



Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
CNRS - INSERM - Université de Strasbourg
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

Pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline: Sciences du Vivant
Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par

Mirna Assoum

Identification de nouveaux gènes d'ataxies récessives: implication de la mitochondrie et de nouvelles voies physiopathologiques

Soutenue publiquement le 10 Novembre 2010 devant la commission d'examen:

Mr Le Professeur Michel Koenig
Mr Le Professeur Nicolas Lévy
Mme Le Dr. Jamilé Hazan
Mr Le Professeur Stéphane Viville

Directeur de Thèse
Rapporteur externe
Rapporteur externe
Rapporteur interne

Remerciements

Je remercie tout d'abord les Professeurs Nicolas Lévy et Stéphane Viville et le Dr. Jamilé Hazan de me faire l'honneur de participer à ce jury de thèse.

J'exprime toute ma reconnaissance au Professeur Michel Koenig de m'avoir accueillie dans son équipe. Je le remercie de m'avoir initiée à la recherche et de m'avoir guidée pendant ces 5 années. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour tout ce qu'il m'a appris et pour sa patience, son enthousiasme de me communiquer toutes ses connaissances en Génétique Humaine.

Je remercie chaleureusement le professeur Jean-Louis Mandel pour m'avoir accueillie dans l'équipe de Génétique Humaine Strasbourgeoise. Je le remercie pour ses conseils et ses discussions scientifiques.

Je remercie tous nos collaborateurs cliniciens et généticiens pour leur contribution dans tout ce travail. J'exprime toute ma reconnaissance aux patients et à leurs familles.

Un grand merci aux services communs de l'IGBMC : l'équipe des puces (Christelle Thilbaut...); l'ancienne plateforme de séquençage (Serge, Ingrid); service de culture cellulaire, service des peptides, service des anticorps et microscopie.

Je tiens à remercier le CNRS d'avoir financé mes 3 premières années de thèse, l'IGBMC et l'AFM pour ma 4^{ème} année de thèse. Je remercie l'IGBMC pour nous offrir ce contexte international.

Je remercie chaleureusement Nathalie Drouot pour son aide et sa patience. Je remercie les membres anciens «Ataxies récessives» pour leur amitié et collaboration; Clotilde de m'avoir initiée pendant mon stage de Master 2. Je te remercie pour ta patience durant mon Master2. Merci pour les quelques photos que tu m'envoies de temps à autre des états-unis. Je pense que nous nous croiserons quand tu seras de retour en France. Je remercie Mathieu et Moez. Moez, je pense que je te croiserai toujours dans les congrès de génétique. Je remercie Dorra

pour son amitié, sa gentillesse, ses conseils. Je suis contente pour la naissance du petit Moncef.

Je remercie tous les membres passés et présents de l'équipe Génétique Humaine pour leur amitié et leur soutien pendant toutes ces années. Merci à mims pour son sourire chaleureux, Merci à tous les membres de l'équipe PolyQ, l'équipe MTM (tellement nombreux que je ne peux pas les citer tous bien que je les apprécie), l'équipe XFRA, l'équipe retard mental. Je remercie tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin durant ma thèse surtout au niveau technique.

Je remercie chaleureusement Karim pour son amitié, sa compagnie, les discussions scientifiques et ses conseils.

Je remercie Lama pour son amitié, son grand cœur, son soutien et son aide pour moi à mon arrivée à Strasbourg.

Merci à mes voisins Friedreich : Florent car je pense que tu m'as supportée avec ma musique arabe de tous les matins!! Bon, je t'ai aussi supporté pendant ces années. Un grand merci à Laurence pour m'avoir initié à la culture cellulaire. Merci à Alain pour la stratégie de clonage. Merci à Marie, Stéphane, Nadège Calmels, Nadège Vaucamps, Floriana et Julia et les autres pour leurs conseils et leur amitié.

Merci à Marina pour son amitié et son soutien.

Je remercie christine Ayoub pour son amitié, son soutien et tous les bons moments que nous avons passés à Strasbourg. Je remercie mes compatriotes libanais, en particulier Elias qui m'a supportée pendant la rédaction de ma thèse. Un grand merci à Alice, Rita et Anastasia pour leur amitié et leur soutien.

