (1:80; NCL-LAM-A/C, Novacastra). After washing in PBS, samples were incubated with secondary antibody for 1 hr at room temperature, washed, and mounted with ProLong Gold with DAPI antifade reagent (Life Technologies). Goat anti-rabbit IgG^{Alexa555} goat anti-mouse IgG^{Alexa488} (H+L) (1:200, A21428 and A110018, Life Technologies). Specimens were imaged on a Leica SP5 confocal microscope. For zebrafish, 4% paraformaldehyde (PFA)-fixed 2 dpf whole-mount or 4 dpf whole-mount and vibratome-sectioned embryos were stained as described.¹⁹ Antibodies used were α -actinin2 (Sigma clone A7811, 1:100) and an AlexaFluor-labeled-488 secondary antibody (Molecular Probes, 1:200) and rhodamine-Phalloidin (Molecular Probes, 1:200). Imaging was performed with an LSM 710 confocal microscope (Zeiss), using a 20 \times 1.0 numerical aperture water-dipping objective.

For yeast, living cells expressing EGFP C-terminal-tagged PYROXD1, PYROXD1-Asn155Ser, or -Gln372His were imaged on a fluorescence Axio Observer D1 microscope (Zeiss) using GFP filter and DIC optics with 100 \times /1.45 oil objective (Zeiss). Images were captured with a CoolSnap HQ2 photometrix camera (Roper Scientific).

Cell Culture, Constructs, cDNA Synthesis, and Transfections

HEK293 cells were cultured and transfected as described.²⁰ Cos-7 cells and primary human fibroblasts were cultured in DMEM/F12 with 10% FBS and 1:200 gentamycin (all from Life Technologies). Cos7 cells were transfected with Lipofectamine LTX (15338-100, Life Technologies) as per the manufacturer's instructions in 10 cm² dishes. Human *PYROXD1* cDNA (GenBank: NM_024854) was cloned into pEGFP-CI (Genscript) via BspEI/SalI. GFP was then removed via AgeI/BspEI. RNA extraction of primary human fibroblasts was carried out using TRIzol (Invitrogen) and alcohol precipitation. cDNA was synthesized using random primers p(dn)₆ (Roche 11043921) or Oligo(dt)₂₀ primers (Invitrogen 55063) and Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen 56575) according to the manufacturer's instructions. Primers used for PCR of *PYROXD1* cDNA were exon 1 F: 5'-AGGGAAGTTCGTGGTGGTC-3'; exon 6 R: 5'-TGGCC CAAATCACTTCACAG-3'; exon 12 R: 5'-AGGACGAGAATACAT CAAAGTCG-3'.

Plasmids, Strains, Media, and Methods for Yeast Cells

The PYROXD1 and missense mutants p.Asn155Ser or p.Gln372His cDNA sequences were cloned into pDONR221 entry vector (Invitrogen) and then into yeast destination vectors (Addgene) via the Gateway (Invitrogen) method to obtain the pAG415-promGPD-PYROXD1, p.Asn155Ser or p.Gln372His (pSF371 to pSF373) and pAG415-promGPD-PYROXD1-EGFP, p.Asn155Ser or p.Gln372His (pSF374 to pSF376) plasmids. Plasmid sequences were verified (GATC Biotech). *S. cerevisiae* strains used were BY4742 WT (*MAT α leu2 Δ 0 ura3 Δ 0 his3 Δ 0 lys2 Δ 0*) and *glr1 Δ* (BY4742 *glr1:kanMX*). Yeast were grown in YPD-rich medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) or in Synthetic Medium (SD): 0.67% yeast nitrogen base (YNB) without amino acids, 2% glucose, and the appropriate -Leu dropout mix to maintain the plasmid. Yeast cells were transformed using the modified lithium acetate method.²¹

Zebrafish

Production of Transgenic Constructs, Morpholino Injections, and RNA Rescue Experiments

Zebrafish were maintained according to standard protocols.²² Transgenic constructs were assembled with the modular tol2 kit. N-terminal eGFP-tagged wild-type or mutant PYROXD1 constructs were created using p5E-act1b,²³ p5E-SP6-CMV,²⁴ p3E-pA, and pDEST-Tol2-pA2. Transgenic constructs used were act1b-h2afv-mCherry²⁴ and act1b-actinin3-mCherry.²⁵ For morpholino injections, ryroxd1 morpholinos (splice MO: 5'-TCGATGG TTTCTTACCTGTTCTGCA-3', 0.25 mM and ATG MO: 5'-CCATT GAACCTCAGCACATGGAGAT-3', 0.25 mM) and GFP morpholino (5'-GTTCTTCTCCTTTACTCAGGATC-3', 0.5 mM) were diluted in distilled water and co-injected with Cascade Blue-labeled dextran (Molecular Probes) into one-cell embryos. For RNA rescue experiments, wild-type PYROXD1-eGFP RNA, lacking the morpholino binding site, was synthesized using the mMessage mMachine SP6 Transcription Kit (Ambion). RNA was co-injected at a concentration of either 0.5 or 1 ng/ μ L into one-cell stage embryos with Cascade Blue. Injected embryos were sorted for Cascade Blue labeling prior to analysis.

In Situ Hybridization

Whole-mount in situ hybridization was carried out as described previously.²⁶ Probes were constructed using specific gene primers (F: 5'-AGAAACCGAAGATGGTCAGAGA-3' and R: 5'-GAGCGAA GACGCTTCTCTTCTA-3'). Imaging was performed with an Olympus SZX16 stereomicroscope.

cDNA Synthesis and Quantitative PCR

Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies) and cDNA was synthesized using Protoscript first strand cDNA synthesis kit (New England Biosciences). Quantitative PCR (qPCR) was performed on a Roche Lightcycler instrument using β -actin as a reference gene. Primers for qPCR are β -actin (F: 5'-GCATTGCTGACCGTATGCAG-3' and R: 5'-GATCCACATCT GCTGGAAGGTGG-3') and ryroxd1 (F: 5'-TCAATGGCTTCAGA GAAACAAG-3' and R: 5'-CTGTTCTGCACAAGTGACACC-3').

Swimming Assays

Touch-evoked response assays and analysis were performed on 48 hr post fertilization zebrafish as per Sztal et al.¹⁹

Electron Microscopy

Zebrafish were fixed in 2.5% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, with post-fixation in 1% OsO₄ 1.5% K₃Fe(III)(CN)₆ in 0.065 M sodium cacodylate buffer. Samples were dehydrated through an ethanol series and embedded in Epon 812. 80 nm sections were stained with Uranyl acetate and lead citrate before imaging using a Hitachi H-7500. Muscle biopsies were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer and processed routinely for electron microscopy. Ultrathin sections were examined in an FEI Tecnai Spirit Biotwin.

Study Approval

Ethical approval for this research was obtained from the Human Research Ethics Committees of the Children's Hospital at Westmead, Australia (10/CHW/45), The University of Western Australia, the Comité de Protection des Personnes Est IV (DC-2012-1693), France, the Institutional Review Board of the National Institute of Neurological Disorders and Stroke, NIH (12-N-0095), and Ethical Committee of Hacettepe University, Faculty of Medicine. Written informed consent was obtained from participants for genetic testing, biobanking of DNA, muscle, and fibroblasts,

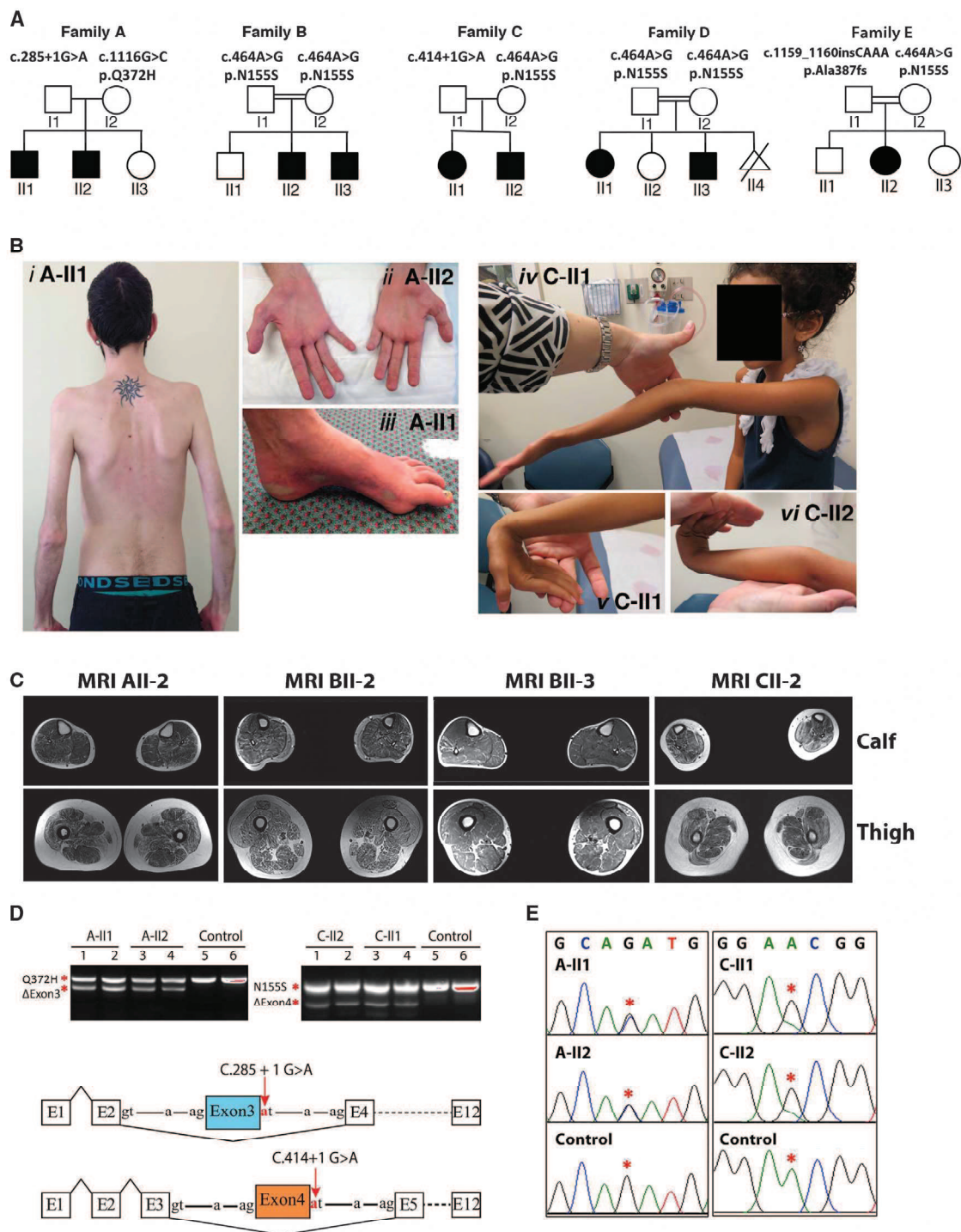


Figure 1. Clinical Features of PYROXD1-Related Myopathy

(A) Pedigrees of the five affected families.

(B) Posterior view of A-II1 (*i*) demonstrating generalized reduction of muscle bulk and prominent scapulae. Hands of A-II2 (*ii*) demonstrating marked wasting of the thenar and hypothenar eminence. Foot of A-II1 (*iii*) showing pes cavus and skin discoloration. C-II1 (*iv*) demonstrating hyperextension of the elbow and reduced muscle bulk. C-II1 (*v*) wrist hyperextension. C-II2 (*vi*) hand and wrist hyperextension.

(C) Axial T1 muscle MRI of calf and thigh of individuals A-II2, B-II2, B-II3, and C-II2. In all individuals, the thigh shows generalized reduction in muscle, atrophy, and fatty marbling. There is relative sparing of rectus femoris relative to vastus lateralis. The calf of individuals in family B is more mildly affected.

(D) Top: Agarose gel of PCR products of fibroblast cDNA from two affected siblings from family A (left) and family C (right). For both families, sequencing of the lower band established in-frame skipping of exon 3 in family A and exon 4 in family C. Sequencing of the upper band in family A identified only transcripts bearing the maternal c.1116 G>C (p.Gln372His) missense variant. Sequencing

(legend continued on next page)

and publishing of photographs of affected individuals. Fish maintenance and handling were carried out as per standard operating procedures approved by the Monash Animal Services Ethics Committee.

Results

Recessive *PYROXD1* Variants Cause Early-Onset Myopathy with Combined Histopathology of Multiple Internalized Nuclei and Myofibrillar Disorganization

Clinical Features of PYROXD1 Myopathy

Nine affected individuals from five families presented with childhood-onset muscle weakness (infancy to 8 years) (Figure 1A; Table 1). Perinatal history and early gross motor milestones were largely within normal limits. All affected individuals walked between 9 and 20 months of age. Two probands had poor head control in infancy (family C, II1 and II2). Weakness was slowly progressive. All affected individuals were still ambulant at 7–31 years but had difficulty with running and stairs. A-II1 required a cane for support and was unable to climb stairs from 24 years. All individuals had generalized reduction in muscle bulk (Figure 1B) and displayed symmetrical proximal weakness of the upper and lower limbs. Triceps brachii power was disproportionately reduced in three affected individuals. Distal weakness of the upper and lower limbs was also present in families A, B, C, and E. A-II1 and A-II2 showed marked wasting of distal musculature, in particular the thenar and hypothenar muscles (Figure 1B, ii), with abductor digiti minimi strength graded 3/5 and abductor pollicis brevis 0/5 in A-II2.

Neck weakness and mild scapular winging (5/9) were present (Figure 1B, i). Deep tendon reflexes were reduced or absent. Moderate joint laxity was present in families A and C (Figure 1B, iv–vi) but had resolved in family A by adulthood. Joint contractures did not occur, with the exception of mild tendoachilles contractures in A-II1. Mild scoliosis was seen in 2/9, pectus excavatum in 2/9, and thoracolumbar rigidity in family C. All affected individuals had mild to moderate facial weakness and mild ptosis was present in 3/9. A high arched palate and dental malocclusion were present in 7/9. Nasal speech was present in all individuals, swallowing difficulties in 6/9, fatigue with chewing in 2/9, and A-II2 required surgery for velopharyngeal incompetence. Ophthalmoplegia was not present.

Cognition was normal, except A-II1 who had mild, specific learning difficulties. Mild restrictive lung disease was present in the teenage years, but no individual had nocturnal hypoventilation. Frequent respiratory infections were seen in 4/9. Cardiac evaluations were normal, except for A-II1 who had developed abnormal septal wall motion and a low normal ejection fraction (50%) on his most recent assessment at 27 years of age.

Creatine kinase levels ranged from normal to moderately elevated (up to 1,051 IU/L). Electromyography (EMG) was myopathic in all individuals tested. Electrophysiological studies are summarized in Table S2. Nerve conduction studies in A-II1 and A-II2, the oldest affected individuals (26 and 29 years of age), found compound muscle action potential (CMAP) amplitudes reduced to 1%–10% of normal, absent peroneal CMAPs, reduced sural sensory potentials, but normal upper limb sensory amplitudes, suggestive of a mild length-dependent axonal neuropathy. Muscle MRI imaging of family A showed diffuse muscle atrophy and fatty marbling with relative sparing of rectus femoris relative to vastus lateralis in the thigh. In family B, only mild changes were seen, with vastus lateralis most affected in the upper leg and gastrocnemius in the lower leg (Figure 1C).

Histopathological Features of PYROXD1 Myopathy

Muscle biopsies were available from five affected individuals (Table 1). Haematoxylin and eosin staining showed marked variation in fiber size and multiple internalized nuclei, commonly occurring in clusters (Figure 2A, i, v, ix, and see EM in Figure 2B, i and vi). Occasional degenerating and regenerating fibers were seen, with a moderate increase in interstitial connective tissue. Oxidative stains showed large central core-like zones devoid of mitochondrial activity (Figure 2A, ii, vi, x NADH). Immunohistochemical staining of skeletal muscle demonstrated large myofibrillar inclusions positive for desmin (Figure 2A, iii, vii, and xi), myotilin (Figure 2A, iv and viii), alpha-actin (Figure 2A, xii), and α B crystallin (not shown). Electron microscopy showed extensive sarcomeric disorganization, with small atrophied fibers showing complete loss of sarcomeric architecture, absence of aligned thick filaments, and accumulation of thin filaments (Figure 2B, i, iii, iv, vi, vii, viii). In some small fibers, electron-dense thickened z-line remnants or small nemaline rods were also present (Figure 2B, iv and vii). Large fibers showed multiple areas of Z-band streaming and large, focal zones of sarcomeric disorganization (Figure 2B, ii), devoid of mitochondria and organelles (Figure 2B, v). Thus, *PYROXD1* myopathy

of the upper band in family C identified only transcripts bearing the maternal c.464A>G (p.Asn155Ser) variant. Bottom: Schematic of *PYROXD1* exon skipping events in family A and family C (not to scale).

(E) Sequencing chromatogram of the total PCR mixture using exon 1 forward and exon 12 reverse primers. Family A shows equal peak heights for the paternal wild-type and maternal missense variant c.1116 G>C (p.Gln372His) (red asterisks), suggesting approximately equal abundance of exon 3 skipped transcripts and missense c.1116 G>C (p.Gln372His) transcripts among the total mRNA pool. In contrast, family C shows evidence for maternal allele bias, with a lower peak height of the paternal c.464A relative to maternal c.464G variant (red asterisks).

Collective data (D, right and E, right) suggest that the paternal exon 4-skipped transcripts are less abundant than the maternal c.464A>G (p.Asn155Ser) among the total mRNA pool.

Table 1. Clinical Characteristics of Affected Individuals with PYROXD1 Variants									
ID	Family A-III	Family A-II2	Family B-II2	Family B-III3	Family C-II1	Family C-II2	Family D-III1	Family D-III3	Family E-II2
Gender, current age	male, 29 y	male, 26 y	male, 31 y	male, 21 y	female, 9 y	male, 7 y	female, 22 y	male, 17 y	female, 15 y
Ethnicity; consanguinity	European descent; no	European descent; no	Turkish; yes	Turkish; yes	Persian Jewish; no	Persian Jewish; no	Turkish; yes	Turkish; yes	Turkish; yes
PYROXD1 variants	c.285+1G>A (chr12: g.21598401G>A), c.116G>C (p.Gln372His, chr12: g.21615796G>C)	c.285+1G>A (chr12: g.21598401G>A), c.0.116G>C (p.Gln372His, chr12: g.21615796G>C)	Hom. c.464A>G (p.Asn155Ser, chr12: g.21605064A>G)	Hom. c.464A>G (p.Asn155Ser, chr12: g.21605064A>G)	c.414+1G>A (chr12: g.21602626G>A), c.464A>G (p.Asn155Ser, chr12: g.21605064A>G)	c.414+1G>A (chr12: g.21602626G>A), c.464A>G (p.Asn155Ser, chr12: g.21605064A>G)	Hom. c.464A>G (p.Asn155Ser, chr12: g.21605064A>G)	Hom. c.464A>G (p.Asn155Ser, chr12: g.21605064A>G)	c.464A>G (p.Asn155Ser, chr12: g.21605064A>G), c.1159_1160insCAAAA, chr12: g.21620457_21620458insCAAAA
Onset/progression	onset 5 y, difficulty running; slowly progressive weakness from 20 y; unable to climb stairs from 24 y; slow walk with a cane	onset 8 y; stable in childhood; mild progression from teenage years; increasing difficulty with stairs	onset 10 y; ambulant with difficulty ascending stairs	onset 10 y; ambulant	congenital onset; hypotonia; mild gross motor delay; walked age 20 mo; weakness from 6 y; increasing difficulty with stairs	infantile onset with hypotonia; walked age 13 mo; stable strength; difficulty with stairs	onset 2 y; ambulant; difficulty running and climbing; frequent falls; slowly progressive weakness from 20 y	onset 2.5 y; ambulant; difficulty climbing; stable in childhood	onset 4 y; easy fatigue; frequent falls; difficulty on stairs; slowly progressive; increasing difficulty with stairs
Pattern of limb weakness (HP:0001324)	symmetrical; UL, LL, axial; P; D	symmetrical; UL, LL, axial; P; D	symmetrical; UL, LL, axial; P; UL, D LL	symmetrical; UL, LL, axial; P	symmetrical; UL, LL, axial	symmetrical; UL, LL, axial	symmetrical; UL, LL, axial; P	symmetrical; UL, LL, axial; P	symmetrical: UL, LL; P; D
Severity of limb weakness	all 4- and 4/5, except deltoid 2/5, 2/5, shoulder abduction 1/5	all 4+ and 5/5, except deltoid 2/5, ADM 3/5, APB 0/5; lower limbs 4/5 except hip flex 3/5	-	-	all 4+ and 4-/5, except shoulder abd. 3/5, wrist flex 3+/5, neck flex 2/5, hip abduction 3/5	all 4 and 4-/5, except deltoid 3+/5, finger spread 3+/5, neck flex 2/5; hip extension 5-/5	proximal 4-, distal 4+/5, lower limbs more affected	proximal 4+ and 5-/5, distal 5/5	proximal 4- and 4+/5; hip flexion 3/5; thenar wasting
Hyporeflexia (HP:0001265)	reduced or absent	reduced or absent	reduced or absent	reduced or absent	reduced or absent	reduced or absent	reduced or absent	reduced or absent	reduced or absent
Achilles contractures (HP:0001771)	yes	no	no	no	yes	no	no	no	no
Joint contracture 5th finger (HP:0009183)	yes	no	no	no	yes	no	no	no	no
Joint hypermobility (HP:0001382)	distal laxity, resolved with age	distal laxity, partial patella subluxations	no	no	elbow and MCP joints	mild at elbow, wrist, and MCP joints	no	no	no
Facial weakness (HP:0002058)	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes
Ptoxis (HP:0000508)	no	no	no	mild	no	no	mild	mild	no

(Continued on next page)

Table 1. Continued		Family A-II1	Family A-II2	Family B-II2	Family B-II3	Family C-II1	Family C-II2	Family D-II1	Family D-II3	Family E-II2
Ophthalmoplegia (HP:0000602)	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
High arched palate (HP:0000218)	yes	yes	no	no	no	yes	yes	yes	yes	yes
Additional facial features	dental malocclusion (HP:0000689), elongated face	dental malocclusion (HP:0000689), elongated face	no	micrognathia and retrognathia (HP:0000308)	no	int. exotropia, surgical correction (HP:0000577)	no	elongated face (HP:0000276)	elongated face (HP:0000276)	no
Dysphagia (HP:0002015)	present from 12 y; improved	yes, plus nasal regurgitation from 9 y; surgery for VPI	yes	no	no	no	no	yes	yes	yes
Chewing difficulties (HP:0030193)	no	no	no	no	yes	yes	yes	no	no	no
Nasal speech (HP:0001611)	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes	yes
Scoliosis (HP:0002650)	mild thoracic scoliosis from 20 y	no	no	no	mild scoliosis from 7 y	no	no	no	no	no
Spinal rigidity (HP:0003306)	no	no	no	no	thoracolumbar rigidity	no	thoracolumbar rigidity	no	no	no
Pectus excavatum (HP:0000767)	yes	no	no	no	yes	no	no	no	no	no
Scapular winging (HP:0003691)	yes	no	mild	mild	no	mild, asymmetric	no	no	no	no
Pes cavus (HP:0001761)	yes	no	no	no	no	no	no	no	no	no
Pes planus (HP:0001763)	no	yes	yes	yes	no	no	yes	yes	yes	no
Restrictive lung disease (HP:0002091)	yes, from 15 y	no	no	yes	no	no	no	no	no	no
Recurrent infections (HP:0002783)	no	no	no	no	yes	yes	yes	yes	no	yes
Cardiac disease	abnormal septal motion and low normal ejection fraction at 27 y	no	no	no	mild to moderate pulmonary insufficiency	no	no	no	no	mild mitral and tricuspid insufficiency (HP:0001653)
Elevated CK (IU/L) (HP:0040081)	no (148–262)	yes (118–1,051)	yes (500–700)	yes (700–800)	no	no	yes (400–700)	no (290–376)	no	no

(Continued on next page)

Table 1. Continued

ID	Family A-II1	Family A-II2	Family B-II2	Family B-II3	Family C-II1	Family C-II2	Family D-II1	Family D-II3	Family E-II2
Histology	11 y	not performed	not performed	16 y	not performed	4 y	not performed	13 y	10 y
Internalized nuclei	yes	-	-	yes	-	yes	-	yes (>50% of fibers)	yes
Central cores	yes	-	-	yes	-	yes	-	yes on NADH and SDH stains	yes
Myofibrillar inclusions ^a	yes	-	-	yes	-	yes	-	EM not performed	EM not performed
Sarcomeric disorganization	yes	-	-	yes	-	yes	-	-	-
Thin filament accumulations	yes	-	-	yes	-	-	-	-	-
Nemaline rods	yes	-	-	yes	-	-	-	-	-

Abbreviations are as follows: UL, upper limb; LL, lower limb; P, proximal; D, distal; ADM, abductor digiti minimi; APB, abductor pollicis brevis; MCP, metocarpophalangeal; VPI, velopharyngeal insufficiency; CMAP, compound muscle action potential; EMG, electromyography; NCS, nerve conduction studies; NCV, nerve conduction velocity; y, year; mo, month.

^aMyofibrillar inclusions were positive to desmin, myotilin, alpha-actin, and α B crystallin.

has a distinctive histopathology that combines features seen in central and minicore disease, centronuclear, myofibrillar, and nemaline myopathies.

Genetic Analyses

Exome sequencing in five unrelated families identified compound heterozygous variants in *PYROXD1* (GenBank: NM_024854.3) in families A, C, and E and the same homozygous recessive missense variant in consanguineous Turkish families B and D (Figures 1A and 3). Sanger sequencing confirmed all variants and familial segregation was consistent with autosomal-recessive inheritance. DNA was not available for D-II2 or D-II4.

In family A, a paternally inherited essential splice site variant, c.285+1G>A (chr12: g.21598401G>A), was identified. The variant is found at low frequency in the heterozygous state in the Exome Aggregation Consortium (ExAC) database (allele frequency 4.295×10^{-5}).²⁷ cDNA analysis performed on muscle from A-II1 (not shown) and fibroblasts from A-II1 and A-II2 (Figure 1D) confirmed disruption of the donor splice site, with in-frame skipping of exon 3 a common consequence of the splice variant (Figure 1D, left gel, approximately equal levels of normal splicing [upper band] and exon 3 skipping [lower band]). PCR using exon 1 forward and intron 3 reverse primers did not provide evidence for increased frequency of exon 3 extension in family A relative to control fibroblasts (not shown). A second maternally inherited missense variant, c.1116G>C (p.Gln372His; chr12: g.21615796G>C), was not found in the ExAC database.²⁷ In silico predictions support pathogenicity (PolyPhen-2 score 1.0 = probably damaging;²⁸ Proven score -4.68 = deleterious;²⁹ MutationTaster score 0.999 = disease causing³⁰). c.1116 G>C is the terminal 3' base of exon 10, but cDNA analyses revealed no obvious consequence for splicing (Figures 1D and 1E) and approximately equal levels of the c.1116 G>C (p.Gln372His) variant on cDNA (Figure 1E, family A; equal peak heights at position c.1116G>C are asterisked).

In families B and D, exome sequencing identified a homozygous missense variant c.464A>G (p.Asn155Ser; chr12: g.21605064A>G) in the affected siblings (B-II2 and B-II3 and D-II1 and D-II3, Figure 1A). The variant was found at very low frequency in the ExAC database and always in the heterozygous state (allele frequency 7.157×10^{-5}).²⁷ In silico predictions support pathogenicity (PolyPhen-2 score 1.0 = probably damaging;²⁸ SIFT score 0.74 = tolerated; Proven score -4.97 = deleterious;²⁹ MutationTaster score 0.999 = disease causing³⁰).

Families C and E (Figure 1A) had compound heterozygous variants including the c.464A>G (p.Asn155Ser; chr12: g.21605064A>G) missense variant described in family B and D. In family C an essential splice site variant c.414+1G>A (chr12: g.21602626G>A) was paternally inherited. The c.414+1G>A variant is present in the heterozygous state at very low frequency in ExAC (allele frequency 4.295×10^{-5}).²⁷ The c.414+1G>A (chr12: g.21602626G>A) variant is predicted to disrupt the donor splice site of exon 4.³⁰ cDNA analysis on skin fibroblasts

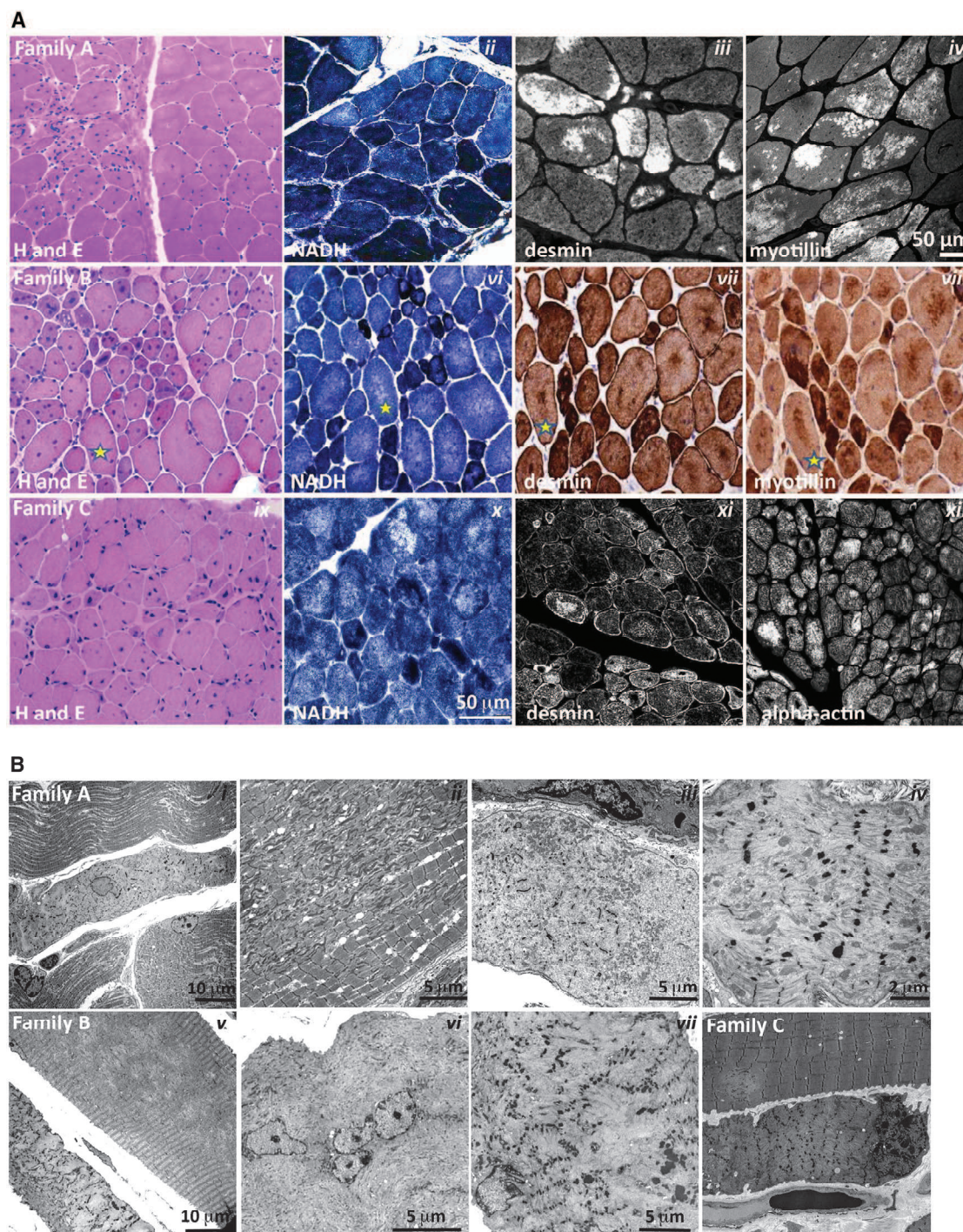


Figure 2. Histopathological Findings in PYROXD1 Myopathy

(A) Histopathological findings in skeletal muscle sections from family A (A-II1, quadriceps biopsy at 11 years of age), family B (B-II3, quadriceps biopsy at 16 years of age), and family C (C-II2, quadriceps biopsy at 4 years of age). Haematoxylin and eosin (H&E) staining of muscle biopsy specimens from each family shows variation in fiber size, multiple internalized nuclei, and increased fibrous connective tissue. Immunofluorescent staining of skeletal muscle from A-II1 and C-II2 and immunoperoxidase staining from B-II3 demonstrate inclusions highly immunoreactive to desmin, myotillin, and alpha-actin (and α B-crystallin, not shown). H&E and immunoperoxidase images are provided via Hospital Pathology without a scale bar. Fibers in sequential sections of B-II3 are marked with a yellow star.

(B) Electron microscopy of muscle biopsy specimens. Family A: (i) small atrophic fiber with a central nucleus and loss of sarcomeric organization; (ii) large region of Z-band streaming with only occasional areas of normal sarcomeric register; and (iii, iv) atrophic fibers showing total loss of sarcomeric register, loss of thick filaments, and prominent Z-bands sometimes forming small nemaline bodies. Family B: (v) Large fibers show large central minicore-like regions devoid of normal myofibrillar structure and lacking mitochondria and organelles, with adjacent small fibers showing total loss of sarcomeric structure, accumulations of thin filaments, and loss of thick filaments.

(legend continued on next page)

from C-II1 and C-II2 confirmed that the c.414+1G>A splice site variant disrupts normal splicing, effecting in-frame skipping of exon 4 in a subset of transcripts (Figure 1D, right gel: normal splicing [upper gel], exon 4 skipping [lower gel]). PCR was also performed with exon 1 forward and intron 3 or intron 4 reverse primers. Family C fibroblast cDNA showed higher levels of exon 3 extension, relative to controls; no evidence for exon 4 extension was observed (not shown). Sanger sequencing of cDNA across the c.464A>G (chr12: g.21605064A>G) maternal variant showed some evidence for maternal allele bias (Figure 1E, family C, note lower peak height of the paternal c.464A relative to maternal c.464G variant, red asterisks). Collectively, our data suggest at least two outcomes from the c.414+1G>A donor splice variant; in-frame skipping of exon 4 and ectopic inclusion of intron 3 sequences that create a premature stop codon after 97 amino acids and may be subject to nonsense-mediated decay.

In family E the second variant was a heterozygous 4 bp insertion, c.1159_1160insCAAA (p.Ala387fs*13; chr12: g.21620457_21620458insCAAA), which was paternally inherited. This frameshift variant will encode a truncated protein lacking the conserved NADH-nitrile reductase domain and bearing 13 ectopic amino acids downstream of Ala387 before an early termination codon.

Families B, D, and E are Turkish. SNP markers in the region of the c.464A>G (chr12: g.21605064A>G) variant are consistent with a shared minimal confirmed haplotype between the three families of at least 348 Kb, from chr12: 21,331,987 to 21,680,609 (Table S3).

PYROXD1 Belongs to an Ancient Family of Oxidoreductases

PYROXD1 (pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase [PNDR] domain-containing protein 1) is classified as a class I pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase by neXtprot and UniProtKB. PNDRs are an ancient family of enzymes that regulate the redox state of other proteins. Unlike the five other human class I PNDRs—dihydrolipoamide dehydrogenase (DLD [MIM: 238331]), glutathione reductase (GSR [MIM: 138300]), and thioredoxin reductases 1, 2, and 3 (TXNRD1 [MIM: 601112], TXNRD2 [MIM: 606448], TXNRD3 [MIM: 606235])—PYROXD1 does not bear a consensus redox active site within the oxidoreductase domain (Gly Gly Thr Cys Val Asn Val Gly Cys in GSR and thioredoxin reductases, Gly Gly Thr Cys Leu Asn Val Gly Cys in DLD; reactive cysteine disulphide underlined). Moreover, PYROXD1 does not bear a conserved C-terminal dimerization domain identified in all other class I PNDRs, and instead bears a highly evolutionarily conserved nitrile reductase domain (69% identity and 85% similar in *Dictyostelium*). Though apparently divergent to other class I

PNDRs, PYROXD1 is highly evolutionarily conserved, with 63% identity (78% similarity) of human PYROXD1 to zebrafish PYROXD1 and 39% identity (54% similarity) to *Dictyostelium* PYROXD1 (slime mold). Structural modeling of PYROXD1 using eight homologous solved crystal structures derived from other PNDRs support a predicted FAD-binding site (Figure 3B) that is vital for oxidoreductase activity of the PNDR family.⁶

The amino acids affected by the p.Gln372His and p.Asn155Ser substitutions are both highly evolutionarily conserved (Figure 3C), and removal of amino acids encoded by exon 3 (family A) or exon 4 (family C) (see Figures 3A and 3B) appears likely to significantly impact tertiary folding and abolish FAD binding and enzymatic function.

Missense Variants in Human PYROXD1 Impair Reductase Activity in Yeast

Redox activity of PYROXD1 was not previously reported, so we established a complementation assay in yeast to test the reductase activity of human PYROXD1 and the impact of identified missense variants. Replacing the yeast gene by its human counterpart is a powerful approach to help decipher the role of the human protein.^{31,32} *Saccharomyces cerevisiae* has two overlapping oxidoreductase pathways, a cytoplasmic and a mitochondrial thioredoxin system, sharing some enzymes. To determine the localization of exogenous human PYROXD1 in yeast, GFP-tagged constructs were expressed in wild-type (WT) *S. cerevisiae* (Figure 3D). Fluorescent imaging of GFP-tagged PYROXD1 revealed widespread cytosolic localization, with wild-type, p.Asn155Ser, and p.Gln372His missense mutants showing similar, high expression in transformed *S. cerevisiae* by western blot (Figure 3F). Among the cytoplasmic yeast oxidoreductases, the Gr1 glutathione reductase localizes to the cytoplasm and mitochondria and is required for survival under oxidative stress.³³ Expression of non-tagged human PYROXD1 in *glr1Δ* mutant yeast that are hypersensitive to H₂O₂ due to lack of oxidoreductase activity rescued the growth defect of the *glr1Δ* mutant strain (Figure 3E), with wild-type and missense mutants showing similar, high protein levels in transformed *S. cerevisiae* by western blot (Figure 3F). Conversely, p.Asn155Ser and p.Gln372His PYROXD1 mutants failed to complement *glr1Δ* (Figure 3F). These data show that human PYROXD1 has a reductase activity that is strongly impaired by both identified missense variants.

Individuals with PYROXD1 Variants Show Near-Normal or Reduced Levels of PYROXD1 Protein in Muscle, Fibroblasts, or Myoblasts

Western blot analysis of PYROXD1 protein levels showed a marked reduction in primary skin fibroblasts of A-II1 and

filaments; (vi) many large fibers have multiple internalized nuclei, often in clusters; and (vii) fibers show thin filament accumulations with electron-dense aggregates that resemble thickened z-lines and small nemaline bodies. Family C: (viii) Small atrophic fiber with loss of sarcomeric register. A large fiber shows multiple areas of Z-band streaming and a minicore-like region with absence of normal myofibrillar structure.

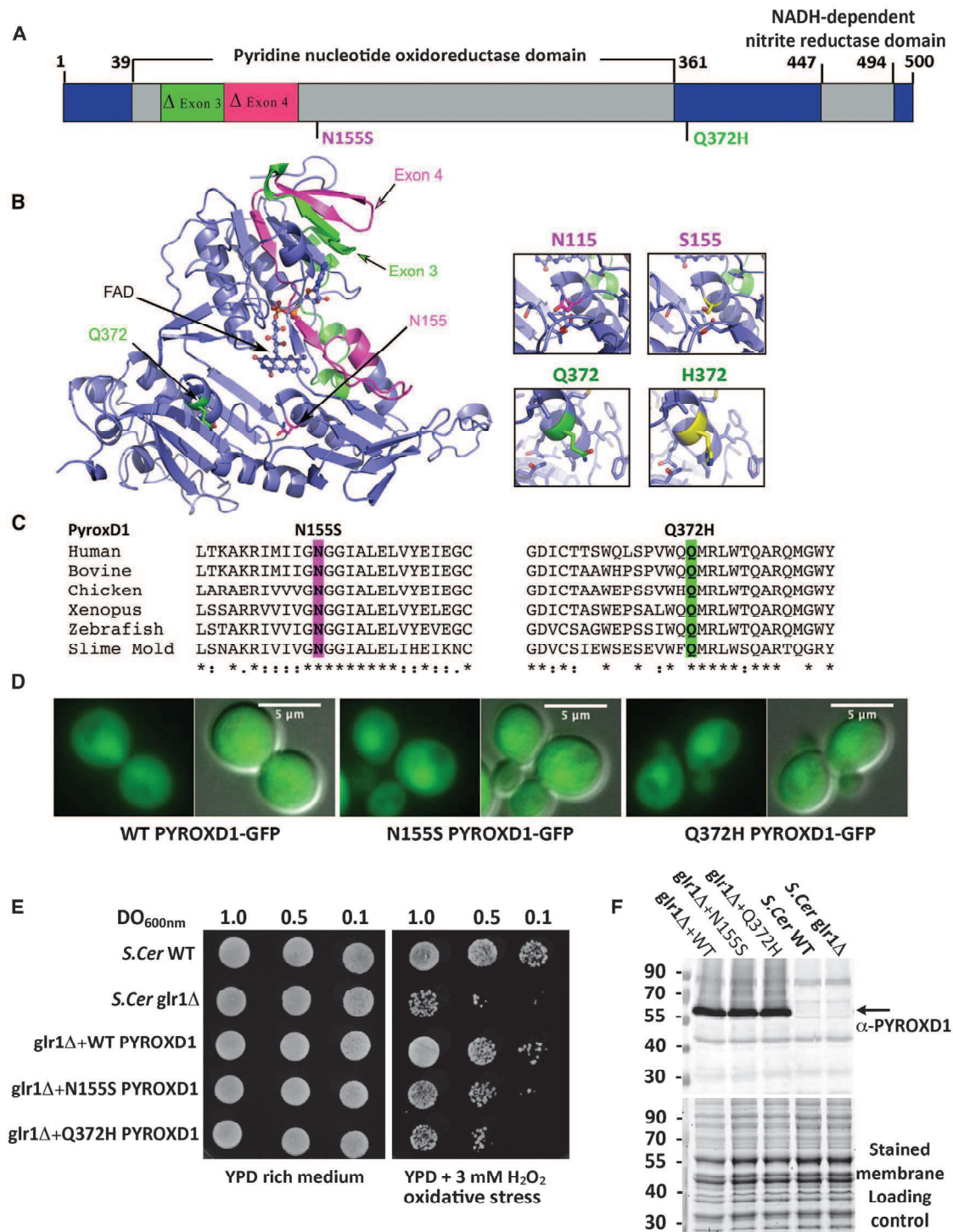


Figure 3. PYROXD1 Is an Oxidoreductase

(A) A schematic of PYROXD1 with functional domains and identified missense variants created using DOG 2.0.³⁵ Family A, Δ exon3 and p.Gln372His (Q372H, green); families B and D, p.Asn155Ser (N155S); family C, Δ exon4 and p.Asn155Ser (N155S, red).

(B) PYROXD1 homology model derived from eight homologous crystal structures (see [Subjects and Methods](#)). A co-ordinated FAD co-factor and the position of each identified variant on the crystal structure of PYROXD1 are highlighted in green (family A, Δ exon3 and Q372H) and pink (family C: Δ exon4 and N155S) as in (A).

(C) The identified missense variants p.Asn155Ser and p.Gln372His are evolutionarily conserved to primitive eukaryotes (Uniprot identifiers): human (Q8WU10), bovine (A7YVH9), chicken (F1NPI8), *Xenopus* (B1WAU8), *Danio rerio* (Q6PBT5), *Dictyostelium* (Q54H36).

(D) Living wild-type (WT, BY4742) yeast cells expressing human PYROXD1-GFP, PYROXD1-N155S-GFP, or PYROXD1-Q372H-GFP were observed by fluorescence microscopy with GFP filters and DIC optics. The merge represents the merge between the GFP and DIC images.

(legend continued on next page)

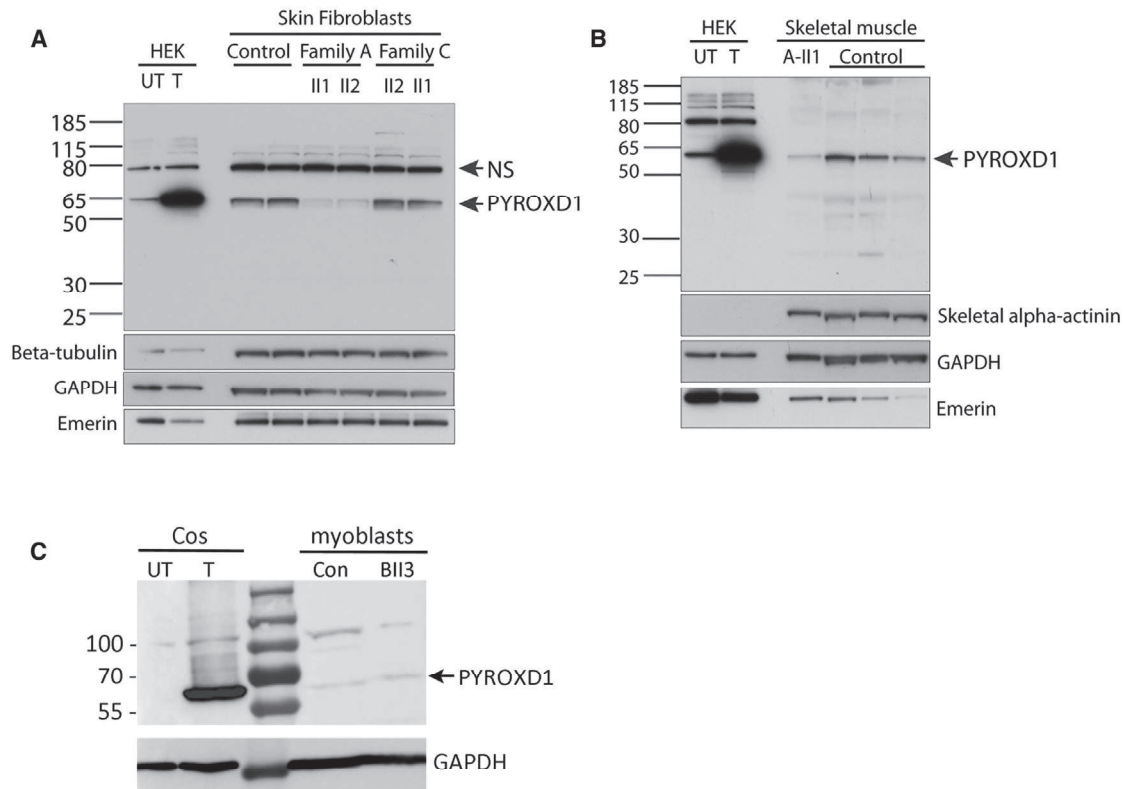


Figure 4. Affected Individuals with PYROXD1 Variants Show Reduced or Near-Normal Levels of PYROXD1

(A) Western blot of skin fibroblasts from two controls (42 and 46 years of age) and affected siblings from family A (29 and 26 years) and family C (6 and 8 years). HEK293 cells transfected with a plasmid encoding human PYROXD1 establishes the apparent molecular weight of PYROXD1 at ~60 kDa (UT, untransfected; T, transfected). A non-specific (NS) band is indicated by an arrow. Levels of PYROXD1 are reduced in family A but not different to control levels in family C.

(B) Western blot of A-II1 triceps (11 years) (Abcam cat# ab122458; RRID: AB_11129858) shows reduced levels of PYROXD1 relative to three age-matched control biopsy specimens (quadriceps 11 years, 10 years, 15 years). Loading controls: β -tubulin and GAPDH control for overall protein content, with one cytoskeletal and one cytoplasmic marker; emerlin controls for the number of nuclei; skeletal α -actinin controls for myofibrillar content.

(C) Western blot of myoblasts extracts from control subject and B-II3. Extracts from COS-1 cells transfected with the 500 aa human PYROXD1 cDNA (GenBank: NM_024854.3) was used as size control.

A-II2 (collected at 29 and 26 years of age) (Figure 4A, family A: Δ Exon 3 and p.Gln372His), with no significant change in PYROXD1 levels in skin fibroblasts from C-II1 or C-II2 (8 and 6 years) (family C Δ Exon 4 and p.Asn155Ser). In-frame deletion of exon 3 or exon 4 is predicted to remove 4.4 kDa or 4.7 kDa, respectively. Using two different anti-PYROXD1 antibodies (Abcam cat# ab122458 or ab204560; RRID: AB_11129858), we were unable to detect evidence for a lower molecular weight species, even with long exposures. Thus, our results suggest that in-frame deletions of exon 3 or exon 4 do not produce a stable protein. Western blot analyses of skeletal muscle specimens from A-II1 (collected at 11 years of age) similarly demonstrate reduced levels of PYROXD1 (Figure 4B), consistent with results in skin fibroblasts. Western blot

analysis of family B (B-II3) cultured myoblasts detected low levels of PYROXD1 that did not appear altered compared to control (Figure 4C). Together, our data indicate that the splice variants lead to unstable proteins that are not detected by western blot, PYROXD1-Asn155Ser appears to have normal stability and protein levels (family B and C), whereas PYROXD1-Gln372His is detected at reduced levels (family A).