Merci à Soraya pour son soutien, sa présence et son aide précieuse. Merci à Ghada, Nada et leurs maris.

Je remercie Soumiya et Axelle, pour leur amitié.

Je remercie ma famille pour m'avoir soutenue pendant les six années passées en France. Je remercie mon père pour m'avoir toujours encouragée à poursuivre dans la recherche et à découvrir de nouveaux horizons.

Désolée si j'ai oublié d'autres personnes mais sachez que vous comptez pour moi.

Table des matières

Liste des abréviations	6
Liste des Figures	8
Liste des tableaux	9
Introduction.....	10
I. Les ataxies.....	12
A. Aperçu général.....	12
B. Les caractéristiques cliniques et génétiques des ataxies	14
1. Les ataxies dominantes.....	14
2. Ataxies récessives dégénératives.....	16
a. Protéines mitochondriales et stress oxydant	16
a.1. Ataxie de Friedreich	17
a.2. Ataxie spinocérébelleuse avec anémie sidéroblastique liée à l’X	19
a.3. Ataxie avec déficit en vitamine E.....	20
a.4. Abetalipoprotéïnémie	21
a.5. L’ataxie spino-cérébelleuse de début infantile	22
a.6. SANDO et MIRAS: mutations de l’ADN polymérase mitochondriale POLG	24
a.7. La maladie de Refsum	25
b. Réparation de l’ADN.....	26
b.1. L’Ataxie Télangectasie.....	26
b.2. L’ataxie télangectasie-like.....	28
b.3. L’ataxie avec Apraxie Oculomotrice de type 1	29
b.4. L’ataxie avec Apraxie Oculomotrice de type 2	31
b.5. L’ataxie cérébelleuse avec neuropathie de type 1	33
c. Autres mécanismes moléculaires.....	33

c.1. Ataxie spastique autosomique récessive du Charlevoix-Saguenay	33
c. 2. Le syndrome de Marinesco-Sjögren	34
c.3. Ataxie cérébelleuse autosomique récessive de type 1	35
c.4. Syndrome ataxie/tremblement associés à l’X Fragile (FXTAS)	35
II. Les paraplégies spastiques héréditaires.....	39
A. Physiopathologie des PSH.....	39
A.1. Dysfonctionnement Mitochondrial dans les paraplégies spastiques héréditaires	40
A.1.1. SPG7.....	40
A.1.2. SPG13.....	41
A.1.3. SPG31.....	41
A.2. Trafic vésiculaire et transport axonal	41
A.2.1.SP4.....	42
A.2.2. SPG3A.....	43
A.2.3. SPG6.....	44
A.2.4. SPG10.....	44
A.2.5. SPG15.....	45
A.2.6. SPG20 ou Syndrome de Troyer.....	45
A.2.7. SPG11.....	45
A.2.8. SPG21 ou Syndrome de Mast.....	46
A.2.9. Paraplégie spastique héréditaire avec un début infantile	46
III. Trafic Vésiculaire	48
A. Domaines RUN	48
B. Domaines C1 et Diacylglycérol.....	49
C. Trafic vésiculaire et Rab GTPases	50
1. L’endocytose	50
2. Les phosphoinositides	51
3. .Les étapes du transport vésiculaire.....	51