PYROXD1 Is a Nuclear-Cytoplasmic Oxidoreductase

Figure 5A demonstrates the localization of PYROXD1 in control human skeletal muscle longitudinal sections, lightly stretched (10% passive stretch) prior to fixation to facilitate resolution of thin and thick filaments. PYROXD1 protein shows a distinct nuclear localization and also

(E) Cultures of non-transformed wild-type (WT) or *glr1 Δ* yeast, or *glr1 Δ* yeast transformed with expression plasmids bearing wild-type, N155S-, or Q372H-PYROXD1 were spotted at the indicated concentration (OD_{600nm}) on rich (YPD) or on solid medium containing 3 mM H₂O₂. Plates were incubated at 30°C and observed after 48 hr.

(F) Western blot of non-transformed wild-type (WT) and *glr1 Δ* , as well as *glr1 Δ* yeast transformed with PYROXD1 expression vectors. The black arrow indicates PYROXD1 and the lower panel shows the protein-stained membrane used as loading control.

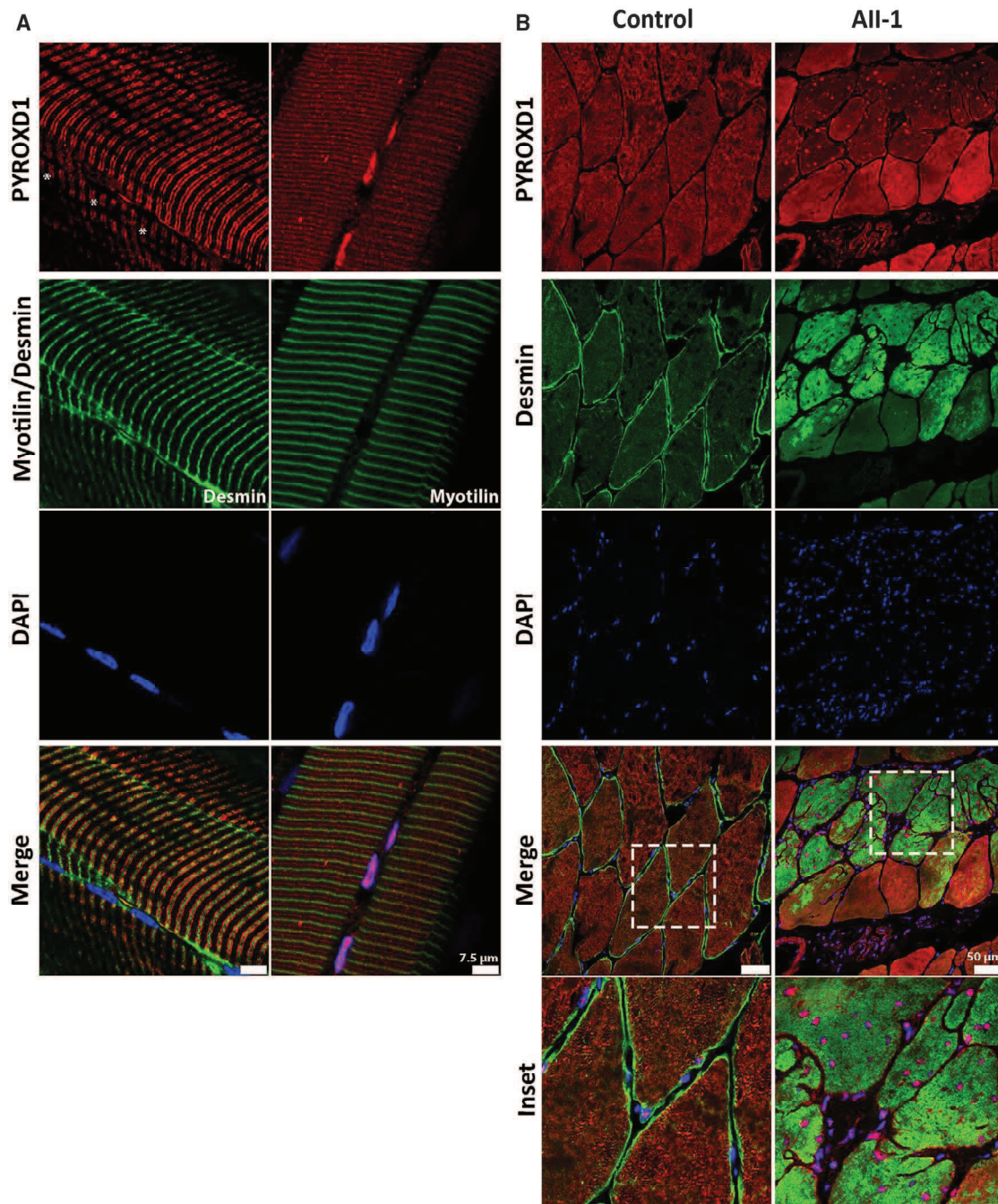


Figure 5. PYROXD1 Shows Both Nuclear and Striated Immunolocalization in Human Muscle

(A) Control stretched human skeletal (quadriceps) muscle co-stained with α -PYROXD1 (red), myotilin or desmin (green), and DAPI (blue). PYROXD1 intensely labels peripheral myonuclei, as well as showing two different patterns of striated labeling. Right: In this fiber, PYROXD1 brightly labels consecutive myonuclei and shows cytoplasmic striated labeling that aligns with desmin (Z-band region) and interdigitates between Z-bands (M-line region). Left: PYROXD1 does not brightly label myonuclei (asterisks show the position of DAPI-labeled nuclei) and shows a broader banding of striated labeling spanning the breadth of the I-band.

(B) Control and AII-1 tricep cross-sectioned human skeletal muscle co-stained with α -PYROXD1 (red), α -desmin (green), and DAPI (blue). The triceps muscle from AII-1 bears large inclusions that positively label for desmin, split fibers, and multiple internalized nuclei that brightly label for PYROXD1. Coverslips were imaged on a Leica SP5 confocal and single Z-planes are presented.

striated labeling (Figure 5A). PYROXD1 labels some peripheral nuclei more intensely than other nuclei (Figure 5A, left, asterisks show nuclei negative for PYROXD1). The sarcomeric compartment labeled by anti-PYROXD1 antibodies varied in different muscle specimens. Images pre-

sented show the two main types of striated labeling observed. The right panel of Figure 5A shows striations aligning both with the Z-band and interdigitating between Z-lines (near the M-band). The left panel shows a broader band of PYROXD1 labeling spanning the breadth of the

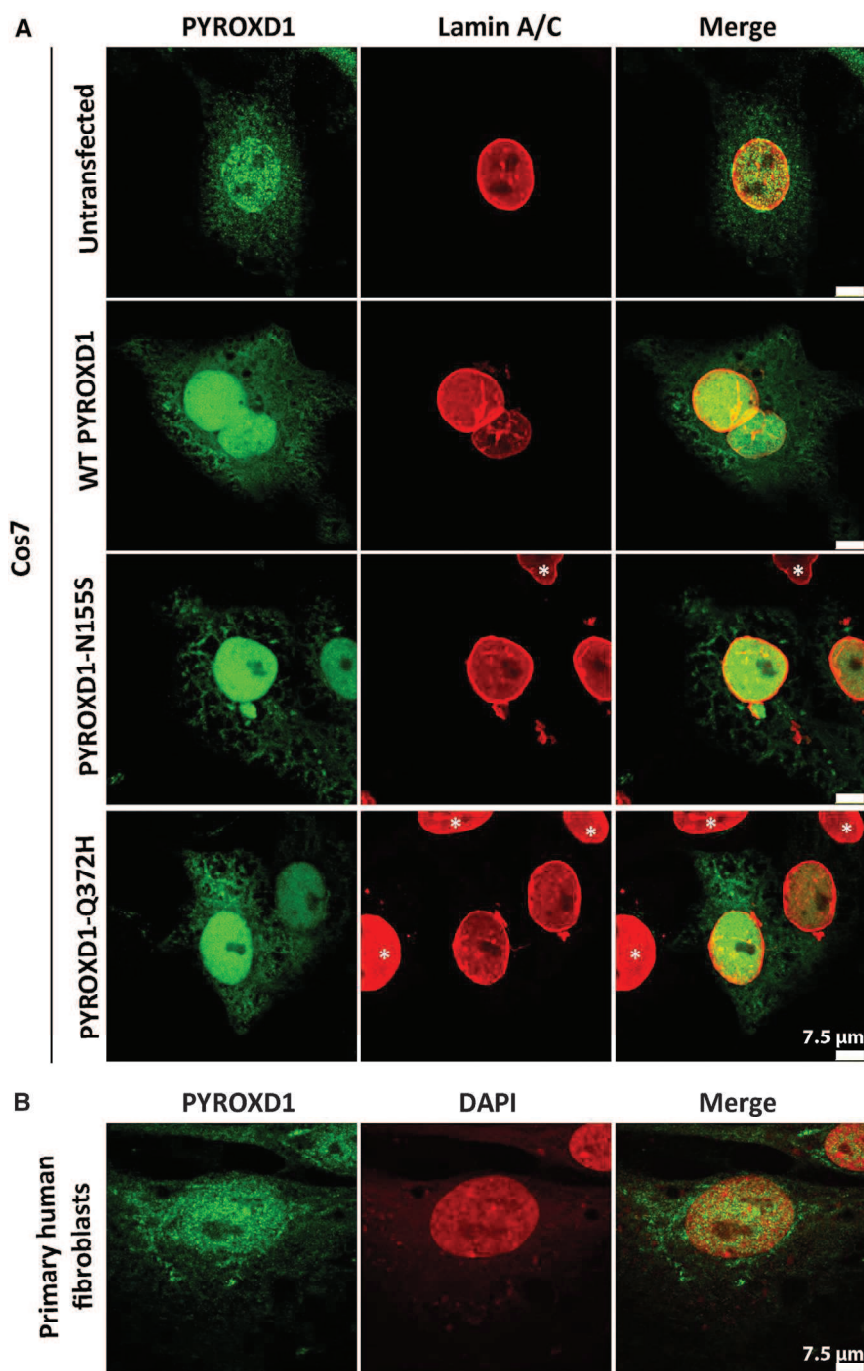


Figure 6. PYROXD1 Shows Nuclear Localization in Human Skin Fibroblasts and Transfected Cos-7 Cells

(A) Untransfected Cos-7 cells (top row) and Cos-7 cells transfected with human wild-type, p.Asn155Ser (N155S)-, or p.Gln372His (Q372H)-PYROXD1 expression constructs co-stained for PYROXD1 (green) and lamin A/C (red) shows enriched labeling for PYROXD1 within the nucleus, as well as labeling of cytoplasmic networks. For transfected Cos-7 cells (bottom three rows), asterisks demark untransfected cells within the field, with much lower levels of Pyroxid1, that show very weak labeling under optimum capture conditions for transfected cells.

(B) Nuclear-cytoplasmic labeling is observed for endogenous PYROXD1 in primary human fibroblasts.

DAPI, blue) that label positively for PYROXD1-Gln372His (Figure 5B, PYROXD1, red). Levels of cytoplasmic PYROXD1 appear brighter in myofibers *without* myofibrillar aggregates (Figure 5B, PYROXD1, red, enlarged inset). Thus, our results suggest that the equilibrium of cytoplasmic versus nuclear PYROXD1 is shifted to more predominant nuclear localization in muscle fibers burdened with myofibrillar aggregates.

Dual nuclear-cytoplasmic localization of PYROXD1 is supported by immunostaining of untransfected and transfected Cos-7 fibroblasts and primary human fibroblasts (Figure 6). Heterologous transfection of expression constructs encoding wild-type, p.Asn155Ser, or p.Gln372His PYROXD1 into Cos-7 fibroblasts showed a similar distribution of nuclear and cytoplasmic localization (Figure 6); similar patterns of staining for wild-type and PYROXD1 missense variants were also observed in trans-

fect C2C12 myoblasts and immortalized human myoblasts (not shown). Moreover, no overt changes in PYROXD1 localization were observed in primary fibroblasts from two siblings from family A or two siblings from family C relative to fibroblasts from two age-matched controls (not shown).

PYROXD1 Shows Nuclear-Cytoplasmic Localization in Mature Zebrafish Myofibers, with Evidence for Aggregates Induced by Expression of p.Asn155Ser and p.Gln372His Mutant Constructs
To determine the localization of PYROXD1 within the skeletal muscle, we overexpressed eGFP-tagged wild-type and mutant (p.Asn155Ser and p.Gln372His) human PYROXD1 within zebrafish muscle using the muscle-specific *actc1b*

These data establish that PYROXD1 localizes to the nucleus and to sarcomeric/sarcoplasmic compartments. Immunohistochemistry of control human skeletal muscle in cross section similarly shows dual localization of PYROXD1 in peripheral myonuclei as well as intramyofibrillar labeling throughout the contractile apparatus (Figure 5B). Levels of PYROXD1 in the triceps of A-II1 were lower relative to control muscle, and higher capture conditions are presented in order to portray key findings. As observed in the quadriceps of A-II1 (Figure 2A, i), the triceps muscle has large inclusions that label positively for desmin (Figure 5B, desmin, green) and multiple internalized nuclei (Figure 5B,

inset). Thus, our results suggest that the equilibrium of cytoplasmic versus nuclear PYROXD1 is shifted to more predominant nuclear localization in muscle fibers burdened with myofibrillar aggregates.

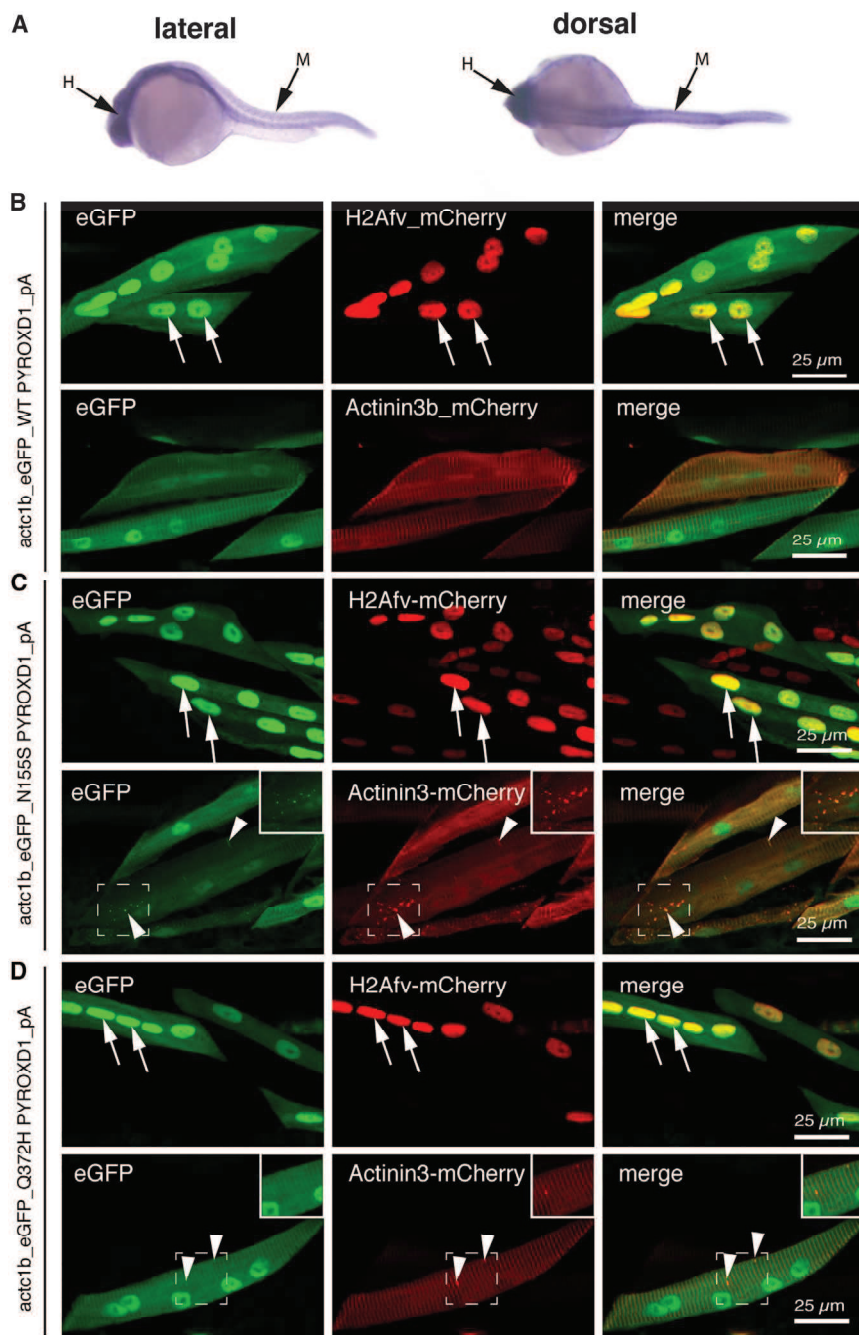


Figure 7. PYROXD1 Shows Nuclear-Cytoplasmic Localization in Zebrafish Myofibers, with Aggregates Induced by Expression of Asn155Ser and Gln372His Variants

(A) In situ hybridization on 24 hpf zebrafish shows widespread *ryoxd1* expression including the trunk musculature (M) in both lateral and dorsal views.

(B–D) Immunolabeling of vibratome-sectioned embryos 4 days post fertilization (dpf) expressing eGFP-conjugated human PYROXD1, either wild-type (B), p.Asn155Ser (C; N155S), or p.Gln372His (D; Q372H) via a muscle-specific actin promoter (*actc1b*) together with the Z-disk marker Actinin3-mCherry or nuclear marker histone H2A-mCherry. PYROXD1 localizes to myonuclei and shows striated labeling of sarcomeres. Small regions of thickening and sarcomeric disruption (arrowheads and inset) were observed after heterologous expression of N155S- or Q372H-PYROXD1, but not with wild-type PYROXD1.

bryo, including the skeletal muscle (Figure 7A). To study the function of Ryroxd1, we analyzed the effects of *ryoxd1* knockdown during early embryogenesis (Figure 8). Both quantitative PCR (qPCR) and western blot analyses confirm reduction of Ryroxd1 when *ryoxd1* ATG and exon2 splice morpholinos were used singularly and in combination (Figures 8A–8C).

To determine the effect of Ryroxd1 knockdown, we examined the swimming performance of the morpholino-injected embryos. Ryroxd1 single (ATG) and double (ATG and splice) morphants show a significant reduction in maximum acceleration in a touch-evoke response assay at 2 dpf compared to GFP morpholino-injected control zebrafish (Figure 8C).

promoter. All PYROXD1 constructs show dual nuclear and striated labeling aligning with the Z-disk, as evidenced by co-localization with *actc1b:actinin3-mCherry* and *actc1b:H2Av-mCherry* (Figure 7B, arrows). We also observed an occasional thickening of the Z-disk at 48 hpf when p.Asn155Ser and p.Gln372His PYROXD1 isoforms were overexpressed (Figures 7C and 7D, actinin3-mCherry arrowheads).

Zebrafish with Knockdown of Ryroxd1 Show Sarcomeric Disorganization, Myofibrillar Aggregates, and a Defect in Swimming

We identified a single *PYROXD1* ortholog in zebrafish, *ryoxd1*, which is expressed throughout the developing em-

Co-injection of eGFP-tagged human wild-type PYROXD1 mRNA (wtPYROXD1-eGFP) with both Ryroxd1 morpholinos rescued the reduction in swim performance, demonstrating that the effect was due specifically to reduction of Ryroxd1 (Figure 9D).

Examination of zebrafish muscle through antibody labeling for Actinin2 and phalloidin shows no obvious defects in Ryroxd1 splice and ATG single morphants (Figure S1), but disrupted sarcomeric structure is evident in Ryroxd1 double morphants (Figure 8D). By 96 hpf, Actinin2 and phalloidin-positive aggregates are observed in Ryroxd1 ATG morphants (Figure S1). However, Ryroxd1 double morphants show severe disruption of the musculature

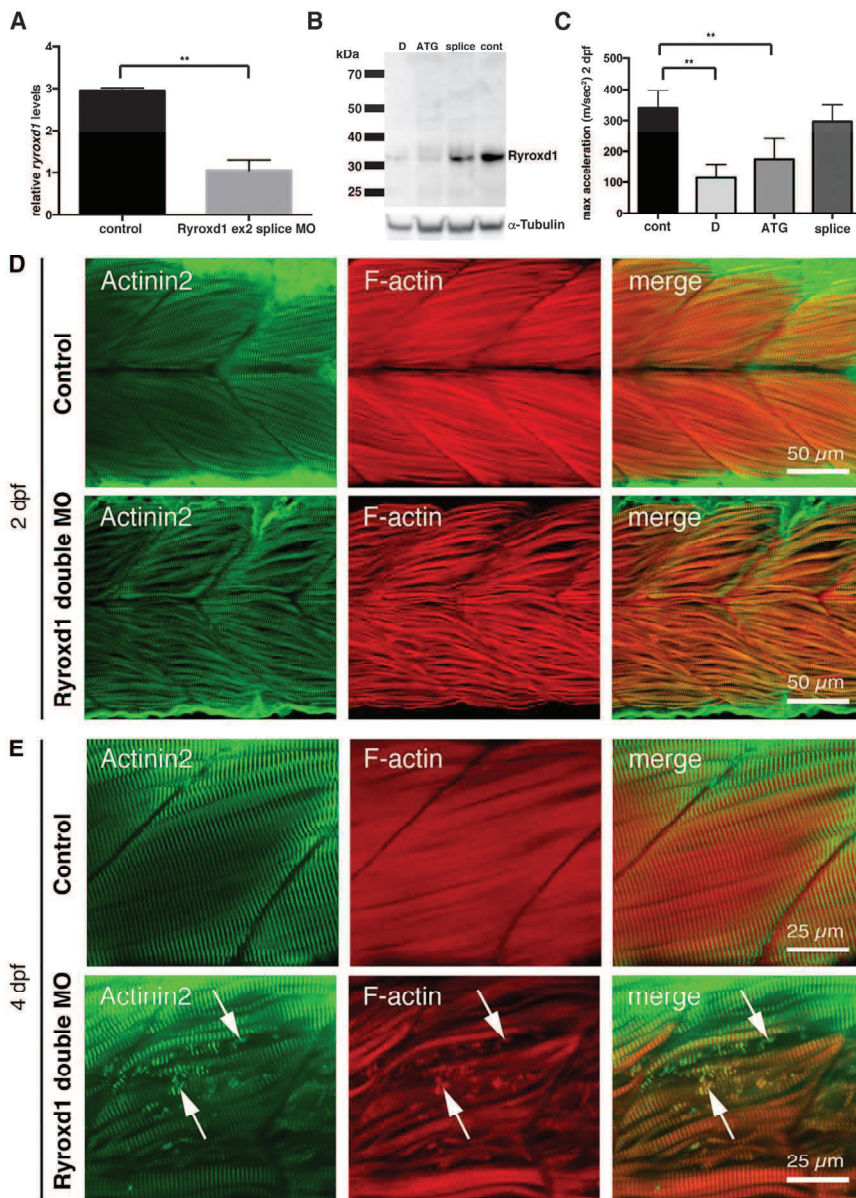


Figure 8. Zebrafish Deficient for RyroxD1 Show Sarcomeric Disorganization, Myofibrillar Aggregates, and a Defect in Swimming

(A) Quantitative PCR for *ryroxd1* mRNA levels in control (uninjected) and *Ryroxd1* morpholino-injected (*Ryroxd1* ex2 splice MO) zebrafish at 2 dpf.

(B) Western blot for *Ryroxd1* protein and α -tubulin loading control in control (uninjected) and *Ryroxd1* morpholino-injected zebrafish (D = *Ryroxd1* double morpholino, ATG = *Ryroxd1* ATG morpholino, and splice = *Ryroxd1* splice-site targeting morpholino) at 48 hpf demonstrates effective reduction of *Ryroxd1*.

(C) *Ryroxd1* ATG-single and ATG/splice double morphants show a significant reduction, of 48% and 73% respectively, in maximum acceleration in a touch-evoked response assay at 2 dpf compared to control zebrafish injected with a GFP targeting morpholino (Cont).

(D and E) Antibody labeling of *Ryroxd1* double morphants at 48 hpf (D) and 96 hpf (E) for Actinin2 and phalloidin show disruption of muscle structure compared to uninjected controls.

(E) At 96 hpf, *Ryroxd1* double morphants show severe disruption of the musculature with remnants of fragmented muscle fibers evident (arrows).

For (A) and (C), error bars represent SEM for three independent replicate experiments comprising 15 fish in each, ** $p < 0.01$.

Discussion

This publication describes the oxidoreductase function of *PYROXD1* and identifies recessive variants in *PYROXD1* as a cause of early-onset myopathy characterized histologically by a combination of multiple internalized nuclei, with large zones

with fragmentation of the muscle fibers (Figure 8E) and, in some cases, loss of fiber integrity and accumulation of actin at the myosepta (Figure 9A). Consistent with the improvement in muscle performance, the severity of structural muscle defects was significantly reduced by co-injection of *Ryroxd1* double morphants with wtPYROXD1-eGFP mRNA (Figure 9A), demonstrating that the phenotype is due to reduction of *Ryroxd1*.

To further investigate the muscle phenotype observed in the morphant embryos, we examined the muscle structure using electron microscopy. In morphant embryos, but not uninjected controls, we observed disintegration of the myofibrils with mitochondrial infiltration of the resulting space, loss of Z-disk structures, and the formation of electron dense, nemaline-like, bodies reminiscent of those observed in the human muscle biopsies (Figure 9E).

of sarcomeric disorganization—often devoid of mitochondria and organelles, accumulations of thin filaments, thickened Z-bands, and desmin-positive inclusions (Figure 2). All affected individuals presented in infancy or early childhood (1–8 years) with slowly progressive symmetrical weakness affecting both proximal and distal muscles, with normal to moderately elevated creatine kinase. Mild facial weakness, a high palate, nasal speech, and swallowing difficulties were typical features, mild restrictive lung disease was common, and evidence of cardiac involvement was present in the eldest individual, now aged 27. Thus, we emphasize the need for respiratory and cardiac surveillance in individuals with *PYROXD1* myopathy. Nerve conduction studies in family A in the third decade showed a mild length-dependent axonal sensory neuropathy. These findings were present only in family A, so the significance is uncertain, but raises the possibility that different

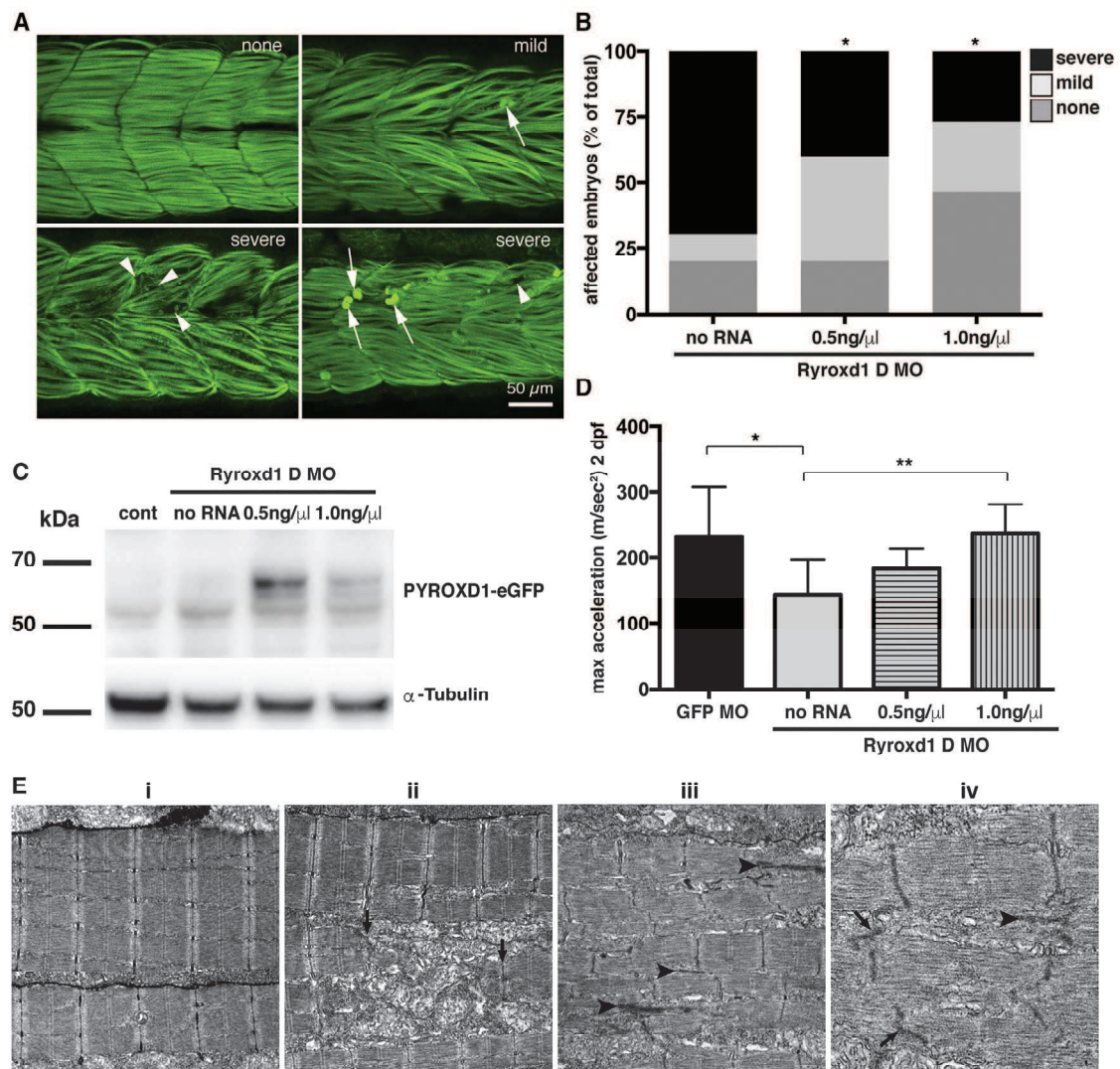


Figure 9. Human PYROXD1 Rescues Muscle Pathology and Swimming Defects in Ryroxd1 Morphants and EM of Zebrafish Muscle Pathology

(A) Representative images depicting the range of severity of muscle defects in Ryroxd1 double morphants. No obvious phenotype (none), embryos displaying occasional broken fibers and actin accumulation (mild, arrows), severe fragmentation of muscle fibers (severe, arrowheads), severe loss of fiber integrity and accumulation of actin at the myosepta (severe, arrows).

(B) Quantification of phenotypes (as in A) observed in Ryroxd1 double morphants (Ryroxd1 D MO) injected with either 0.5 ng/ μ L or 1.0 ng/ μ L wild-type (wt) wtPYROXD1-eGFP RNA compared to Ryroxd1 double morpholino injection alone (no RNA). 15–20 animals were scored per condition, * $p < 0.05$.

(C) Western blot for GFP and α -tubulin in GFP morpholino-injected control embryos (cont), Ryroxd1 double morpholino-injected zebrafish (no RNA), and Ryroxd1 double morpholino-injected zebrafish co-injected with either 0.5 ng/ μ L or 1.0 ng/ μ L wtPYROXD1-eGFP RNA, demonstrating translation of the injected mRNA.

(D) Ryroxd1 double morphants injected with human wtPYROXD1-eGFP mRNA show dose-dependent rescue in a touch-evoked response assay at 2 dpf. Ryroxd1 double morphants injected with 1.0 ng/ μ L human wtPYROXD1-eGFP show a 61% increase in maximum acceleration compared to Ryroxd1 double morphants (no RNA), achieving similar levels of maximum acceleration to wild-type embryos injected with a control GFP targeting morpholino (GFP MO).

(E) Electron micrograph of muscle (i) in a wild-type uninjected 96 hpf zebrafish embryo; examination of Ryroxd1 double morphant embryos (ii–iv) demonstrates myofibrillar fragmentation (ii, arrows) with mitochondrial infiltration, small nemaline-like bodies (iii, black arrowheads), and Z-disk fragmentation and loss (iii–iv; black arrowheads).

Scale bar represents 1 μ m. Error bars represent SEM for three independent replicate experiments comprising 15 animals in each replicate experiment, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

PYROXD1 variants may eventually predispose to the development of a neuropathy with increasing age.

All families identified in this study for which muscle, myoblasts, or fibroblasts were available exhibited either normal levels or reduced levels of PYROXD1; no individual

showed absence of PYROXD1. Analysis of splice variants identified in PYROXD1 in family A and family C revealed a subset of transcripts with in-frame deletion of amino acid sequences encoded by exon 3 (family A) or exon 4 (family C). However, we could not find evidence for

expression of truncated proteins, suggesting that the resulting protein products are unstable and degraded. The two substitutions p.Asn155Ser and p.Gln372His strongly impair the oxidoreductase activity of PYROXD1 in a yeast heterologous expression system. Importantly, no affected individuals described to date possess two predicted loss-of-function variants or exhibited complete loss of PYROXD1 in skin fibroblasts or skeletal muscle specimens. Thus, our findings suggest that myopathy results from partial loss of PYROXD1 function. Of note, targeted deletion of *PYROXD1* in murine models results in embryonic lethality (our own studies and confirmed by the International Mouse Phenotyping Consortium). This suggests that recessive loss-of-function variants in *PYROXD1* may result in a severe-lethal presentation in humans. Our current studies are defining the tissue-specific and developmental expression of PYROXD1, together with determination of the consequences of PYROXD1 deficiency, using a PYROXD1 conditional knock-out and LacZ reporter mouse-model.

PYROXD1 mRNA is ubiquitously expressed at low levels (GTEx Portal). *PYROXD1* is highly evolutionarily conserved to unicellular eukaryotes, with functional FAD-dependent oxidoreductase and NADH-dependent nitrile reductase domains present in prokaryotic enzymes. Thus, PYROXD1 has an ancient biology not yet understood. In contrast to PYROXD1, the five other class I PNDRs are well characterized and play significant roles in regulation of cellular redox: glutathione reductase (*GSR*), thioredoxin reductases 1, 2, and 3 (*TXNRD1*, *TXNRD2*, and *TXNRD3*), and mitochondrial dihydrolipoamide dehydrogenase (*DLD*).⁶ Recessive variants in *DLD* cause dihydrolipoamide dehydrogenase deficiency (DLDD [MIM: 246900]), a metabolic disorder characterized by lactic acidosis and neurological dysfunction. Dihydrolipoamide dehydrogenase is the E3 component of several vital mitochondrial enzyme complexes, including pyruvate dehydrogenase and ketoglutarate dehydrogenase, affecting oxidative metabolism via both the citric acid cycle and fatty acid biosynthesis.⁶

In addition to the reducing capabilities of their enzyme co-factors (FAD and NAD), PNDRs typically bear an intrinsic "redox active site" that catalyzes the final step to reduce their substrate, most commonly a conserved redox-reactive disulphide motif. Many PNDRs form enzymatic homodimers via a C-terminal conserved motif and are grouped into two classes (class 1 and class 2), according to characteristics related to nucleotide and flavin binding sites, the type of non-flavin redox active site, and the structural features of their dimer interface.³⁴ Although PYROXD1 is classified as a class 1 PNDR, it does not contain a conserved redox active disulphide within the oxidoreductase domain, nor a classical C-terminal dimerization motif, and thus appears a divergent member of the class I PNDR family.

Importantly, using a heterologous complementation assay in yeast, we showed that human PYROXD1 exhibits a reductase activity that can rescue the H₂O₂ sensitivity of

yeast cells lacking the glutathione reductase *glr1*. As the two missense variants impair this activity, it supports that the myopathy observed in affected individuals arises, at least in part, from a defect in oxidoreductase activity. Future work will need to identify what are the substrate(s) of PYROXD1 to better understand the pathophysiology.

Immunolocalization studies in human skeletal muscle, skin fibroblasts, and zebrafish myofibers show that PYROXD1 localizes to both the nucleus and cytoplasmic/sarcomeric compartments. Knockdown of the zebrafish ortholog *Ryroxd1* produced embryos with abnormal musculature and marked sarcomeric disorganization within individual myofibrils, including Z-disk loss and fragmentation and the presence of electron-dense bodies, reminiscent of findings observed in human muscle biopsies. In addition to the pathological features observed, *Ryroxd1* morphants also performed poorly in a touch-evoked swim assay, consistent with impaired muscle function.

In summary, we describe PYROXD1 as a nuclear-cytoplasmic oxidoreductase conserved through evolution and important for human skeletal muscle biology. Recessive variants in *PYROXD1* cause an early-onset myopathy characterized by slowly progressive limb and facial weakness, nasal speech, and swallowing difficulties. PYROXD1 myopathy histopathology is distinctive in that it combines multiple pathological hallmarks characteristic of different myopathies: central core and minicore disease, centronuclear, myofibrillar, and nemaline myopathies. Although one or two of these histopathological features can often exist in combination, it is rare to observe core-like zones, multiple internal nuclei, extensive myofibrillar disorganization, myofibrillar accumulations, and small nemaline-like bodies all within a single biopsy specimen. Thus, our discovery of PYROXD1 myopathy introduces altered redox regulation as a primary disease mechanism in congenital myopathy and raises the provocative possibility that several pathological endpoints in the myopathies may be linked ultimately to altered cellular redox.

Supplemental Data

Supplemental Data include five case reports, one figure, and three tables and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.09.005>.

Acknowledgments

This study was supported by the following funding: The Australian National Health and Medical Research Council (NHMRC) 1080587 (S.T.C., N.F.C., D.G.M., K.N.N., R.B.R., K.J.N., N.G.L.), 1022707 and 1031893 (K.N.N., N.F.C., and N.G.L.), 1048816 (S.T.C.), and 1056285 (G.L.O.), Muscular Dystrophy New South Wales (G.L.O.), Royal Australasian College of Physicians (G.L.O.), Australian Research Council FT100100734 (K.J.N.), National Human Genome Research Institute of the NIH (D.G.M., Medical Sequencing Program grant U54 HG003067 to the Broad Institute principal investigator, Lander), Division of Intramural

Research of the National Institutes of Neurological Disorders and Stroke, France Génomique National infrastructure grant Investissements d'Avenir and Agence Nationale pour la Recherche (ANR-10-INBS-09 and ANR-11-BSV1-026), Fondation Maladies Rares "Myocapture" sequencing project, Association Française contre les Myopathies (AFM-15352 and AFM-16551), Muscular Dystrophy Association (MDA-186985), Myotubular Trust and IDEX-Université de Strasbourg PhD fellowship (M.S.-V.), and intramural funds of the NINDS/NIH (C.G.B. and S.D.).

We thank Sarah Sandaradura for recruitment and consent of family A, Meganne E. Leach for clinical review of family C, Goknur Haliloglu for clinical review of family D, Xavière Lornage and Christine Kretz for help with experiments for family B, Pierre Bouche and Gisèle Bonne for sequence analysis in family B, Roberto Silva Rojas for help with yeast experiments, and Maud Beuvin, Guy Brochier, and Dr. Edoardo Malfatti from the Morphological Unit of the Myology Institute (Paris).

Received: April 27, 2016

Accepted: September 7, 2016

Published: October 13, 2016

Web Resources

Clustal Omega, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>
ExAC Browser, <http://exac.broadinstitute.org/>
GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
GeneTable of Neuromuscular Disorders, <http://www.musclegenetable.fr/>
GTEx Portal, <http://www.gtexportal.org/home/gene/PYROXD1>
Human Phenotype Ontology (HPO), <http://www.human-phenotype-ontology.org/>
International Mouse Phenotyping Consortium, <http://www.mousephenotype.org/data/genes/MGI:2676395#section-associations>
Knockout Mouse Project (KOMP) Repository, <https://www.komp.org/>
neXtprot, <https://www.nextprot.org/term/FA-00613/>
NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) Exome Variant Server, <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>
OMIM, <http://www.omim.org/>
RCSB Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
RRID, <https://scicrunch.org/resources>
seqr, <https://seqr.broadinstitute.org/>
Sequence Manipulation Suite, http://www.bioinformatics.org/sms2/ident_sim.html
UniProt, <http://www.uniprot.org/>

References

1. Nance, J.R., Dowling, J.J., Gibbs, E.M., and Bönnemann, C.G. (2012). Congenital myopathies: an update. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* *12*, 165–174.
2. Amburgey, K., McNamara, N., Bennett, L.R., McCormick, M.E., Acsadi, G., and Dowling, J.J. (2011). Prevalence of congenital myopathies in a representative pediatric united states population. *Ann. Neurol.* *70*, 662–665.
3. Chae, J.H., Vasta, V., Cho, A., Lim, B.C., Zhang, Q., Eun, S.H., and Hahn, S.H. (2015). Utility of next generation sequencing in genetic diagnosis of early onset neuromuscular disorders. *J. Med. Genet.* *52*, 208–216.
4. Ng, S.B., Buckingham, K.J., Lee, C., Bigham, A.W., Tabor, H.K., Dent, K.M., Huff, C.D., Shannon, P.T., Jabs, E.W., Nickerson, D.A., et al. (2010). Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat. Genet.* *42*, 30–35.
5. Ng, S.B., Nickerson, D.A., Bamshad, M.J., and Shendure, J. (2010). Massively parallel sequencing and rare disease. *Hum. Mol. Genet.* *19* (R2), R119–R124.
6. Argyrou, A., and Blanchard, J.S. (2004). Flavoprotein disulfide reductases: advances in chemistry and function. In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (Academic Press), pp. 89–142.
7. Ghaoui, R., Cooper, S.T., Lek, M., Jones, K., Corbett, A., Reddel, S.W., Needham, M., Liang, C., Waddell, L.B., Nicholson, G., et al. (2015). Use of whole-exome sequencing for diagnosis of limb-girdle muscular dystrophy: outcomes and lessons learned. *JAMA Neurol.* *72*, 1424–1432.
8. Geoffroy, V., Pizot, C., Redin, C., Piton, A., Vasli, N., Stoetzel, C., Blavier, A., Laporte, J., and Muller, J. (2015). VaRank: a simple and powerful tool for ranking genetic variants. *PeerJ* *3*, e796.
9. Teer, J.K., Bonnycastle, L.L., Chines, P.S., Hansen, N.F., Aoyama, N., Swift, A.J., Abaan, H.O., Albert, T.J., Margulies, E.H., Green, E.D., et al.; NISC Comparative Sequencing Program (2010). Systematic comparison of three genomic enrichment methods for massively parallel DNA sequencing. *Genome Res.* *20*, 1420–1431.
10. Wang, K., Li, M., and Hakonarson, H. (2010). ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* *38*, e164.
11. Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* *22*, 4673–4680.
12. Dereeper, A., Audic, S., Claverie, J.-M., and Blanc, G. (2010). BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC Evol. Biol.* *10*, 8.
13. Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., et al. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* *36*, W465–9.
14. Webb, B., and Sali, A. (2002). Comparative protein structure modeling using MODELLER. In *Current Protocols in Bioinformatics* (John Wiley & Sons, Inc.).
15. Pei, J., Kim, B.-H., and Grishin, N.V. (2008). PROMALS3D: a tool for multiple protein sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Res.* *36*, 2295–2300.
16. Xu, D., and Zhang, Y. (2011). Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization. *Biophys. J.* *101*, 2525–2534.
17. Wass, M.N., Kelley, L.A., and Sternberg, M.J.E. (2010). 3DLigandSite: predicting ligand-binding sites using similar structures. *Nucleic Acids Res.* *38*, W469–73.
18. Yuen, M., Sandaradura, S.A., Dowling, J.J., Kostyukova, A.S., Moroz, N., Quinlan, K.G., Lehtokari, V.-L., Ravenscroft, G., Todd, E.J., Ceyhan-Birsoy, O., et al. (2014). Leiomodisin-3 dysfunction results in thin filament disorganization and nemaline myopathy. *J. Clin. Invest.* *124*, 4693–4708.
19. Sztal, T.E., Zhao, M., Williams, C., Oorschot, V., Parslow, A.C., Giousoh, A., Yuen, M., Hall, T.E., Costin, A., Ramm, G., et al.

- (2015). Zebrafish models for nemaline myopathy reveal a spectrum of nemaline bodies contributing to reduced muscle function. *Acta Neuropathol.* *130*, 389–406.
20. Redpath, G.M.I., Sophocleous, R.A., Turnbull, L., Whitchurch, C.B., and Cooper, S.T. (2016). Ferlins show tissue-specific expression and segregate as plasma membrane/late endosomal or trans-Golgi/recycling ferlins. *Traffic* *17*, 245–266.
21. Gietz, D., St Jean, A., Woods, R.A., and Schiestl, R.H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* *20*, 1425.
22. Westerfield, M. (2007). *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, Fifth Edition (Eugene: University of Oregon Press).
23. Higashijima, S., Okamoto, H., Ueno, N., Hotta, Y., and Eguchi, G. (1997). High-frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in whole muscles or the whole body by using promoters of zebrafish origin. *Dev. Biol.* *192*, 289–299.
24. Sztal, T.E., Sonntag, C., Hall, T.E., and Currie, P.D. (2012). Epistatic dissection of laminin-receptor interactions in dystrophic zebrafish muscle. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 4718–4731.
25. Ruparelia, A.A., Oorschot, V., Ramm, G., and Bryson-Richardson, R.J. (2016). FLNC myofibrillar myopathy results from impaired autophagy and protein insufficiency. *Hum. Mol. Genet.*, ddx080.
26. Ruparelia, A.A., Zhao, M., Currie, P.D., and Bryson-Richardson, R.J. (2012). Characterization and investigation of zebrafish models of filamin-related myofibrillar myopathy. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 4073–4083.
27. Lek, M., Karczewski, K., Minikel, E., Samocha, K., Banks, E., Fennell, T., O'Donnell-Luria, A., Ware, J., Hill, A., Cummings, B., et al. (2015). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *bioRxiv* <http://dx.doi.org/10.1038/nature19057>.
28. Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S., and Sunyaev, S.R. (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* *7*, 248–249.
29. Kumar, P., Henikoff, S., and Ng, P.C. (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat. Protoc.* *4*, 1073–1081.
30. Schwarz, J.M., Rödelsperger, C., Schuelke, M., and Seelow, D. (2010). MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat. Methods* *7*, 575–576.
31. Amoaşii, L., Bertazzi, D.L., Tronchère, H., Hnia, K., Chicanne, G., Rinaldi, B., Cowling, B.S., Ferry, A., Klaholz, B., Payrastré, B., et al. (2012). Phosphatase-dead myotubularin ameliorates X-linked centronuclear myopathy phenotypes in mice. *PLoS Genet.* *8*, e1002965.
32. Kachroo, A.H., Laurent, J.M., Yellman, C.M., Meyer, A.G., Wilke, C.O., and Marcotte, E.M. (2015). Evolution. Systematic humanization of yeast genes reveals conserved functions and genetic modularity. *Science* *348*, 921–925.
33. Trotter, E.W., and Grant, C.M. (2005). Overlapping roles of the cytoplasmic and mitochondrial redox regulatory systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* *4*, 392–400.
34. Kuriyan, J., Krishna, T.S.R., Wong, L., Guenther, B., Pahler, A., Williams, C.H., Jr., and Model, P. (1991). Convergent evolution of similar function in two structurally divergent enzymes. *Nature* *352*, 172–174.
35. Liu, W., Xie, Y., Ma, J., Luo, X., Nie, P., Zuo, Z., Lahrmann, U., Zhao, Q., Zheng, Y., Zhao, Y., et al. (2015). IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. *Bioinformatics* *31*, 3359–3361.