4. Cycle des Rab GTPases.....	53
5. Localisation des Rab GTPases	53
6. Rôle des Rab GTPases dans le système nerveux.....	55
7. Rab GTPases et maladies	55
IV. Stratégie utilisée.....	56
A. Clonage Positionel et cartographie par homozygotie	56
A.1. Mesure statistique de la liaison: le LOD score	57
A.2. Analyse de marqueurs polymorphes du génome	57
A.2.1. Les SNPs (Single Nucleotide Polymorphism).....	58
A.2.2. Analyse de Marqueurs Microsatellites	60
A.3. Recherche de gènes candidats	60
Matériels et Méthodes.....	62
V. Matériels et Méthodes.....	63
A. Production d'anticorps.....	63
B. Clonage du cDNA humain KIAA0226.....	64
C. Culture de fibroblastes	65
D. Transfection des cellules Cos et Hela.....	65
E. Expression protéique par Western-blot.....	66
F. Immunocytochimie	66
Résultats.....	68
Chapitre 1 Résultats	70
Manuscript 1: Molecular diagnosis of known recessive ataxias by homozygosity mapping with SNP arrays.....	71
Chapitre 2 Résultats	73
Manuscript 2: ADCK3, an Ancestral Kinase, Is Mutated in a Form of Recessive Ataxia Associated with Coenzyme Q10 Deficiency.....	74
Chapitre 3 Résultats	76
A. Manuscript 3: Mutations in ABHD12 Cause the Neurodegenerative Disease PHARC: An Inborn Error of Endocannabinoid Metabolism	76

B- Manuscript 4: Targeted next generation sequencing of a 12.5 Mb homozygous region reveals mutations in the ANO10 gene in patients with autosomal recessive cerebellar ataxia.(sous presse AJHG)	76
A. Manuscript 3: Mutations in ABHD12 Cause the Neurodegenerative Disease PHARC: An Inborn Error of Endocannabinoid Metabolism	77
B- Manuscript 4: Targeted next generation sequencing of a 12.5 Mb homozygous region reveals mutations in the ANO10 gene in patients with autosomal recessive cerebellar ataxia.(sous presse AJHG)	79
Chapitre 4 Résultats	81
I. Manuscript 5: Rundataxin, a novel protein with RUN and diacylglycerol binding domains, is mutant in a new recessive ataxia	81
II. Caractérisation fonctionnelle de la rundataxine	81
Manuscript 5: Rundataxin, a novel protein with RUN and diacylglycerol binding domains, is mutant in a new recessive ataxia	82
I. Gène ATP13A4	83
II. Gène KIAA0226	84
II.a Epissage alternatif	85
II.b Caractérisation fonctionnelle de la rundataxine	85
II.b.1. Production d'anticorps et étude de l'expression de la rundataxine	85
II.b.2. Localisation subcellulaire	86
II.b.3. Etude de l'expression de la rundataxine mutante (p.Ala875ValfsX146)	87
Discussion	88
I. Stratégie de cartographie par homozygotie	89
II. Physiopathologie des ataxies récessives	90
A. Protéines mitochondriales et stress oxydatif: cas d'ADCK3 muté dans ARCA2	90
B. L' α/β hydrolase et le système endocannabinoïde	92
C. Implication des canaux ioniques dans les ataxies	92
D. La rundataxine définit une nouvelle voie physiopathologique	93
1. Le domaine RUN	94
2. Le motif DAG	94

3. Expression de la rundataxine.....	95
4. Rubicon (Rundataxine).....	96
5. Rubicon (Rundataxine) et protéines impliquées dans les paraplégies spastiques	101
E. Conclusions et perspectives générales	102
Références Bibliographiques.....	104