Dihydropyridine receptor (DHPR, *CACNA1S*) congenital myopathy

Vanessa Schartner^{1,2,3,4} · Norma B. Romero^{5,6} · Sandra Donkervoort⁷ · Susan Treves^{8,9} · Pinki Munot¹⁰ · Tyler Mark Pierson^{11,12} · Ivana Dabaj^{13,14,15} · Edoardo Malfatti^{5,6} · Irina T. Zaharieva¹⁰ · Francesco Zorzato^{8,9} · Osorio Abath Neto^{1,7} · Guy Brochier^{5,6} · Xavière Lornage^{1,2,3,4} · Bruno Eymard¹⁶ · Ana Lía Taratuto¹⁷ · Johann Böhm^{1,2,3,4} · Hernan Gonorazky¹⁸ · Leigh Ramos-Platt¹⁹ · Lucy Feng¹⁰ · Rahul Phadke¹⁰ · Diana X. Bharucha-Goebel^{7,20} · Charlotte Jane Sumner^{21,22} · Mai Thao Bui^{5,6} · Emmanuelle Lacene^{5,6} · Maud Beuvin^{5,6} · Clémence Labasse^{5,6} · Nicolas Dondaine²⁶ · Raphael Schneider^{1,2,3,4,23} · Julie Thompson²³ · Anne Boland²⁴ · Jean-François Deleuze²⁴ · Emma Matthews¹⁰ · Aleksandra Nadaj Pakleza²⁵ · Caroline A. Sewry¹⁰ · Valérie Biancalana^{1,2,3,4,26} · Susana Quijano-Roy^{13,14,15,27} · Francesco Muntoni¹⁰ · Michel Fardeau^{5,6} · Carsten G. Bönnemann⁷ · Jocelyn Laporte^{1,2,3,4}

Received: 15 October 2016 / Revised: 9 December 2016 / Accepted: 11 December 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Muscle contraction upon nerve stimulation relies on excitation–contraction coupling (ECC) to promote the rapid and generalized release of calcium within myofibers. In skeletal muscle, ECC is performed by the direct coupling of a voltage-gated L-type Ca^{2+} channel (dihydropyridine receptor; DHPR) located on the T-tubule with a Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor; RYR1) on the sarcoplasmic reticulum (SR) component of the triad. Here, we characterize a novel class of congenital myopathy at the morphological, molecular, and functional levels. We

describe a cohort of 11 patients from 7 families presenting with perinatal hypotonia, severe axial and generalized weakness. Ophthalmoplegia is present in four patients. The analysis of muscle biopsies demonstrated a characteristic intermyofibrillar network due to SR dilatation, internal nuclei, and areas of myofibrillar disorganization in some samples. Exome sequencing revealed ten recessive or dominant mutations in *CACNA1S* ($\text{Ca}_v1.1$), the pore-forming subunit of DHPR in skeletal muscle. Both recessive and dominant mutations correlated with a consistent phenotype, a decrease in protein level, and with a major impairment of Ca^{2+} release induced by depolarization in cultured myotubes. While dominant *CACNA1S* mutations were previously linked to malignant hyperthermia susceptibility or

V. Schartner and N. B. Romero contributed equally.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00401-016-1656-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Jocelyn Laporte
jocelyn@igbmc.fr

¹ Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), 1, rue Laurent Fries, BP 10142, 67404 Illkirch, France

² INSERM U964, 67404 Illkirch, France

³ CNRS, UMR7104, 67404 Illkirch, France

⁴ Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, 67404 Illkirch, France

⁵ Université Sorbonne, UPMC Univ Paris 06, INSERM UMRS974, CNRS FRE3617, Center for Research in Myology, GH Pitié-Salpêtrière, 47 Boulevard de l'hôpital, 75013 Paris, France

⁶ Centre de référence de Pathologie Neuromusculaire Paris-Est, Institut de Myologie, GHU Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

⁷ Neuromuscular and Neurogenetic Disorders of Childhood Section, Neurogenetics Branch, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892-1477, USA

⁸ Department of Anesthesia, Universitätsspital Basel, 4031 Basel, Switzerland

⁹ Department of Biomedizin, Universitätsspital Basel, 4031 Basel, Switzerland

¹⁰ Dubowitz Neuromuscular Centre and MRC Centre for Neuromuscular Diseases, UCL Great Ormond Street Institute of Child Health, London WC1N 1EH, UK

¹¹ Departments of Pediatrics and Neurology, Cedars-Sinai Medical Center, 8700 Beverly Boulevard, Los Angeles, CA 90048, USA

¹² The Board of Governors Regenerative Medicine Institute, Cedars-Sinai Medical Center, 8700 Beverly Boulevard, Los Angeles, CA 90048, USA

hypokalemic periodic paralysis, our findings strengthen the importance of DHPR for perinatal muscle function in human. These data also highlight CACNA1S and ECC as therapeutic targets for the development of treatments that may be facilitated by the previous knowledge accumulated on DHPR.

Keywords DHPR · Congenital myopathy · Excitation–contraction coupling · Triad · Centronuclear myopathy · Core myopathy · Myotubular myopathy

Introduction

Excitation–contraction coupling (ECC) is the process by which an action potential triggered by nerve-induced muscle membrane depolarization causes the muscle fiber to contract. In skeletal muscle, ECC relies on a direct coupling between a Ca^{2+} release channel (the ryanodine receptor; RyR1) located on the sarcoplasmic reticulum (SR), and a voltage-gated L-type Ca^{2+} channel (the dihydropyridine receptor; DHPR) on the T-tubule [33]. ECC occurs at the triad, a specialized membrane structure formed by the apposition of a sarcolemma invagination (the T-tubule) and two SR saccules containing RyRs [10]. Upon depolarization, activation of the DHPR induces the opening of RyR1 and the release of Ca^{2+} from the SR stores, subsequently triggering muscle contraction.

The *CACNA1S* ($\text{Ca}_v1.1$) gene encodes the pore-forming subunit of DHPR in skeletal muscle. It is composed of 44 exons and has an embryonic splice variant lacking the in-frame exon 29. CACNA1S is a 1873 amino-acid protein with four transmembrane domains (I–IV), each with six

transmembrane segments (S1–S6) [40]. The loop between domains II and III is instrumental in mediating the activation of RyR1 [8, 21, 33]. The importance of CACNA1S in ECC has been demonstrated *in cellula* and also *in vivo*. Cells lacking CACNA1S have impaired ECC, and mice and drosophila with defective CACNA1S (*Dmca1D* ortholog in the fly) are embryonically lethal [5, 9, 18]. In adult mice, CACNA1S appears to control muscle mass as acute down-regulation of *Cacna1s* leads to massive atrophy, although ECC was functional [30].

Heterozygous dominantly acting *CACNA1S* mutations have previously been associated either with malignant hyperthermia susceptibility (MHS5; MIM#601887) triggered by volatile anaesthetics [25], hypokalemic periodic paralysis (HOKPP; MIM#170400) characterized by periodic attacks of muscle weakness associated with a decrease in the serum potassium level [16, 32], and thyrotoxic periodic paralysis (TTPP1; MIM#188580) [20]. Moreover, alternative splicing of exon 29 is repressed in patients with myotonic dystrophy and correlates with increased channel conductance and voltage sensitivity [38]. However, the link between mutations of DHPR and a myopathy is not yet fully established. More generally, triad defects due to mutations in other genes encoding for the ECC machinery have been reported in a sub-class of myopathies known as triadopathies, while secondary triad abnormalities may be observed in several other muscle diseases [1, 6].

In this study, we analyzed a cohort of patients with congenital myopathy, a clinically and genetically heterogeneous group of muscle diseases of variable severity, characterized by antenatal, neonatal, or early onset, ranging from severe fetal akinesia to milder forms of hypotonia

¹³ Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (AP-HP), Service de Pédiatrie, Hôpital Raymond Poincaré, Hôpitaux Universitaires Paris-Ile-de-France Ouest, Garches, France

¹⁴ Centre de Référence de Maladies Neuromusculaires Garches-Necker-Mondor-Hendaye (GNMH), Garches, France

¹⁵ Réseau National Français de la Filière Neuromusculaire (FILNEMUS), Garches, France

¹⁶ Centre de Référence de Pathologie Neuromusculaire Paris-Est, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France

¹⁷ Consultant-Neuropathology Department, National Pediatric Hospital J-P-Garrahan and Institute for Neurological Research-FLENI, Buenos Aires, Argentina

¹⁸ Present Address: Division of Neurology, Department of Pediatrics, The Hospital for Sick Children, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

¹⁹ Division of Neurology at Children's Hospital of Los Angeles, Department of Pediatrics, Keck School of Medicine, University of Southern California, 4650 W. Sunset Blvd, Mailstop #34, Los Angeles, CA 90027, USA

²⁰ Division of Neurology, Children's National Health System, Washington, DC 20010, USA

²¹ Department of Neurology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205, USA

²² Department of Neuroscience, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205, USA

²³ Faculté de Médecine, ICube-UMR7357, CSTB Complex Systems and Translational Bioinformatics, 67000 Strasbourg, France

²⁴ Centre National de Génotypage, Institut de Génétique, CEA, Evry, France

²⁵ Centre de référence des maladies neuromusculaires Nantes/Angers, Service de Neurologie, CHU Angers, Angers, France

²⁶ Laboratoire de Diagnostic Génétique, Faculté de Médecine, Nouvel Hôpital Civil, 67000 Strasbourg, France

²⁷ Université de Versailles-St Quentin, U1179 UVSQ-INSERM, Montigny, France

and muscle weakness, in conjunction with the presence of characteristic morphological hallmarks on skeletal muscle biopsy [26, 35]. Histopathologically and ultrastructurally, they can be sub-classified into nemaline myopathies with rods inclusions and/or protein aggregates, core myopathies with well-defined muscle fiber areas devoid of oxidative enzyme activity, and centronuclear myopathy with several fibers with internal and centralized nuclei. Fiber-type disproportion with a bias toward smaller and more abundant type 1 fibers is a feature common in several forms of congenital myopathies [27]. Advances in recent genetic technologies combined with extensive studies of large families and well-defined cohorts led to the identification of approximately 30 causative congenital myopathy genes (<http://www.muscle.genetable.fr>), of which a majority encodes proteins associated with the sarcomere structure or its stability [22, 23, 26, 35]. Despite these advances, approximately half of patients with congenital myopathies remain without a confirmed genetic diagnosis, which is essential for appropriate disease management, prognosis, genetic counseling, and development of therapies [2].

Here, we identified by exome sequencing both recessive and dominant *CACNA1S* mutations as a cause of a congenital myopathy characterized by peculiar morphological hallmarks in a cohort of 11 patients from 7 families.

Materials and methods

Patients

Eleven patients from seven unrelated families from Caucasian, Argentinean, or Vietnamese origin were included in this study. The cohort comprises 3 sporadic cases (patients P2, P5, and P9), 2 families with dominant inheritance (P6–8; P10, and P11), and 2 families with several affected siblings and recessive inheritance (P1; P3, and P4). All patients presented with a clinical history of a congenital myopathy and underwent detailed clinical examinations. Clinical, histopathological, and genetic features are summarized in Table 1. Sample collection was performed with written informed consent from the patients or parents according to the declaration of Helsinki.

Muscle imaging

CT scan for P1 and MRI for P2, P4, P5, P7, P8, P9, P10, and P11 were performed. T1-STIR was performed for P4, P5, P7, P8, P9, P10, and P11. P2 was scaled by the Mercury method.

Exome sequencing and analysis

Genomic DNA of patients and relatives was isolated from peripheral blood by phenol–chloroform extraction. DNA storage and usage was IRB approved (DC-2012-1693 and 12-N-0095 for NIH). Exome sequencing (ES) was performed for all living patients, the parents of families 1 and 6, the mother of P3 and P4 in family 3, and the father of P7 and P8 in family 5. ES was performed at CNG (Evry, France), at DeCode as part of Neuromics (Reykjavik, Iceland), at the Broad Institute (Cambridge, USA) and at the UCLA (Los Angeles, USA). Fragmented genomic DNA was enriched for exons using the SureSelect Human all Exon 50 Mb capture library v5 (Agilent, Santa Clara, USA) and sequenced 90nt paired-end on Illumina HiSeq 2000/2500 sequencers.

Sequence data were aligned to the GRCh37/hg19 reference genome using the Burrows–Wheeler aligner software (<http://bio-bwa.sourceforge.net>), and variant calling was performed with SAMtools or the UnifiedGenotyper (<https://www.broadinstitute.org/gatk>). The following databases were used for variant annotation and filtering: Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), ExAC Browser (<http://exac.broadinstitute.org/>), dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), 1000 genomes (<http://www.1000genomes.org/>), as well as in-house exome databases. Variants ranking was performed with VaRank [13].

Confirmation of variants was performed by Sanger sequencing. Haplotype analysis between families 1 and 2 was performed using four (CA)_n microsatellites flanking the *CACNA1S* gene, which are localized 39- and 25-kb upstream and 3.5- and 18-kb downstream, respectively (coordinates, primers, and conditions are available on request).

Morphological studies

An open deltoid muscle biopsy was performed for patients P1, 2, 3, 6, 7, and 9 following informed consent. Age at muscle biopsy varied from 6 months to 60 years. A needle quadriceps biopsy was performed on patient 5 at 9 months and a bicep brachii biopsy was performed for P10 at 44 years of age. For the conventional histochemical techniques, 10- μ m cryostat sections were stained with haematoxylin and eosin (H&E), modified Gomori trichrome (mGT), periodic acid Schiff technique (PAS), oil red O, reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase-tetrazolium reductase (NADH-TR), succinic dehydrogenase (SDH), cytochrome oxidase (COX), the menadione-nitro blue tetrazolium, and adenosine triphosphatase (ATPase) preincubated at pH 9.4, 4.63, or 4.35.

Table 1 Molecular, clinical, and histopathological features of patients mutated in *CACNA1S*

Families	Family 1	Family 2	Family 3	Family 4	Family 5	Family 6	Family 7
Ethnicity	Caucasian	Argentinian	Vietnamese	Caucasian	Caucasian	Caucasian	Caucasian
Segregation	3 affected	Sporadic	2 affected	Sporadic	3 affected	Sporadic de novo	2 affected
Mutations	Compound heterozygous c.1189_1190del (exon 9) p.Ser397Profs*3; c.4967del (exon 40) p.Leu1656Argfs*67	Compound heterozygous c.4453C>T (exon 37) p.Gln1485*; c.4967del (exon 40) p.Leu1656Argfs*67	Compound heterozygous c.825C>A (exon 6) p.Phe275Leu; c.2371delC (exon 18) p.Leu791Cysfs*37	Compound heterozygous c.298G>T (exon 3) p.Glu100Lys; c.3795G>T (exon 30) p.Gln1265Hisfs*57	Compound heterozygous c.2225C>A (exon 16) p.Pro742Gln	Compound heterozygous c.2224C>T (exon 16) p.Pro742Ser	Compound heterozygous c.4099C>G (exon 33) p.Leu1367Val
Onset	Antenatal/neonatal	Antenatal/neonatal	Neonatal	Neonatal	Early childhood	Antenatal/neonatal	P10: early onset (6–7 months); P11: neonatal
Age at last examination (in years) and gender	P1: 60 (M)	P2: 16 (M)	P3: 15 (F); P4: 7 (F)	P5: 10 (M)	P6: 48 (F); P7: 19 (M); P8: 15 (M)	P9: 24 (M)	P10: 42 (M); P11: 5 (F)
Motor development	Delayed	Delayed	P3 and P4: delayed	Delayed	P6 and P8: normal; P7: delayed	Delayed	P10 and P11: delayed
Muscle weakness	Proximo-distal and major axial deficit	Limb girdle and axial	Stable diffuse (P > D) with preserved reflexes	Generalized with axial and proximal weakness; periodic weakness and loss of speech	Generalized	Generalized with axial weakness	Diffuse, slightly more severe at upper member and P > D at lower members
Facial involvement	Mild with high arched palate and ophthalmoplegia	Mild with high arched palate and ophthalmoplegia	Mild with high arched palate	Mild with high arched palate, ophthalmoplegia and ptosis	Mild with high arched palate	Mild with high arched palate and ophthalmoplegia	Mild with high arched palate
Respiratory involvement	Normal	Mild	Normal	Severe	Mild	Severe	Mild
Scoliosis	No	No	P3: mild	Mild	P7: Yes; P6 and P8: No	Yes	Yes
Feeding	Slight swallowing problem	Slight swallowing problem	P4: swallowing issues (G-tube)	Intermittent feeding difficulties	Normal	Occasional swallowing difficulties	Occasional swallowing difficulties
CK levels	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Elevated (1000–2000)
Muscle MRI	Muscle atrophy	Fatty replacement and anterior muscle involvement in lower limb	P4: mild involvement of the anterior thigh, predominantly in the vastus lateralis	Marked atrophy involving all muscle groups of the upper leg bilaterally. Fatty infiltration, particularly of the extensor groups.	P7 and P8: muscle wasting of the anterior thigh, no fatty infiltration	Diffuse atrophy, more severe fatty infiltration in anterior compartment of the thigh and soleus-peroneal muscles in the leg	Severe changes in thigh (anterior > posterior); relative sparing of anterior compartment in the leg

Table 1 continued

Families	Family 1	Family 2	Family 3	Family 4	Family 5	Family 6	Family 7
Histology	Centralized nuclei; focal disorganization; fiber size variability; alveolar aspect of the intermyofibrillar network Uniformity of type I fibers	Centralized nuclei; minicore; alveolar aspect of the intermyofibrillar network Uniformity of type I fibers	No data	Fiber size variability; endomyofibrillar connective tissue around most fibers. Predominance of type I fibers	Fiber size variability; alveolar aspect of the intermyofibrillar network Predominance of type I fibers	Rare internalized nuclei. Fiber size variability; alveolar aspect of the intermyofibrillar network Uniformity of type I fibers	P10: internalized nuclei; core-like structures; fiber size variability; endomyofibrillar network

Phenotypes are similar in the different affected from the same family, unless indicated otherwise. Antenatal onset based on delayed/decreased fetal movements

P Proximal, D distal

Digital photographs were obtained with a Zeiss AxioCam HRc linked to a Zeiss AxioPlan Bright Field Microscope and processed with the Axio Vision 4.4 software (Zeiss, Germany) for the majority of patients with exception of patient 5 where a digital Leica scanner was used.

Electron microscopy

Electron microscopy analysis was performed in patients P1, 2, 4, 6, 7, 9, and 10. Muscle specimens were fixed with glutaraldehyde (2.5%, pH 7.4), post fixed with osmium tetroxide (2%), dehydrated, and embedded in resin (EMBed-812, Electron Microscopy Sciences, USA). Ultra-thin sections from three blocks from each patient were stained with uranyl acetate and lead citrate. The grids were observed using a Philips CM120 electron microscope (80 kV; Philips Electronics NV, Eindhoven, The Netherlands) and were photo documented using a Morada camera (Soft Imaging System, France).

Immunohistochemistry and immunofluorescence

Frozen muscle samples for immunohistochemical and immunofluorescence analyses were available for five patients (P1, 5, 6, 7, and 9). Fast, slow, developmental, neonatal myosin heavy chain (NCL-MHCn, Novocastrol Laboratories, Newcastle Upon Tyne, UK) antibodies were applied to 10- μ m-thick cryosections, and revealed by immunoperoxidase techniques (ROCHE-Benchmark XT). In addition, immunofluorescence analyses were assessed on 8- μ m-thick cryosections overnight at 4 °C using different antibodies as Myosin alpha and beta-slow heavy chain, fast 2A heavy chain, and 2X myosin heavy chain (BA-D5, SC-71, and 6H1, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, USA), CACNA1S antibody (ab2862 mouse monoclonal, Abcam, Cambridge, UK), Ryanodine Receptor 1 (C-terminal rabbit polyclonal), and triadin (kind gift from Isabelle Marty, rabbit polyclonal) [34]. Subsequently, sections were incubated with appropriate conjugated secondary antibodies during 1 h. A set of control slides was prepared with omission of the primary antibodies and using aged-matched non-myopathic muscles.

RNA studies

RNA was extracted from muscle samples of P1 and P3 and from myotubes differentiated from fibroblasts infected by a MyoD expressing lentivirus for P5 using Tri-Reagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, USA) according to the manufacturer's instructions.

Reverse transcription was done using random and oligo-d(T) primers. Amplification of the regions of interest was performed with specific *CACNA1S* primers (Supplementary Table 1) and PCR products were Sanger-sequenced.

Western Blot

Cryostat sections of fresh frozen muscle tissue were lysed in a buffer containing 2% SDS, 5% beta-mercaptoethanol, and 62.5 mM Tris HCl pH 6.8 with a mix of protease inhibitors (Sigma). Samples were quickly micro-centrifuged. Laemmli buffer was added and samples were denatured at room temperature. Total protein extract were separated on 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes, blocked with non-fat milk, and incubated overnight with anti-CACNA1S antibody. Immunoblots were visualized by Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, Saint Quentin in Yvelines, France) on a G-Box system using the GeneSnap software (Ozyme, Montigny le Bretonneux, France).

Myotubes from patient P1 and from healthy controls were lysed in a buffer containing 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EGTA, 0.5% NP-40, 0.5% Triton-X100, 0.1% SDS, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, and a mix of protease inhibitor (Complete EDTA-free, Roche), and denatured in Laemmli buffer at 95 °C. Total protein extracts were separated on 6% SDS-PAGE gel and transferred to a nitrocellulose membrane. Detection of CACNA1S was done with an antibody targeting the middle part of the protein (HPA048892, Sigma, St. Louis, USA). Loading control was verified with the use of a stain-free technique (Trichloroethylene, Sigma, St. Louis, USA) and imaged were acquired with the ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad).

Cell culture and imaging

Muscle cells were established from patient P1 by the Cochin Center (Paris, France). Cells were plated on a thin matrigel layer on 35 mm dishes (Ibidi, Martinsried, Germany) with proliferation medium [DMEM/HAMF10 (1:1), 20% FCS, HEPES 10 mM, penicillin 100 UI/mL, streptomycin 100 µg/mL], then differentiated into myotubes at 80% confluence by changing the medium (DMEM, 2% HS, Penicillin 100 UI/mL, streptomycin 100 µg/mL). The next day, an upper layer of matrigel was added and the differentiation medium was changed every 2 days for 10 days. Myotubes were fixed with 4% PFA and incubated with antibodies against CACNA1S (HPA048892, Sigma, St. Louis, USA) and RYR1 (R129, Sigma, St. Louis, USA).

Intracellular calcium measurements

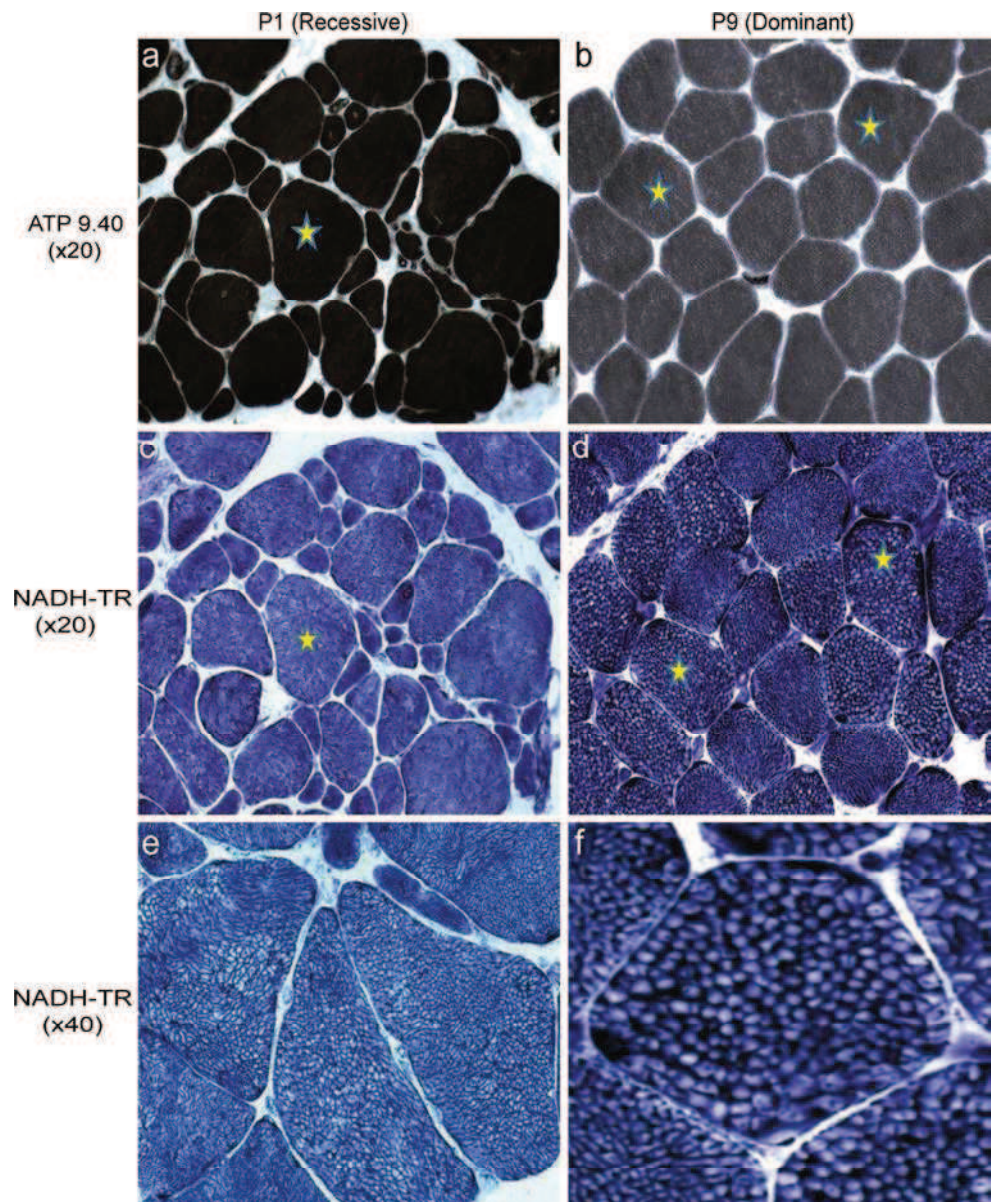
Patient P1, P10, and control muscle cells were transferred onto glass coverslips and allowed to proliferate in growth medium until visible groups of >10 cells were formed. The medium was then switched to differentiation medium, and Ca²⁺ measurements were performed 7–10 days later. Free cytosolic [Ca²⁺] was determined using the fluorescent Ca²⁺ indicator Fura-2 as described [4, 7, 36]. Coverslips were mounted onto a 37 °C thermostatted chamber which was continuously perfused with Krebs–Ringer medium. Individual cells were stimulated with different concentrations of KCl or 4-chloro-m-cresol, with a 12-way 100-mm-diameter quartz micromanifold computer-controlled micro-perfuser (ALA Scientific) as previously described [39]. On-line (340 nm, 380 nm, and ratio) measurements were recorded using a fluorescent Axiovert S100 TV inverted microscope (Carl Zeiss GmbH, Jena, Germany) equipped with a ×20 water-immersion FLUAR objective (0.17 numerical aperture) with filters (BP 340/380, FT 425, and BP 500/530) and attached to a Cascade 125+ charge-coupled device camera. The cells were analyzed using MetaMorph (Molecular Devices) imaging system, and the average pixel value for each cell was measured at excitation wavelengths of 340 and 380 nm. Ca²⁺ calibration was performed as previously described.

Results

Characterization of a cohort of patients with congenital myopathy

Our cohort is composed of 11 patients from 7 unrelated families and includes 4 females (P3, P4, P6, and P11) and 7 males (P1, P2, P5, P7, P8, P9, and P10). Ages range from 8 to 60 years. Clinical summary, histopathological features, and genetic characterization of all patients are provided in Table 1. Family history reveals potentially recessive inheritance for two families (F1 and F3) and 2 families had a clear dominant transmission (F5 and F7), while P2, P5, and P9 were sporadic cases. All patients presented with a congenital myopathy involving congenital or early onset hypotonia, delayed motor milestones, and progressive muscle weakness, with prominent axial involvement in most patients. Decreased fetal movement and breech presentation suggested antenatal involvement in several patients. In addition, one patient (P5) also had periodic paralysis and loss of speech during periods of illness and stress. These symptoms improved significantly after treatment with acetazolamide, a carbonic anhydrase inhibitor known to be beneficial for some HOKPP patients [24]. All patients had mild facial involvement, four patients had ophthalmoplegia

Fig. 1 Characterization of histological features in skeletal muscle. Serial muscle sections from patients P1 (**a, c, e**) and P9 (**b, d, f**). The mesh of the intermyofibrillar network displays an “alveolar” aspect, particularly on the oxidative staining (NADH-TR: **c, d, e, f**); this appearance is also observed with ATPases reactions. Uniformity of type 1 muscle fibers is observed on ATP 9.40 staining: **a** and **b**). The same fibers on consecutive serial sections are noted with stars



and one patient had ptosis. The respiratory system is heterogeneously affected ranging from normal to severely impaired. Most of the patients had mild-to-severe swallowing issues. There was no cardiac involvement or clear involvement of other non-neuromuscular functions. Serum creatine kinase (CK) levels were within normal range in 9 patients but elevated in the 2 patients from family 7 (1000–2000 U/l range).

Morphological study has been done on muscle biopsies for individuals in six families (Fig. 1, Supplementary Figure S1). Histological analyses of the muscle biopsies of four families (F1, F2, F5, and F6) showed an alveolar aspect of the intermyofibrillar network on NADH-TR staining (Fig. 1c–f). For family F4, we noted a similar reticular

pattern of intermyofibrillar network with rare whorled fibers. Fiber size variability was present in five families (F1, F4, F5, F6, and F7) (Fig. 1, Supplementary Figure 1). Centralized or internalized nuclei were observed in five families (F1, F2, F4, F6, and F7) and core-like or focal disorganization of the structure in four families (F1, F2, F4, and F7). For patient P5 from family F4, these last features were seen in a few fibers, maybe reflecting the fact that these features appear with time as this patient was biopsied at 9 months old, while the others were biopsied in childhood or adulthood. Uniformity of type 1 (Fig. 1; and immunofluorescence assay, not shown) was observed in F1, F2, F6, and predominance of type 1 fibers in families F4 and F5 was noted. Similar to P5, the biopsy of patient P10 in

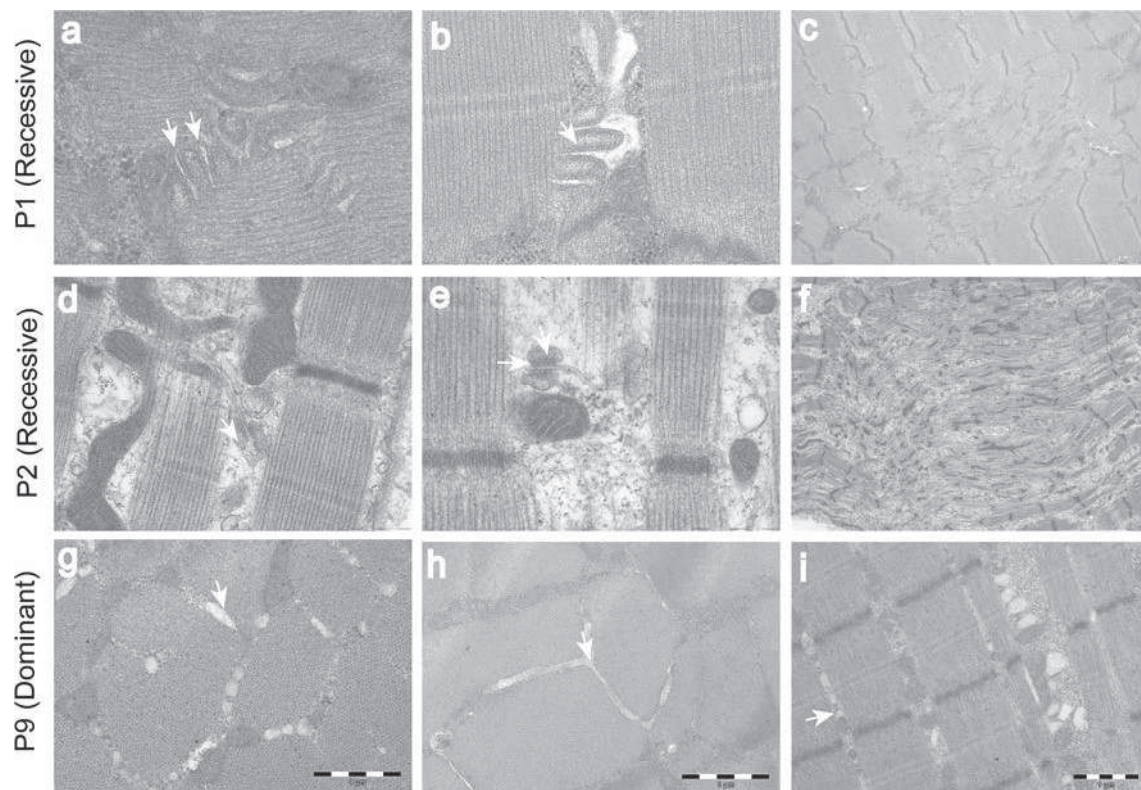


Fig. 2 Changes in muscle ultrastructure caused by *CACNA1S* mutations in patients P1 (recessive; **a–c**), P2 (recessive; **d–f**), and P9 (dominant; **g–i**). P1 biopsy shows multiple triads (*arrows*, **a**) and dilated T-tubules (*arrows*, **b**) and a few focal zones of myofibrillar

disorganization (**c**). P2 biopsy shows slight dilatation of the SR with apparently normal junctional feet connection (*arrows*, **d**, **e**) and small areas of disorganization (**f**). P9 biopsy shows numerous highly dilated SR around the myofibrils (*arrows*, **g–i**)

family F7 showed a dystrophic aspect, with mild increase in endomysial connective tissue, scattered split fibers, in addition to an increase in number of centralized nuclei. In addition, P10 showed occasional fibers with degeneration or regeneration, which is consistent with the finding of increased serum CK to levels more than 1000 IU/l.

The ultrastructure of muscles from patients P1, P2, P3, P6, P7, P9, and P10 was investigated with electron microscopy and uncovered common features, such as dilated T-tubules and SR (Fig. 2b, d, e, g–i) and focal zones of myofibrillar disorganization (Fig. 2c, f). In P1, increased frequency of triads per sarcomere has been observed (Fig. 2a). Long T-tubules and small areas of altered sarcomere striation could be seen in P2 (Fig. 2d–f). Muscle sections from P6 and P7 displayed less abnormalities and only some SR and T-tubules were dilated. However, the junctional feet between SR and T-tubules appeared normal in all patients.

The overall histological and ultrastructural findings were suggestive of a diagnosis of centronuclear or core myopathy. Exome analysis and targeted sequencing of the known related genes, including *MTM1*, *BINI1*, *DNM2*, and *RYR1*, did not reveal any pathogenic variations.

Muscle MRI or CT scan of the lower limbs was performed on nine patients (Fig. 3). Symmetric involvement of anterior and posterior compartments at the level of the thigh was seen in all, varying from mild atrophy in patients P7 and P8 to a marked atrophy in P5 and severe and extensive fatty infiltration throughout all muscle groups in patients P5 and P10. Anterior compartment muscles were slightly more involved than hamstrings in most. In some patients (P1, P2, and P9), the semitendinosus muscle was selectively more affected than the biceps femoris and semimembranosus. In patients P10 and P11, there was also relative sparing of the vastus intermedius and adductor magnus. Where available, imaging at the level of the leg showed findings ranging from mostly absence of involvement to a pattern with relative sparing of the tibialis anterior and posterior muscles as compared to soleus and gastrocnemii.

In summary, all patients display a consistent phenotype of neonatal or early onset progressive muscle weakness with facial involvement and peculiar structural alterations on the muscle biopsy, with variable extra-ocular involvement and CK elevation, suggesting a common genetic basis of the disease.

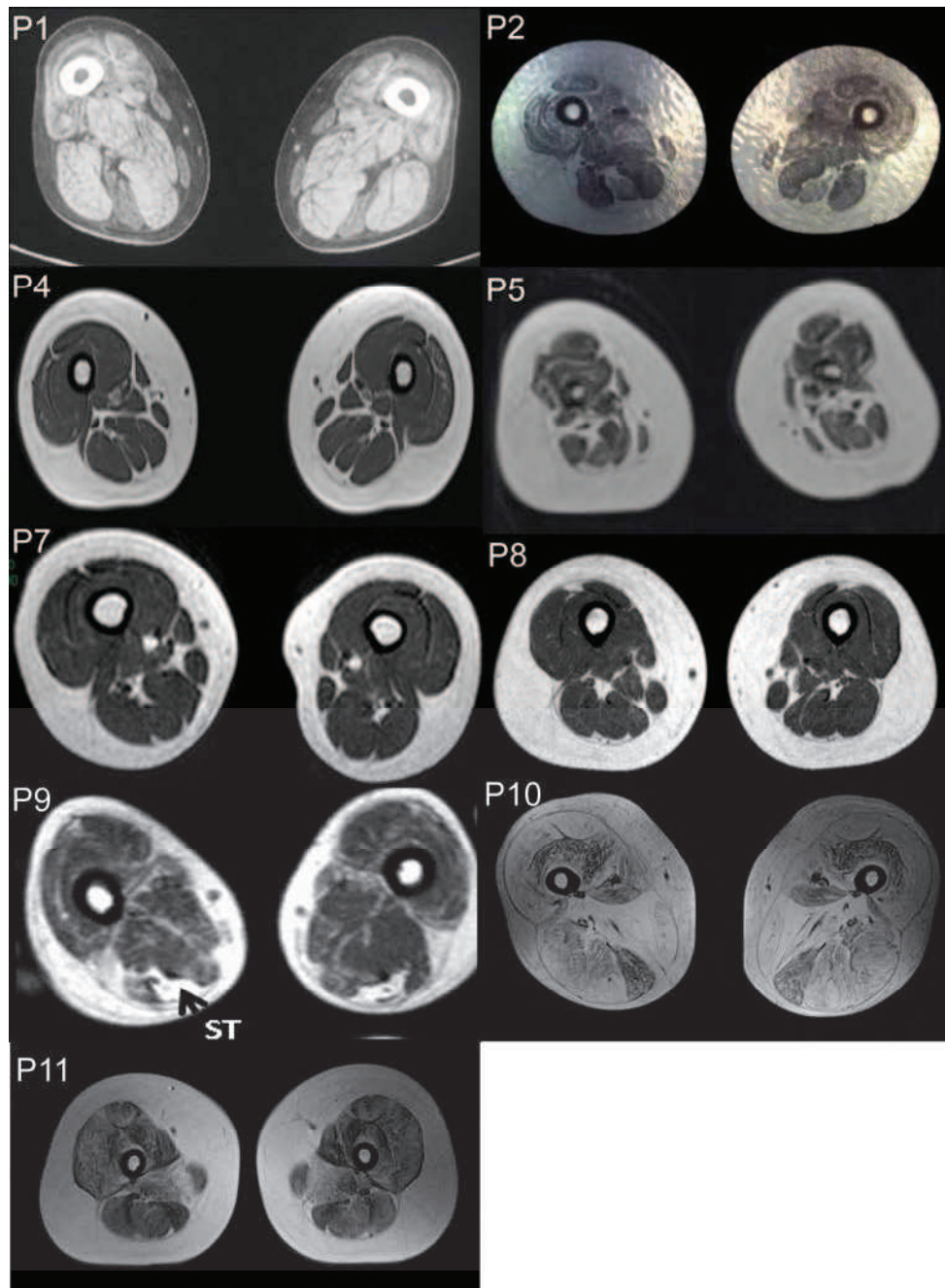


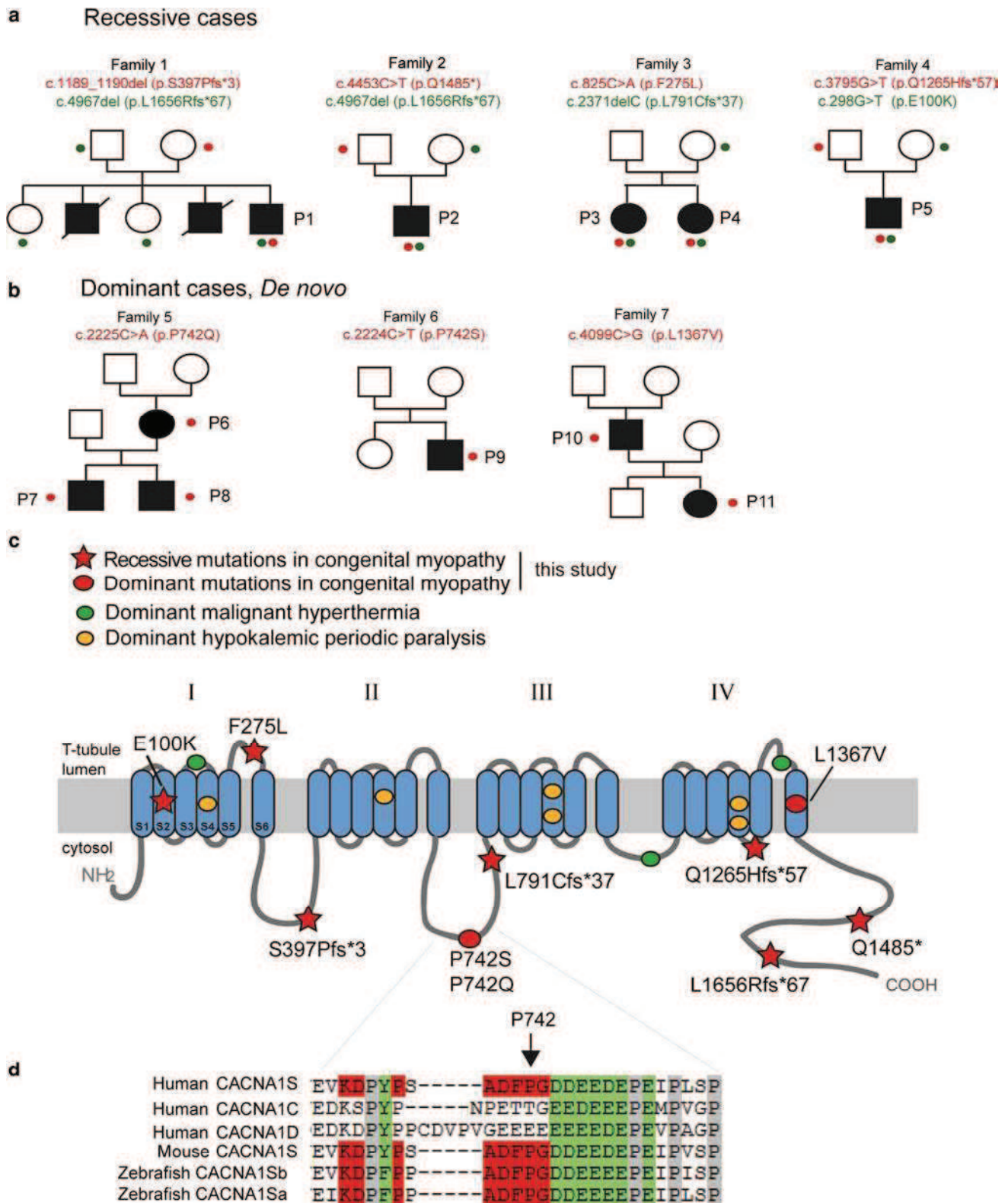
Fig. 3 CT scan (P1) and Muscle MRI of the thighs (P2, P4, P5, P7, P8, P9, P10, and P11) showing muscle involvement of nine patients. P1, P2, P4, P5, P9, P10, and P11 show more severe wasting and fatty infiltration of the anterior compartment in the thigh (vastus lateralis).

In addition, selective fatty infiltration of semitendinosus is observed in P1, P2, and P9 (*black arrow*). P7 and P8 do not show major abnormalities other than muscle wasting more prominent in the anterior compartment

Identification of dominant and recessive mutations in *CACNA1S*

To identify the genetic cause of the disease, we performed exome sequencing on all available affected individuals, as well as one or both parents of families 1, 3, 5, and 6. With the use of different bioinformatics pipelines, we filtered and

ranked the best candidate genes and identified several rare variants in *CACNA1S*, the gene coding the alpha 1 subunit of the L-type voltage-dependent Ca^{2+} channel, and a major protein for excitation–contraction coupling in skeletal muscle. All variants were validated by Sanger sequencing in all available family members and segregation with the disease was confirmed.



Four families (F1–F4) displayed recessive disease segregation with compound heterozygous mutations (Fig. 4a). P1 from Family 1 has two frameshift mutations in exons 9 (p.S397Pfs*3; c.1189_1190del) and 40 (p.L1656Rfs*67;

c.4967del). P2 from Family 2 carries a non-sense mutation in exon 37 (p.Q1485*; c.4453C>T) and the same exon 40 frameshift as P1. The shared c.4967del mutation in Families 1 and 2 is likely to be from a different origin

◀ **Fig. 4** Genetic analysis of recessive and dominant families mutated in *CACNA1S*. **a** Pedigree and mutations for the four families with recessive inheritance and **b** for the three families with dominant or de novo inheritance. Mutations were screened in all depicted individuals except if indicated deceased. The presence and segregation of mutations are indicated by colored dots; if absent, the individuals do not carry any mutation supporting a de novo appearance in families 5, 6, and 7. **c** Schematic representation of *CACNA1S* showing the position of the novel mutations found in congenital myopathy (numbered), and in malignant hyperthermia or hypokalemic periodic paralysis. **d** Protein sequence alignment demonstrates the specificity of the Proline 742 in *CACNA1S* compared to other alpha 1 subunit of DHPR and the conservation of this residue in different species

considering that they do not share a common haplotype for 2 upstream microsatellites loci, the nearest being 25 kb from the gene. The two siblings P3 and P4 from Family 3 carry a missense mutation in exon 6 (p.F275L; c.825C>A) and a frameshift in exon 18 (p.L791Cfs*37; c.2371delC). P5 from Family 4 carries two predicted missense mutations in exons 30 (p.Q1265H; c.3795G>T) and 3 (p.E100 K; c.298G>A). The respective parents of the patients are carrier of one mutation each, and the 2 unaffected siblings in family 1 carry a single variant, consistent with recessive inheritance.

In the remaining 3 unrelated families, 3 novel heterozygous variants were identified in 5 patients (Fig. 4b). The affected individuals P6, P7, and P8 from family 5 carry a missense mutation in exon 16 (p.P742Q; c.2225C>A) that appears de novo in the mother and segregates in her two affected sons. Patient P9 from family 6 carries a different de novo missense affecting the same amino acid (p.P742S; c.2224C>T). Another de novo missense mutation was identified in both affected father (P10) and daughter (P11) from family 7 (p.L1367 V; c.4099C>G). None of the missense mutations were found in unaffected family members, consistent with dominant inheritance.

All variants are present on both *CACNA1S* isoforms, and affect different domains of the protein (Fig. 4c). All variants were novel with the exception of the c.825C>A (p.F275L) and c.3795G>T (p.Q1265H) variants. They were both found in recessive families 3 and 4, respectively, and are listed in a heterozygous state at very low frequency in the ExAC exome database (3×10^{-5} and 8×10^{-6} , respectively). With regard to the predicted missense changes in our recessive families, the p.F275L substitution in family 3 affects a conserved amino acid of the pore-forming loop L5, which is in close proximity to the selectivity filter. The c.3795G>T variant found in family 4 not only involves an amino-acid substitution, but is, in addition, predicted to impact on splicing, resulting in a shift of the reading frame and a premature stop codon (p.Q1265Hfs*57, outlined below). The second missense variant found in family 4 (p.E100K; c.298G>A) affects a glutamic acid that may interact with arginine 174 for the connection of

transmembrane segments in the voltage-sensing domain, as modeled in the recently resolved 3D structure of DHPR (Supplementary Fig. S2).

Concerning the missense mutations in the dominant families, proline 742 is affected by two different mutations in two unrelated families (p.P742Q and p.P742S). This residue is conserved in mouse and zebrafish, and appears to be specific for the skeletal muscle alpha 1 subunit of DHPR, as it is not conserved in other alpha 1 subunits expressed in other tissues as *CACNA1C* or *CACNA1D* (Fig. 4d). This residue is localized in the loop between domains II and III involved in DHPR-RyR1 coupling, and a previous study demonstrated that the artificial P742T mutation strongly reduced ECC [19].

Altogether, those findings indicate that mutations in *CACNA1S* cause early onset myopathy with dominant or recessive disease inheritance.

Impact of mutations on *CACNA1S* transcript and protein

In total, we identified 10 different *CACNA1S* mutations, including 3 frameshift, 1 non-sense, and 6 missense mutations, including 3 confirmed de novo mutations. The truncating variants are predicted to remove the C-terminal 217, 388, or 1476 amino acids from 1873 in the adult protein isoform. To assess if the premature stop codons lead to non-sense-mediated mRNA-decay (NMD), we extracted, reverse transcribed, and sequenced *CACNA1S* muscle RNA from patients P1 (Family 1) and P3 (Family 3). For patient P1, we detected amplicons of both alleles in comparable amounts, ruling out major mRNA-decay (Fig. 5a). In contrast, the p.L791Cfs*37 mutation in P3 leads to mRNA-decay as only the other allele, carrying the missense mutation, was detected. As mentioned above, one of the missense mutations in patient P5 (predicted protein impact p.Q1265H) is also predicted to disrupt the donor splice site of exon 30. Sequencing of *CACNA1S* RNA extracted from myotubes differentiated from P5 myoblasts indicated retention of 68 nucleotides from intron 30 leading to the frameshift p.Q1265Hfs*57 and the deletion of the last 608 amino acids (Fig. 5a). Both alleles were detected, illustrating that mRNA-decay does not occur. RNA from other patients was not available. In summary, all recessive cases described here carry at least one mutation involving a premature stop codon, although not all appear to trigger mRNA-decay.