Liste des abréviations

2-AG	2-arachidonyl glycérol
ABHD	Alpha/beta hydrolase
ABL	Abetalipoprotéinémie
ADCK3	Kinase contenant un domaine Aarf
adPEO	Ophthalmoplégie progressive externe autosomique dominante
ALS	sclérose latérale amyotrophique
AOA1	Ataxie avec apraxie oculomotrice de type 1
AOA2	Ataxie avec apraxie oculomotrice de type 2
ARCA1	Ataxie cérébelleuse autosomique récessive de type 1
ARCA2	Ataxie cérébelleuse autosomique récessive de type 2
ARSACS	Ataxie spastique autosomique récessive du Charlevoix-Saguenay
AT	Ataxie télangectasie
ATLD	Ataxie télangectasie-like
ATM	Protéine mutée dans l'ataxie télangectasie
ATP	Adénosine triphosphate
AVED	Ataxie avec déficit en vitamine E
CoQ	Coenzyme Q
DAG	Diacylglycérol
DRPLA	Atrophie pallidolusienne dentato-rubrale
EEA1	Antigène 1 des endosomes précoces
EMG	Électromyogramme
FRDA	Ataxie de Friedreich
FXTAS	Syndrome ataxie et tremblement associé à l'X Fragile
GAM	Anticorps secondaire de chèvre anti-IgG souris
GAP	Protéine activatrice de la GTPase
GAR	Anticorps secondaire de chèvre anti-IgG lapin
GDAS	Logiciel d'analyse des puces GeneChip à ADN
GDF	Facteur de déplacement du GDI
GDI	Inhibiteur de dissociation du nucléotide guanine
GEF	Facteur d'échange du nucléotide guanine
GFP	Protéine fluorescente verte
GGT	Géranylgéranyl transférase
GTTYPE	Logiciel d'analyse des génotypes GeneChip
HRM	High resolution melting
IOSCA	Ataxie spino-cérébelleuse de début infantile
IAHSP	paraplégie spastique ascendante héréditaire avec un début infantile
IRM	Imagerie par résonance magnétique
MSS	Syndrome de Marinesco-Sjögren
NBS	Syndrome du Nijmegen
PCR	Amplification en Chaîne par Polymérisation
PEO	Ophthalmoplégie progressive externe
PHARC	Polyneuropathy, Hearing loss, Ataxia, Retinitis pigmentosa and Cataract
PH	Domaine d'homologie à la pleckstrine
PKC	Protéine kinase C

PLEKHM1	Membre 1 de la famille M des protéines contenant un domaine d'homologie à la pleckstrine
POLG	Polymérase gamma
PPIIn	Phosphoinositides
PtdIns	Phosphatidylinositol
PtdIns(3)P	Phosphatidylinositol 3-Phosphate
PtdIns(4,5)P2	Phosphatidyl inositol 4, 5 diphosphate
RD	Maladie de Refsum
REP	protéine escort pour Rab
ROS	Radicaux réactifs à l'oxygène
RT-PCR	PCR avec transcription inverse
SANDO	Neuropathie sensitive ataxiante avec dysarthrie et ophtalmoparésie
SCAs	Ataxies spino-cérébelleuses
SCAN1	Ataxie cérébelleuse avec neuropathie de type 1
SNP	Polymorphisme d'un seul nucléotide
SSBR	Réparation des cassures simple brin
TPPA	Protéine de transfert de l' α -tocopherol
TrkA	Tyrosine kinase A
VLDL	Lipoprotéine à très faible densité
XLSA	Ataxie spinocérébelleuse avec anémie sidéroblastique liée à l'X

Liste des Figures

- Figure 1** Les différents sites de dégénérescence dans les ataxies progressives
- Figure 2** Réparation de l'ADN et ataxies autosomiques récessives
- Figure 3** Physiopathologie des ataxies autosomiques récessives
- Figure 4** Différents signes d'orientation diagnostique des ataxies
- Figure 5** Physiopathologie des paraplégies spastiques
- Figure 6** Différentes étapes du transport vésiculaire contrôlées par les RabGTPases et leur effecteurs
- Figure 7** Cycle de conversion des Rab GTPases
- Figure 8** Localisation des différentes Rab GTPases au niveau de la voie de l'endocytose
- Figure 9** Principe de la cartographie par homozygotie
- Figure 10** Etapes expérimentales de l'étude pangénome par puces de génotypage Affymetrix
- Figure 11** Clonage du cDNA complet de la rundataxine dans le vecteur d'expression PXJ41
- Figure 12** Clonage de la mutation 2927delC dans le vecteur PXJ41
- Figure 13** Analyse de liaison en 3p23-p14.2 de la famille B par puces Affymetrix et marqueurs microsatellites
- Figure 14** ATP13A4
- Figure 15** Expression de la rundataxine dans les cellules Cos transfectées, analysée par western-blot
- Figure 16** Localisation subcellulaire de la rundataxine dans les cellules Hela en immunocytofluorescence
- Figure 17** Colocalisation de la rundataxine avec GFP-Rab7 dans les cellules Hela en immunocytofluorescence par imagerie confocale
- Figure 18** Absence de colocalisation de la rundataxine avec GFP-Rab5 dans les cellules Hela en immunocytofluorescence par imagerie confocale
- Figure 19** Expression en western-blot de la rundataxine mutante dans les cellules Cos et Hela
- Figure 20** Localisation cytosolique des rundataxines normale et mutante dans les cellules Hela en immunocytofluorescence
- Figure 21** Alignement du domaine C1 des PKCs, de la PLEKHM1 et de la rundataxine
- Figure 22** Les différents complexes possibles impliqués dans la régulation de l'autophagie
- Figure 23** Rubicon et PLEKHM1 : rôle dans la voie de l'endocytose