To verify the impact of the mutations on the protein level, we performed western blot on muscle biopsies and myotubes extracts. *CACNA1S* was barely detectable by western blot in myotubes extracts from patient P1 with compound truncations (Fig. 5b). Similar results were obtained from muscle extracts of P1 (Fig. 5b). Detectable

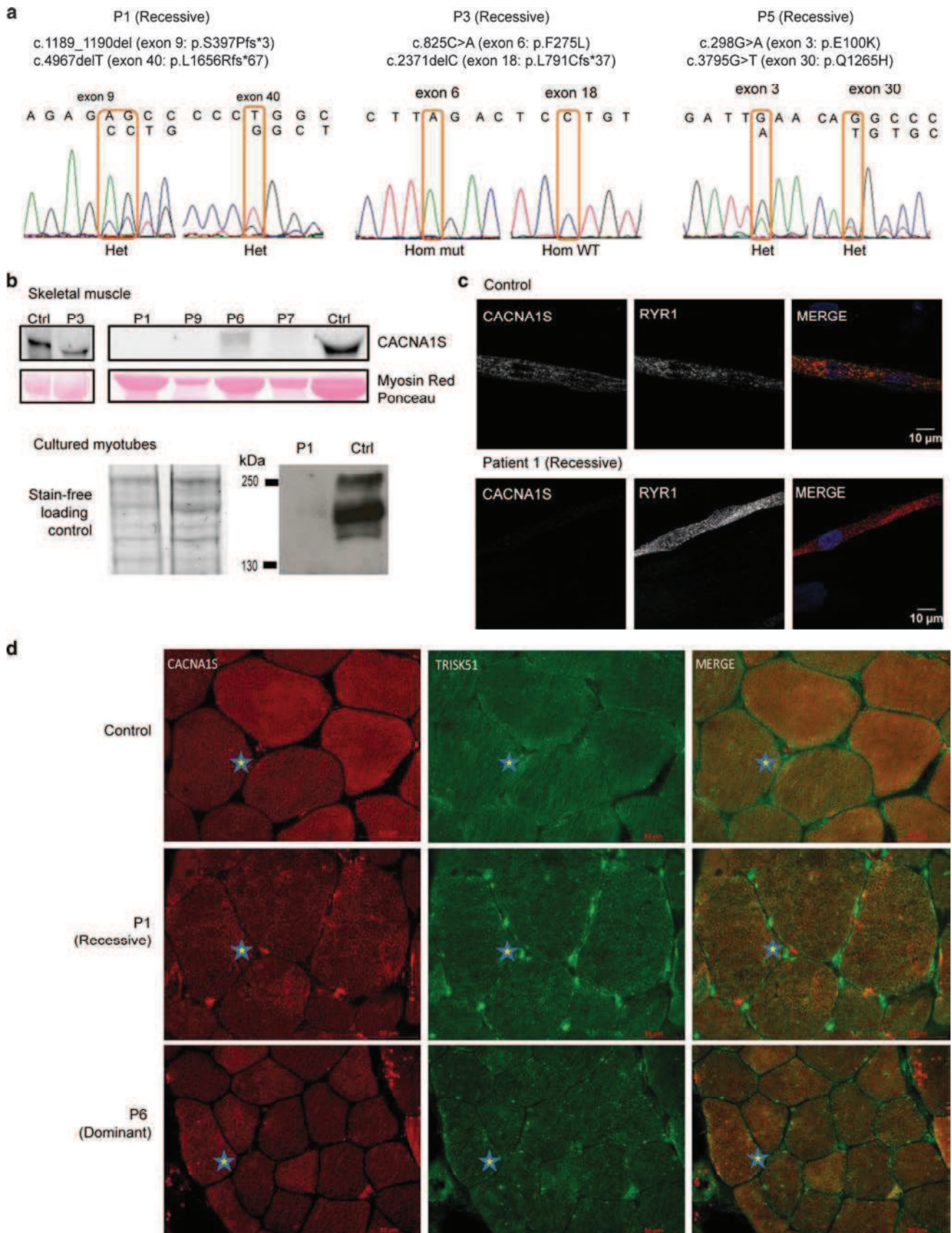


Fig. 5 Impact of the mutations on *CACNA1S* RNA and protein. **a** RNA studies of patients P1, P3, and P5. Amplification and sequencing of the mutated regions showing the presence of both alleles for P1, absence of the truncated allele for P3 (RNA decay), and a splice alteration due to the mutation c.3795G>T in P5. **b** Western Blot showing *CACNA1S* protein levels in muscle extracts (*above*) and cultured myotubes (*below*) from patients compared to controls. **c** Localization of endogenous *CACNA1S* and RyR1 in P1 differentiated myotubes. **d** Localization of the mutated *CACNA1S* and the SR marker triadin on serial sections of patients P1 and P6 muscles. The same fibers on consecutive serial sections are noted with *stars*

protein level was observed in muscle extracts from patient P3, harbouring one truncation and one missense mutation. *CACNA1S* is below the detection level of the western blot in P7 and P9 while slightly detected in P6, all dominant cases (Fig. 5b). These data support overall decreased protein stability following missense or frameshift mutations, in both dominant and recessive cases.

The subcellular localization of some of the mutated *CACNA1S* proteins was investigated in cultured myotubes from patients and in skeletal muscle. In contrast to control myotubes, a very low fluorescent signal was noted with an antibody against the N-terminal domain of *CACNA1S* in differentiated myotubes from patient P1 myoblasts, supporting western blot findings that overall *CACNA1S* is strongly reduced in this patient carrying recessive mutations (Fig. 5c). RyR1 signals appeared as longitudinally aligned dots in both control and patient myotubes, suggesting that the *CACNA1S* mutations do not impact on RyR1 localization, consistent with the previous studies showing that *CACNA1S* knock out myotubes still show triadic localization of RyR1 [31]. The muscle sections from the recessive patient P1 and the dominant patient P6 revealed decreased *CACNA1S* immunoreactivity and showed a peculiar alveolar aspect reminiscent of the observations with oxidative staining (Figs. 1, 5d). Aberrant diffuse accumulations of *CACNA1S* were also observed in the patient's muscles (Fig. 5d). Triadin (junctional SR marker) labelling appeared mildly decreased with lumps or irregular appearance in patients P1, whereas the signal was slightly decreased in patients P6 and P9 (Fig. 5d).

In conclusion, most recessive and dominant mutations we investigated in this study are associated with a decrease in *CACNA1S* protein level and an abnormal localization pattern in available mature muscle.

Physiopathological insights into *CACNA1S* myopathy

CACNA1S is the pore-forming subunit of the voltage-dependent Ca^{2+} channel (DHPR) regulating Ca^{2+} release from the SR stores. To assess the functional impact of *CACNA1S* mutations, we investigated Ca^{2+} homeostasis in myotubes from the recessive patient P1 and the dominant

patient P10 (Fig. 6). Resting cytosolic Ca^{2+} levels were similar between both patients and control myotubes, showing that the mutations do not affect resting Ca^{2+} homeostasis.

We next studied Ca^{2+} release induced by KCl depolarization. Although the dose response curves have similar shapes in patients and controls (EC_{50} 14.3 ± 8.5 for control and 13.2 ± 8.3 for patient cells; Fig. 6), the maximum level of Ca^{2+} released is 2.5 times lower in patients compared to controls. The reduction of the KCl (depolarization)-induced calcium release was not due to a reduction of the size of intracellular Ca^{2+} stores, since there was no significant difference in the total amount of calcium released caused by thapsigargin and ionomycin (Supplementary Figure 3). These results strongly suggest that the *CACNA1S* mutations impair excitation–contraction coupling due to the strong decreased content of *CACNA1S* protein.

Consistent with defects in the ECC, the patients' muscle fibers showed several defects of the triad, including dilated T-tubules and SR (Fig. 2).

Overall, these data indicate that the function of *CACNA1S* and the muscle ultrastructure are similarly altered in both recessive and dominant patients. Pathomechanistically, both mutation types are associated with altered calcium homeostasis and reduced ECC with SR dilatation and myofibrillar disorganization.

Discussion

In this study, we describe a clinical and histopathological cohort of patients with a consistent phenotype of early onset myopathy and mutations in the skeletal muscle alpha 1 subunit of DHPR, *CACNA1S*. Mutations segregated either through recessive or dominant modes of inheritance, or were found as *de novo* mutations in singletons. Two of the mutations, one dominant and one recessive, were tested functionally and both resulted in a significant decrease of EC coupling.

DHPR myopathy and DHPR-related diseases

The described 11 patients from 7 families all display severe early onset myopathy with progressive, generalized predominantly axial muscle weakness, facial involvement with or without ophthalmoplegia, elevated CK in one family, and episodes of periodic paralysis in one patient. The morphological and ultrastructural analyses revealed centralized or internalized nuclei and focal zones of sarcomeric disorganization in several patients. Taken together, this phenotype is reminiscent of findings observed in the myotubular or centronuclear myopathy (CNM) and in core myopathy, conditions in which ophthalmoplegia (an uncommon

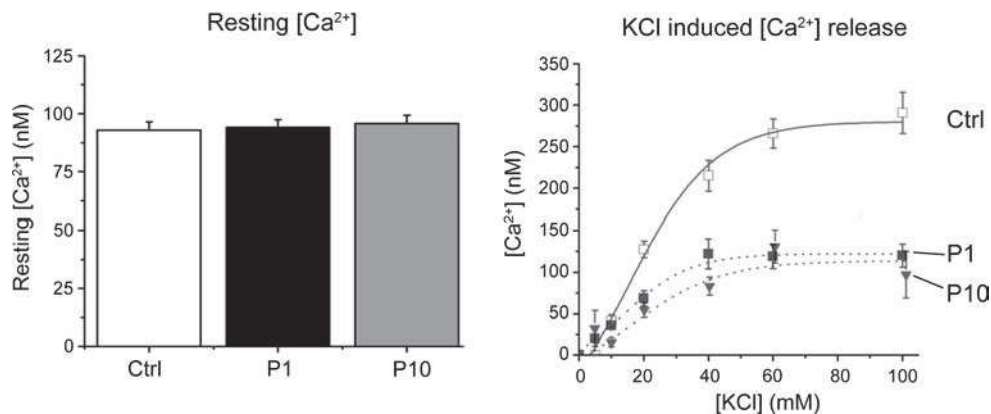


Fig. 6 Impact of recessive and dominant mutations on Ca²⁺ homeostasis. Measurements of the cytosolic Ca²⁺ concentration show no difference between patients P1 (recessive) and P10 (dominant) and controls (*left*). Results show the mean \pm SEM [Ca²⁺] measured in 186, 178, and 98 cells (control, P1, and P10, respectively). The *right*

panel shows the decreased Ca²⁺ release after depolarization by KCl in both P1 and P10 myotubes compared to control myotubes. Results show the mean \pm SEM peak Ca²⁺ release from 5 to 10 myotubes per KCl concentration

feature in other congenital myopathies) is often observed. Those myopathies are also associated with dominant and recessive mutations in *RYR1* [3, 6, 26] and the identification of *CACNA1S* mutations in patients with overlapping phenotype is not unexpected, as DHPR directly regulates the RyR1 Ca²⁺ release channel. The “alveolar” aspect of the intermyofibrillar network observed in the majority of the patients and highlighted with SR labelling both with specific antibodies or oxidative staining and appearing as a dilated SR by electron microscopy is a peculiar and possibly a histopathological hallmark for *CACNA1S* mutations.

In addition, muscle imaging recapitulates some patterns seen in CNM and congenital myopathies. While some patients show relatively mild and non-specific atrophy of muscle groups, three patients from different families had selective involvement of the semitendinosus muscle in the posterior thigh, a finding reported both in early onset CNM due to *DNM2* mutations and in *TTN*-related myopathies [11, 29, 37]. At the level of the leg, family 7 showed a differential pattern with relative preservation of muscles in the anterior compartment (tibialis anterior and posterior) as compared to the soleus and gastrocnemii, a finding which has been described in both *DNM2*- and *RYR1*-related myopathies [17]. However, in addition to such overlapping patterns, there also seems to be a wide spectrum of involvement ranging from very mild atrophy of thigh muscle groups to extensive marked fatty infiltration, suggesting that the imaging of *CACNA1S*-related myopathy is heterogeneous.

The finding of specific histological hallmarks and one of the muscle imaging patterns is of major diagnostic importance, as it can aid in directing the molecular diagnosis towards *CACNA1S* testing. Patients with centronuclear myopathies or cores myopathies without molecular

diagnosis should be reevaluated for specific hallmarks of *CACNA1S* congenital myopathy and offered *CACNA1S* testing if appropriate. Patient P10 and P11 were the only patients displaying elevated CK level; the characterization of additional families will confirm if *CACNA1S* defect leads to dystrophy under certain conditions. We believe that the gene should be included both in NGS panels for congenital muscle disorders and in filtering pipelines for whole-exome sequencing in such cases.

The association of *CACNA1S* with a congenital myopathy phenotype was recently suggested in one patient [14]. This patient displayed a similar phenotype as in our cohort, with congenital myopathy and ophthalmoplegia, and occasional internal nuclei and coarse myofibrillar architecture on muscle biopsy. He carried compound *CACNA1S* variants each inherited from a heterozygous parent, c.4947delA (p.Q1649Qfs*72) and c.3795G>T (p.Q1265H). In that report, no functional validation of the variants pathogenicity was provided, precluding a conclusion on the pathogenicity of the identified variants. Of note is that the predicted frameshift is very close to the frameshift mutation p.L1656Rfs*67 found in our recessive families 1 and 2 (Fig. 4), and we show here that the c.3795G>T change in fact leads to altered splicing in our patient P5 (Fig. 5a).

Dominant *CACNA1S* mutations have been associated with malignant hyperthermia or hypokalemic periodic paralysis [16, 25, 32]. Here, we report for the first time dominant and recessive *CACNA1S* mutations associated with a myopathy. Most *CACNA1S* mutations linked to periodic paralysis are missense changes residing in the voltage-sensing domain (transmembrane segment S4 in each transmembrane domain), while most mutations in malignant hyperthermia are missense mutations in the loop regions (Fig. 4c). In contrast, the myopathy mutations uncovered

in this study in congenital myopathy are evenly distributed in the sequence and structure of *CACNA1S*. Dominant mutations are either in the pore-forming domain (L1367) or in the II–III loop implicated in *RYR1* coupling (P742), while recessive mutations primarily comprise truncations at different spots, or missenses in the pore-forming or voltage-sensing domains. There is thus no strict correlation between the type and location of mutations and the associated diseases, or their severity.

Noteworthy, recessive, and dominant mutations in congenital myopathy lead to similar clinical and histological phenotypes, and our functional studies demonstrated that both mutations types comparably interfere with ECC, suggesting a similar overall alteration of *CACNA1S* function (Fig. 5). However, ophthalmoplegia is not a common sign even if observed in several patients, CK was elevated in only one family and episodes of periodic paralysis were observed in one patient. The discovery of additional *CACNA1S* patients with congenital myopathies and future functional work will specify the overall clinical phenotype and its potential correlation with the position and the transmission mode of the mutations.

The fact that all dominant mutations are missense changes, while heterozygous carriers of recessive mutations are healthy, excludes haploinsufficiency as the underlying pathomechanism in the dominant cases. Instead, the dominant mutations may act through a dominant-negative manner on the WT protein. Indeed, we noted that both recessive and dominant mutations correlated with a strong decrease in overall protein level (Fig. 4), suggesting that DHPR complexes containing a mutant *CACNA1S* subunit form unstable or non-functional tetrads prone to degradation.

None of our patients presented with cardiac involvement. The heart-specific *CACNA1C* alpha 1 subunit is mutated in the Brugada syndrome (MIM#611875) characterized by shortened QT interval and high incidence of sudden death, and in the Timothy syndrome (MIM#61005) characterized by multi-organ dysfunction, including lethal arrhythmias. These findings reflect the exquisite tissue-specific expression of DHPR alpha 1 subunits, *CACNA1C* in heart, and *CACNA1S* in skeletal muscle. More generally, this is also true for the other ten different *CACNA1* (alpha 1) subunits that are mutated in non-muscle diseases, such as hemiplegic migraine, ataxias, bradycardia and deafness, night blindness, or aldosteronism, in relation with their tissue-specific expression [15].

Pathophysiological mechanism

While future experimental work will be needed to decipher the detailed pathological mechanism, the published and present data suggest a sequence of events leading from the *CACNA1S* mutations to the pathology and

muscle disease. As both dominant and recessive mutations can lead to a rather homogeneous phenotype, we hypothesize that they both lead to a decrease in overall DHPR function in skeletal muscle. We show here that several *CACNA1S* mutations strongly reduced Ca^{2+} release after depolarization, while basal cytosolic Ca^{2+} and SR store Ca^{2+} levels are not altered. Of note, a previous study showed that the artificial P742T mutation, affecting the same amino acid that is mutated in our dominant families F5 (p.P742Q) and F6 (p.P742S), strongly reduced ECC, highlighting the importance of the loop between DHPR domains II and III for RyR1 activation [19]. To activate directly RyR1, we used 4-chloro-m-cresol (4-CMC) [41] and observed reduced Ca^{2+} release from the SR in patient 1 (Supplementary Fig. S3). We hypothesize that RyR1 function is impacted by the loss of *CACNA1S* through a feedback regulation or protein stabilization. The KCl-induced dose response curves are strikingly similar to those obtained in patients with RyR1-related central core disease (CCD) [7], although the resting calcium concentration were always higher in myotubes from *RYR1* mutation bearing patients compared to controls. This would then lead to the structural defects observed on histological analysis. In most patient biopsies analyzed, the T-tubules and the SR were frequently dilated or disrupted. Some of them presented an increased frequency of triads by sarcomere. It is unclear at present whether this is an indirect effect of abnormal Ca^{2+} signal or contraction (functional role), or due to the direct alteration in *CACNA1S* protein (structural role). These rather specific alterations were not found in RyR1-related myopathies or in centronuclear myopathies. However, in our study, triads are still formed with visible «feet». Indeed, mice-lacking DHPR (muscular dysgenesis and mdg mouse) or RyR1 (dyspedic) form triadic junctions, with a similar architecture compared to wild type [5, 12, 31]. These data in mice thus suggest that structural defects seen in patients are not linked to a loss of DHPR but rather to altered ECC. Abnormal nuclei positioning and focal zones of myofibrillar disorganization are additional structural defects in patient muscles. The peculiar alveolar appearance of the intermyofibrillar network could be a result of the SR dilatation. Complete knock-out of *CACNA1S* during development is lethal in the mdg mouse [5, 28] and disease onset is antenatal or perinatal in our patients, pointing to an important role of DHPR in perinatal development. Moreover, the role of *CACNA1S* in adult muscle was studied by U7-mediated skipping in adult mice, revealing that decreased *CACNA1S* protein level was linked to muscle atrophy [30]. These data in mice are in agreement with the observation that a low level of *CACNA1S* has to be present in

the muscle. A decreased level lead to the muscle atrophy observed in our patients. While abnormal ECC can explain the severe muscle weakness in patients, it is possible that the concomitant structural defects contribute to the clinical phenotype.

Conclusions

Here, we have characterized the *CACNA1S* congenital myopathy as a specific entity, at the interface between the structural congenital myopathies and the triadopathies defined by alteration of the ECC. The identification of *CACNA1S* mutations in a phenotype of early onset myopathy should allow a better molecular diagnosis, genetic counseling, and prognosis. It also points to *CACNA1S* and ECC as therapeutic targets for the development of treatments that may be facilitated by the already extensive prior knowledge accumulated on DHPR. In addition, treatment by acetazolamide showed positive results on the episodes of periodic paralysis of one patient. The results of this study also expand the clinical and genetic spectra of *CACNA1S* mutations and highlight that DHPR cellular roles are important for perinatal muscle function in human.

Acknowledgements We thank Isabelle Marty for triadin antibody, John Rendu for *RYR1* molecular testing, Anne-Sophie Nicot and Clara Franzini-Armstrong for discussions, Robert Y. Carlier for analysis of MRI images, and Nicola Foulds for clinical discussions. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), University of Strasbourg, the France Génomique National infrastructure, funded as part of the Investissements d’Avenir program managed by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-10-INBS-09), and by Fondation Maladies Rares within the frame of the “Myocapture” sequencing project, ANR-10-LABX-0030-INRT under the frame program Investissements d’Avenir ANR-10-IDEX-0002-02, Association Française contre les Myopathies (AFM-17088), Muscular Dystrophy Association (MDA-186985), Myotubular Trust and Sparks the Children’s medical research charity grant N° 12KCL 01-MT, and the Swiss National Science Foundation grant N° 31003A-146198. T.M.P. was supported by the Diana and Steve Marienhoff Fashion Industries Guild Endowed Fellowship in Pediatric Neuromuscular Diseases. F.M. is supported by the National Institute for Health Research Biomedical Research Centre at Great Ormond Street Hospital for Children NHS Foundation Trust and University College London. The Biobank of the MRC Neuromuscular Centre and the support of the Muscular Dystrophy UK to the Dubowitz Neuromuscular Centre are also gratefully acknowledged.

Web resources ExAC Browser/Exome Aggregation Consortium (URL: <http://exac.broadinstitute.org/>). Exome Variant Server (URL: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) [March, 2012]. 1000 genomes (URL: <http://www.1000genomes.org/>). Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP Build ID: 134) (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>). Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) (URL: <http://www.omim.org/>).

References

- Al-Qusairi L, Laporte J (2011) T-tubule biogenesis and triad formation in skeletal muscle and implication in human diseases. *Skelet Muscle* 1:26. doi:10.1186/2044-5040-1-26
- Amburgey K, McNamara N, Bennett LR, McCormick ME, Acsadi G, Dowling JJ (2011) Prevalence of congenital myopathies in a representative pediatric united states population. *Ann Neurol* 70:662–665. doi:10.1002/ana.22510
- Bevilacqua JA, Monnier N, Bitoun M, Eymard B, Ferreira A, Monges S, Lubieniecki F, Taratuto AL, Laquerriere A, Claeys KG et al (2011) Recessive *RYR1* mutations cause unusual congenital myopathy with prominent nuclear internalization and large areas of myofibrillar disorganization. *Neuropathol Appl Neurobiol* 37:271–284. doi:10.1111/j.1365-2990.2010.01149.x
- Censier K, Urwyler A, Zorzato F, Treves S (1998) Intracellular calcium homeostasis in human primary muscle cells from malignant hyperthermia-susceptible and normal individuals. Effect of overexpression of recombinant wild-type and Arg163Cys mutated ryanodine receptors. *J Clin Invest* 101:1233–1242. doi:10.1172/JCI1993
- Chaudhari N (1992) A single nucleotide deletion in the skeletal muscle-specific calcium channel transcript of muscular dysgenesis (mdg) mice. *J Biol Chem* 267:25636–25639
- Dowling JJ, Lawlor MW, Dirksen RT (2014) Triadopathies: an emerging class of skeletal muscle diseases. *Neurotherapeutics* 11:773–785. doi:10.1007/s13311-014-0300-3
- Ducreux S, Zorzato F, Muller C, Sewry C, Muntoni F, Quinlivan R, Restagno G, Girard T, Treves S (2004) Effect of ryanodine receptor mutations on interleukin-6 release and intracellular calcium homeostasis in human myotubes from malignant hyperthermia-susceptible individuals and patients affected by central core disease. *J Biol Chem* 279:43838–43846. doi:10.1074/jbc.M403612200
- Dulhunty AF, Karunasekara Y, Curtis SM, Harvey PJ, Board PG, Casarotto MG (2005) Role of some unconserved residues in the “C” region of the skeletal DHPR II-III loop. *Front Biosci* 10:1368–1381
- Eberl DF, Ren D, Feng G, Lorenz LJ, Van Vactor D, Hall LM (1998) Genetic and developmental characterization of *Dmca1D*, a calcium channel alpha subunit gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 148:1159–1169
- Engel AG, Franzini-Armstrong C (2004) *Myology, basic and clinical*. McGraw-Hill, New York
- Fischer D, Herasse M, Bitoun M, Barragan-Campos HM, Chiras J, Laforet P, Fardeau M, Eymard B, Guicheney P, Romero NB (2006) Characterization of the muscle involvement in dynamin 2-related centronuclear myopathy. *Brain* 129:1463–1469. doi:10.1093/brain/awl071
- Franzini-Armstrong C, Pincon-Raymond M, Rieger F (1991) Muscle fibers from dysgenic mouse in vivo lack a surface component of peripheral couplings. *Dev Biol* 146:364–376
- Geoffroy V, Pizot C, Redin C, Piton A, Vasli N, Stoetzel C, Blavier A, Laporte J, Muller J (2015) VaRank: a simple and powerful tool for ranking genetic variants. *PeerJ* 3:e796. doi:10.7717/peerj.796
- Hunter JM, Ahearn ME, Balak CD, Liang WS, Kurdoglu A, Corneveaux JJ, Russell M, Huentelman MJ, Craig DW, Carpten J et al (2015) Novel pathogenic variants and genes for myopathies identified by whole exome sequencing. *Mol Genet Genomic Med* 3:283–301. doi:10.1002/mgg3.142
- Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F (2004) The impact of splice isoforms on voltage-gated calcium channel alpha subunits. *J Physiol* 554:609–619. doi:10.1113/jphysiol.2003.052712

16. Jurkat-Rott K, Lehmann-Horn F, Elbaz A, Heine R, Gregg RG, Hogan K, Powers PA, Lapie P, Vale-Santos JE, Weissenbach J et al (1994) A calcium channel mutation causing hypokalemic periodic paralysis. *Hum Mol Genet* 3:1415–1419
17. Klein A, Jungbluth H, Clement E, Lillis S, Abbs S, Munot P, Pane M, Wraige E, Schara U, Straub V et al (2011) Muscle magnetic resonance imaging in congenital myopathies due to ryanodine receptor type 1 gene mutations. *Arch Neurol* 68:1171–1179. doi:10.1001/archneurol.2011.188
18. Knudson CM, Chaudhari N, Sharp AH, Powell JA, Beam KG, Campbell KP (1989) Specific absence of the alpha 1 subunit of the dihydropyridine receptor in mice with muscular dysgenesis. *J Biol Chem* 264:1345–1348
19. Kugler G, Weiss RG, Flucher BE, Grabner M (2004) Structural requirements of the dihydropyridine receptor alpha1S II–III loop for skeletal-type excitation–contraction coupling. *J Biol Chem* 279:4721–4728. doi:10.1074/jbc.M307538200
20. Kung AW, Lau KS, Fong GC, Chan V (2004) Association of novel single nucleotide polymorphisms in the calcium channel alpha 1 subunit gene (Ca(v)1.1) and thyrotoxic periodic paralysis. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1340–1345. doi:10.1210/jc.2003-030924
21. Lu X, Xu L, Meissner G (1994) Activation of the skeletal muscle calcium release channel by a cytoplasmic loop of the dihydropyridine receptor. *J Biol Chem* 269:6511–6516
22. Malfatti E, Bohm J, Lacene E, Beuvin M, Romero NB, Laporte J (2015) A premature stop codon in MYO18B is associated with severe nemaline myopathy with cardiomyopathy. *J Neuromuscul Dis* 2:219–227. doi:10.3233/JND-150085
23. Malfatti E, Romero NB (2016) Nemaline myopathies: state of the art. *Rev Neurol (Paris)* 172:614–619. doi:10.1016/j.neurol.2016.08.004
24. Matthews E, Portaro S, Ke Q, Sud R, Haworth A, Davis MB, Griggs RC, Hanna MG (2011) Acetazolamide efficacy in hypokalemic periodic paralysis and the predictive role of genotype. *Neurology* 77:1960–1964. doi:10.1212/WNL.0b013e31823a0cb6
25. Monnier N, Procaccio V, Stieglitz P, Lunardi J (1997) Malignant-hyperthermia susceptibility is associated with a mutation of the alpha 1-subunit of the human dihydropyridine-sensitive L-type voltage-dependent calcium-channel receptor in skeletal muscle. *Am J Hum Genet* 60:1316–1325
26. Nance JR, Dowling JJ, Gibbs EM, Bonnemann CG (2012) Congenital myopathies: an update. *Curr Neurol Neurosci Rep* 12:165–174. doi:10.1007/s11910-012-0255-x
27. North KN (2011) Clinical approach to the diagnosis of congenital myopathies. *Semin Pediatr Neurol* 18:216–220. doi:10.1016/j.spn.2011.10.002
28. Pai AC (1965) Developmental genetics of a lethal mutation, muscular dysgenesis (Mdg), in the mouse. Ii. Developmental analysis. *Dev Biol* 11:93–109
29. Pfeffer G, Elliott HR, Griffin H, Barresi R, Miller J, Marsh J, Evila A, Vihola A, Hackman P, Straub V et al (2012) Titin mutation segregates with hereditary myopathy with early respiratory failure. *Brain* 135:1695–1713. doi:10.1093/brain/aws102
30. Pietri-Rouxel F, Gentil C, Vassilopoulos S, Baas D, Mouisel E, Ferry A, Vignaud A, Hourde C, Marty I, Schaeffer L et al (2010) DHPR alpha1S subunit controls skeletal muscle mass and morphogenesis. *EMBO J* 29:643–654. doi:10.1038/emboj.2009.366
31. Powell JA, Petherbridge L, Flucher BE (1996) Formation of triads without the dihydropyridine receptor alpha subunits in cell lines from dysgenic skeletal muscle. *J Cell Biol* 134:375–387
32. Ptacek LJ, Tawil R, Griggs RC, Engel AG, Layzer RB, Kwiecinski H, McManis PG, Santiago L, Moore M, Fouad G et al (1994) Dihydropyridine receptor mutations cause hypokalemic periodic paralysis. *Cell* 77:863–868
33. Rebeck RT, Karunasekara Y, Board PG, Beard NA, Casarotto MG, Dulhunty AF (2014) Skeletal muscle excitation–contraction coupling: who are the dancing partners? *Int J Biochem Cell Biol* 48:28–38. doi:10.1016/j.biocel.2013.12.001
34. Rezgui SS, Vassilopoulos S, Brocard J, Platel JC, Bouron A, Arnoult C, Oddoux S, Garcia L, De Waard M, Marty I (2005) Triadin (Trisk 95) overexpression blocks excitation–contraction coupling in rat skeletal myotubes. *J Biol Chem* 280:39302–39308. doi:10.1074/jbc.M506566200
35. Romero NB, Clarke NF (2013) Congenital myopathies. *Handb Clin Neurol* 113:1321–1336. doi:10.1016/B978-0-444-59565-2.00004-6
36. Sekulic-Jablanovic M, Palmowski-Wolfe A, Zorzato F, Treves S (2015) Characterization of excitation–contraction coupling components in human extraocular muscles. *Biochem J* 466:29–36. doi:10.1042/BJ20140970
37. Susman RD, Quijano-Roy S, Yang N, Webster R, Clarke NF, Dowling J, Kennerson M, Nicholson G, Biancalana V, Ilkovski B et al (2010) Expanding the clinical, pathological and MRI phenotype of DNM2-related centronuclear myopathy. *Neuromuscul Disord* 20:229–237. doi:10.1016/j.nmd.2010.02.016
38. Tang ZZ, Yarotsky V, Wei L, Sobczak K, Nakamori M, Eichinger K, Moxley RT, Dirksen RT, Thornton CA (2012) Muscle weakness in myotonic dystrophy associated with misregulated splicing and altered gating of Ca(V)1.1 calcium channel. *Hum Mol Genet* 21:1312–1324. doi:10.1093/hmg/ddr568
39. Treves S, Pouliquin R, Moccagatta L, Zorzato F (2002) Functional properties of EGFP-tagged skeletal muscle calcium-release channel (ryanodine receptor) expressed in COS-7 cells: sensitivity to caffeine and 4-chloro-m-cresol. *Cell Calcium* 31:1–12
40. Wu J, Yan Z, Li Z, Yan C, Lu S, Dong M, Yan N (2015) Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex. *Science* 350:aad2395. doi:10.1126/science.aad2395
41. Zorzato F, Scutari E, Tegazzin V, Clementi E, Treves S (1993) Chlorocresol: an activator of ryanodine receptor-mediated Ca²⁺ release. *Mol Pharmacol* 44:1192–1201

Dihydropyridine receptor (DHPR) congenital myopathy

Vanessa Schartner^{1,2,3,4*}, Norma B. Romero^{5,6*}, Sandra Donkervoort⁷, Susan Treves⁸, Pinki Munot⁹, Tyler Mark Pierson¹⁰, Ivana Dabaj^{11,12,13}, Edoardo Malfatti^{5,6}, Irina Zaharieva⁹, Francesco Zorzato⁸, Osorio Abath Neto⁷, Guy Brochier^{5,6}, Xavière Lornage^{1,2,3,4}, Bruno Eymard¹⁴, Ana Lía Taratuto¹⁵, Johann Böhm^{1,2,3,4}, Hernan Gonorazky^{15,16}, Leigh Ramos-Platt¹⁷, Lucy Feng⁹, Rahul Phadke⁹, Diana Bharucha-Goebel^{7,18}, Charlotte Jane Sumner¹⁹, Mai Thao Bui^{5,6}, Emmanuelle Lacene^{5,6}, Maud Beuvin^{5,6}, Clémence Labasse^{5,6}, Nicolas Dondaine²³, Raphael Schneider^{1,2,3,4,20}, Julie Thompson²⁰, Anne Boland²¹, Jean-François Deleuze²¹, Emma Matthews⁹, Aleksandra Nadaj Pakleza²², Caroline A. Sewry⁹, Valérie Biancalana^{1,2,3,4,23}, Susana Quijano-Roy^{11,12,13,24}, Francesco Muntoni⁹, Michel Fardeau^{5,6}, Carsten G. Bönnemann⁷, Jocelyn Laporte^{1,2,3,4}

*These authors contributed equally

Correspondence: Jocelyn Laporte, jocelyn@igbmc.fr, Ph +33 (0)388653412

¹Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), 1, rue Laurent Fries, BP 10142, 67404 Illkirch, France.

²INSERM U974, 67404 Illkirch, France.

³CNRS, UMR7104, 67404 Illkirch, France.

⁴Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, 67404 Illkirch, France.

⁵Université Sorbonne, UPMC Univ Paris 06, INSERM UMRS974, CNRS FRE3617, Center for Research in Myology, GH Pitié-Salpêtrière, 47 Boulevard de l'hôpital, 75013 Paris, France

⁶Centre de référence de Pathologie Neuromusculaire Paris-Est, Institut de Myologie, GHU Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

⁷National Institutes of Health, National Institute of Neurological Disorders and Stroke Neurogenetics Branch, Neuromuscular and Neurogenetic Disorders of Childhood Section, Bethesda, MD 20892-1477, US

⁸Departments of Anesthesia and Biomedizin, Universitätsspital Basel, 4031 Basel, Switzerland

⁹Dubowitz Neuromuscular Centre and MRC Centre for Neuromuscular Diseases, UCL Great Ormond Street Institute of Child Health, WC1N 1EH, UK

¹⁰Cedars-Sinai Medical Center, Departments of Pediatrics and Neurology & The Board of Governors Regenerative Medicine Institute, 8700 Beverly Boulevard, Los Angeles, CA 90048, US

¹¹Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (AP-HP), Service de Pédiatrie, Hôpital Raymond Poincaré, Garches, Hôpitaux Universitaires Paris-Ile-de-France Ouest, France.

¹²Centre de Référence de Maladies Neuromusculaires Garches-Necker-Mondor-Hendaye (GNMH),

¹³Réseau National Français de la Filière Neuromusculaire (FILNEMUS).

¹⁴Centre de Référence de Pathologie Neuromusculaire Paris-Est, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France

¹⁵Consultant-Neuropathology Department, National Pediatric Hospital J-P-Garrahan and Institute for Neurological Research-FLENI, Buenos Aires, Argentina

¹⁶Present address: Division of Neurology, Department of Pediatrics, The Hospital for Sick Children, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

¹⁷Division of Neurology at Children's Hospital of Los Angeles, Department of Pediatrics, Keck School of Medicine, University of Southern California, 4650 W. Sunset Blvd, Mailstop #34, Los Angeles, CA, 90027, Los Angeles, CA, US

¹⁸Division of Neurology, Children's National Health System, Washington, DC 20010, USA

¹⁹Departments of Neurology and Neuroscience, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205, USA

²⁰ICube - UMR7357, CSTB Complex Systems and Translational Bioinformatics, Faculté de Médecine, F-67000 Strasbourg, France

²¹Centre National de Génotypage, Institut de Génétique, CEA, Evry, France

²²Centre de référence des maladies neuromusculaires Nantes/Angers, Service de Neurologie, CHU Angers, Angers, France.

²³Faculté de Médecine, Laboratoire de Diagnostic Génétique, Nouvel Hôpital Civil, 67000 Strasbourg, France

²⁴Université de Versailles-St Quentin, U1179 UVSQ - INSERM, Montigny, France.

Supplementary material

Supplementary Fig. 1 Histological features in skeletal muscle of P1, P5, P6, P7, P9 and P10. Serial muscle sections from patients P1 and P10 show internalized and centralized nuclei on HE staining, and in some fibers from P5. Some core-like or focal disorganization of the structure can be observed on NADH staining for P1 and P10. The mesh of the intermyofibrillar network displays an “alveolar” aspect on NADH staining of P6, P7 and P9. Images from P1, P6, P7, P9 and P10 have been taken by an objective x20.

Supplementary Fig. 2 Position of two predicted missense mutations in the structure of CACNA1S. The aminoacid Glu100 (left) and Phe275 (right), predicted to be changed into Lysine or Leucine in patients P4 and P3 respectively, are highlighted in blue. The arginine 174 is colored in red and potentially implicated in a hydrogen bound with the Glu100 residue. Display of the 3JBR PDB structure with PyMOL [2].

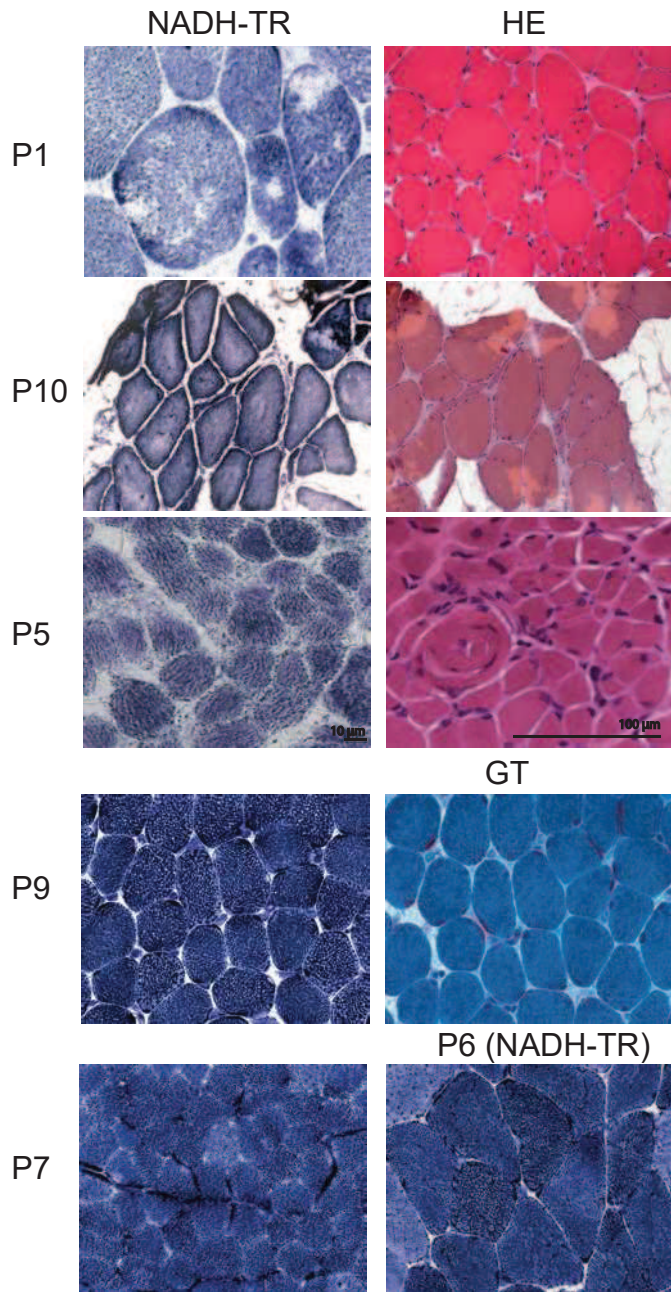
Supplementary Fig. 3 Ca^{2+} store content was determined in Fura-2 loaded P1 myotubes as described [1] by treating myotubes with a cocktail of 1 μM thapsigargin and 1 μM ionomycin in Krebs Ringer containing 100 μM La^{3+} and 0.5 mM EGTA and calculating the peak Ca^{2+} released or Area Under the Curve (arbitrary units). No significant changes in Ca^{2+} store content was noted (left graph). Reduced cytosolic Ca^{2+} content was measured in P1 myotubes compared to control myotubes after 4-chloro-m-cresol (4-CMC) treatment, an agonist of RyR1 (right graph). The number of myotubes available from P10 was not large enough to calculate the Ca^{2+} store content from this patient.

Supplementary Table 1 Primers used for cDNA amplification

Supplementary References

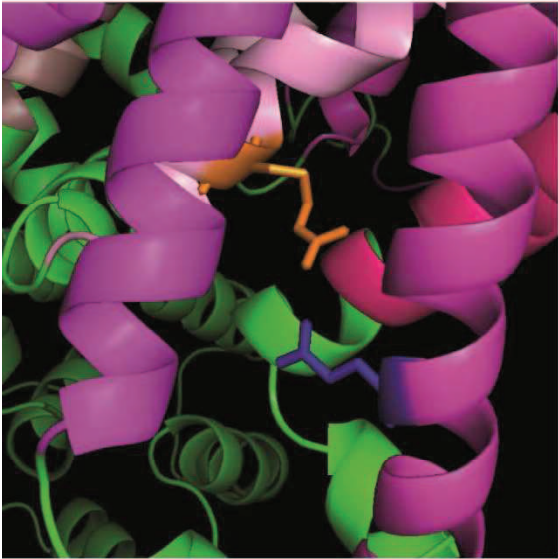
1. Sekulic-Jablanovic, M., Palmowski-Wolfe, A., Zorzato, F. and Treves, S (2016) Characterization of excitation–contraction coupling components in human extraocular muscles. *Biochem J.* 466, 29-36.
2. Wu J, Yan Z, Li Z, Yan C, Lu S, Dong M, Yan N (2015) Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex. *Science* 350:aad2395.

Supplementary Fig 1

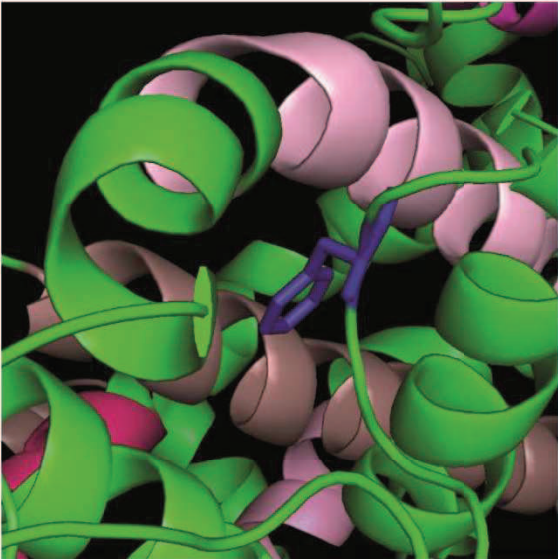


Supplementary Fig. 2

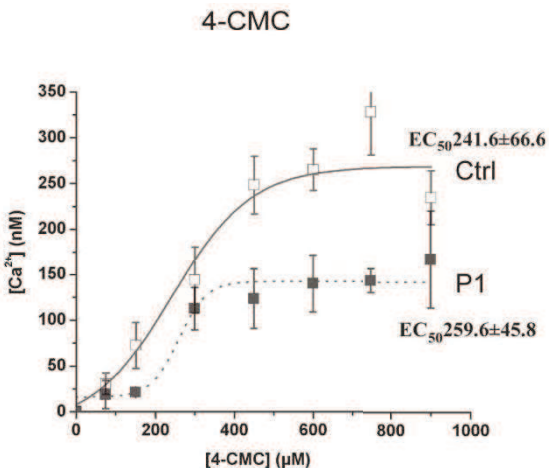
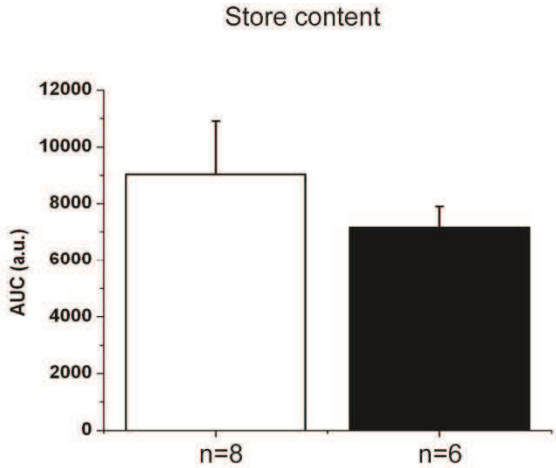
E100K



F275L



Supplementary Fig. 3



Supplementary Table 1. Primers used for cDNA amplification					
Exon containing the variant	Starting material	5' - 3' forward	5' - 3' reverse	Exons amplified	Size (nt)
RT-PCR on muscle					
Exon 9	cDNA	TTCATCCTCAACCTGGTGCT	ATAGACAGGGTGTGAGGGC	Exons 7- 10	382
Exon 40	cDNA	ATGAGGTGACAGTGGGAAG	AGGCGTCTGTCTCTTCTG	Exons 38-41	555
Exon 6	cDNA	CATCTTCAAGGCCATGCTCC	GCACCAGGTTGAGGATGAAG	Exons 5-7	450
Exon 18	cDNA	CTGCAGCTGAAAGAGAAGGC	CTCCACAGTGAAGACAGAGGT	Exon 17-19	249
RT-PCR on cells					
Exon 30	cDNA	CCTGATTGTCATTGGCAGCA	TTCCGGTTTATTGGGTCCC	Exons 28-32	358
Exon 3		TGCCGGAAGATGACAACAAC	GGCCTTGAAGATGGAGTTC	Exons 2-5	361

Vanessa SCHARTNER

Identification et validation fonctionnelle de nouveaux gènes impliqués dans les myopathies

Résumé

Les myopathies congénitales sont des maladies neuromusculaires dont le diagnostic est établi grâce aux données cliniques, histologiques et génétique. Cependant, le diagnostic génétique est manquant pour la moitié des patients, ce qui suggère de nouveaux gènes impliqués. Le but de mon projet était d'identifier de nouveaux gènes de myopathies congénitales et de valider l'impact des mutations trouvées. En utilisant une stratégie d'analyse de séquençage d'exomes de patients déjà exclus pour les gènes connus, nous avons mis en évidence deux nouveaux gènes impliqués dans les myopathies congénitales.

Des mutations récessives dans le gène *PYROXD1*, codant pour une oxydoréductase, causent une myopathie apparaissant à l'enfance avec des défauts spécifiques en histologie. Grâce à un modèle animal, nous avons montré que les mutations impactaient l'activité enzymatique de la protéine.

Des mutations dominantes ou récessives dans le gène *CACNA1S* causent une myopathie avec un phénotype similaire pour toutes les mutations. Les études fonctionnelles ont montré que les mutations causaient un défaut dans le couplage excitation-contraction.

Mots clés : myopathies congénitales ; séquençage d'exomes ; PYROXD1 ; CACNA1S

Résumé en anglais

Congenital myopathies are neuromuscular diseases diagnosed by clinical, histological and genetic data. However, the genetic diagnosis is missing for half of the patients, suggesting new genes involved. The goal of my project was to identify new genes of congenital myopathies and validate the impact of the mutations. Using a strategy of analyzing DNA sequencing of patients already excluded for known genes, we have identified two new genes involved in congenital myopathies.

Recessive mutations in the *PYROXD1* gene, encoding an oxidoreductase, cause a myopathy with childhood-onset and a histology specific spectra. Functional studies showed that the mutations have an effect on the enzymatic activity of the protein.

We showed that dominant or recessive mutations in the *CACNA1S* gene cause a neonatal onset myopathy with a similar phenotype for all found mutations. Functional studies have shown that mutations cause a defect in excitation-contraction coupling.

Key words : Congenital myopathies ; exome sequencing ; PYROXD1 ; CACNA1S