Liste des tableaux

- Tableau 1** Classification des ataxies autosomiques récessives dégénératives proposée par Michel Koenig
- Tableau 2** Classification des ataxies dominantes
- Tableau 3** Classification des ataxies autosomiques récessives dégénératives en fonction du mécanisme physiopathologique impliqué
- Tableau 4** Les différentes paraplégies spastiques
- Tableau 5** Tableau résumant la fonction connue des RabGTPases dans les neurones et les cellules gliales ainsi que leur localisation

Introduction

Les ataxies représentent un groupe hétérogène de maladies neurodégénératives dues le plus souvent à une dégénérescence du cervelet et/ou de la moelle épinière associée à une combinaison variable de signes neurologiques (neuropathie, épilepsie...) et extra-neurologiques (cardiomyopathie, diabète, surdité, rétinite pigmentaire...). Les ataxies représentent généralement 10% des maladies touchant le système nerveux. A ce jour 14 gènes responsables d'ataxies récessives progressives non métaboliques ainsi que plusieurs loci ont été identifiés, mais environ 50% des patients sont sans diagnostic, indiquant que d'autres gènes responsables d'ataxies restent à identifier.

Dans l'introduction, je présenterai les différentes formes d'ataxies héréditaires en détaillant plus particulièrement les ataxies de transmission récessive. Les caractéristiques cliniques de ces ataxies seront décrites ainsi que les mécanismes moléculaires dérégulés dans ces ataxies. Je décrirai les différentes classifications proposées pour les ataxies, en insistant sur la classification des ataxies récessives dégénératives en fonction des mécanismes moléculaires impliqués.

Au cours de ce travail de thèse, j'ai identifié et contribué à l'identification de 4 gènes responsables d'ataxies autosomiques récessives. Ce travail permet de montrer la grande diversité et la complexité des ataxies. L'identification de ces gènes d'ataxie récessive a été réalisée par une approche de clonage positionnel, et plus précisément de cartographie par homozygotie. Le principe de cette approche ainsi que les techniques utilisées seront présentés. J'ai identifié une protéine, que j'ai nommée rundataxine, mutée dans une nouvelle forme d'ataxie. Cette protéine semble être impliquée dans le trafic vésiculaire, une fonction qui se rapproche plus de celle des protéines responsables des paraplégies spastiques dont les différentes formes seront décrites dans l'introduction. La rundataxine possède 2 domaines conservés: un domaine RUN et un domaine similaire au domaine de liaison au diacylglycérol des protéines kinases C. Je détaillerai les fonctions générales de ces deux types de domaines souvent associés aux petites GTPases de la sous-famille des Rab et au transport vésiculaire. Dans la dernière partie de ma thèse, j'ai identifié que la rundataxine colocalise avec Rab7, une GTPase des endosomes tardifs. Je parlerai donc dans l'introduction du transport vésiculaire et des différentes Rab GTPases et en particulier de leur localisation, de leur fonction au niveau du système nerveux et de l'implication de certaines d'entre elles dans les maladies héréditaires.

I. Les ataxies

A. Aperçu général

Les ataxies représentent un groupe hétérogène de maladies neurodégénératives dues le plus souvent à une dégénérescence du cervelet et/ ou de la moelle épinière associée à une combinaison variable de signes neurologiques (neuropathie, épilepsie...) et extra-neurologiques (cardiomyopathie, diabète, surdité, rétinite pigmentaire...). Les ataxies représentent généralement 10% des maladies touchant le système nerveux. Le terme ataxie (du grec.a, sans; taxis,ordre) signifie une incoordination des mouvements volontaires sans altération de la force musculaire (Barboi, 2000). Le terme "ataxie" peut désigner un trouble de la coordination des mouvements d  à un déficit de la sensibilité "profonde" et une atteinte des voies proprioceptives (fibres myélinisées de gros calibres du système nerveux périphérique, ganglions rachidiens postérieurs, colonnes postérieures de la moelle épinière, thalamus, cortex pariétal). Le terme «ataxie» peut désigner aussi la conséquence des lésions du cervelet et de ses connexions afférentes et efférentes, qui se traduisent par une incoordination des mouvements, un tremblement et des troubles de l'équilibre (ataxie cérébelleuse). Comme toutes les maladies du mouvement, les ataxies peuvent être décrites en terme de leur localisation, amplitude, fréquence (sévérité), modulation au cours du temps et les symptômes neurologiques ou extra-neurologiques associés.

Le syndrome cérébelleux est caractérisé par:

- des troubles de l'équilibre et de la marche: la démarche est titubante avec des chutes fréquentes, un élargissement du polygone de sustentation ainsi qu'un écartement des bras pour obtenir l'équilibre. La mise en route est retardée et l'arrêt est incertain.
- un tremblement d'intention: troubles statiques (manque de maintien de la posture) et troubles cinétiques lors de l'exécution des mouvements volontaires en plus d'un tremblement de la tête.
- un retard dans l'initiation du mouvement en plus d'une exagération de son amplitude (hypermétrie). Les mouvements sont difficilement contrôlés: le mouvement est plus lent, son amplitude est exagérée mais garde sa direction. Le geste rate son but ou le dépasse. L'hypermétrie peut être mise en évidence par le test du doigt au nez pour les

membres supérieurs et test du talon au genou pour les membres inférieurs en plus de l'exagération de la flexion de la hanche durant la marche.

- une adiadococinésie: le patient a des difficultés à enchaîner rapidement des mouvements volontaires, successifs et alternatifs (test des marionnettes). Les gestes fins et précis sont maladroits. La coordination motrice est déficiente.
- une asynergie ou perturbation de l'association des mouvements élémentaires lors de l'exécution d'actes complexes. Un patient couché est incapable de s'asseoir sans un soulèvement exagéré des membres inférieurs au-dessus du plan du lit et il ne peut pas se pencher en arrière ou perd l'équilibre par suite du manque de flexion compensatrice des genoux (Barboi, 2000).

Il existe également d'autres symptômes notamment des troubles de la parole (dysarthrie; l'élocution est ralentie et retardée dans son initiation), de la déglutition, de l'oculomotricité et sur le plan orthopédique une scoliose et des pieds creux.

Les ataxies peuvent être héréditaires ou non. Les ataxies non héréditaires peuvent être dégénératives (atrophie multiple du système MSA et ataxie idiopathique avec un début tardif ILOCA) ou acquises (traumatisme, toxicité, infection, immunitaire...). Les ataxies héréditaires peuvent être transmises selon le mode autosomique dominant, autosomique récessif ou récessif lié à l'X. Les ataxies récessives sont dues à des mutations perte de fonction de protéines impliquées dans la survie et le fonctionnement de populations spécifiques de neurones alors que les ataxies spinocérébelleuses dominantes sont dues pour partie à des expansions de triplets CAG codants résultant en une expansion polyglutamine ayant pour effet un gain de fonction toxique. Dans ces dernières, la mort cellulaire est restreinte au système nerveux central, les modifications post-traductionnelles et le repliement des protéines à polyglutamine sont affectés.

Plusieurs classifications ont été proposées pour les ataxies héréditaires. Harding (Harding, 1983; Harding, 1993a) les a classées en fonction des signes cliniques observés et de leur transmission génétique: la plupart des ataxies progressives à transmission récessive se traduisent par un âge de début précoce avant 30 ans, contrairement aux ataxies progressives dominantes. Les ataxies épisodiques, causées par des channelopathies, sont caractérisées par une transmission autosomique dominante et un début précoce durant l'enfance ou au début de l'adolescence. Les ataxies récessives progressives peuvent être classées en trois groupes selon

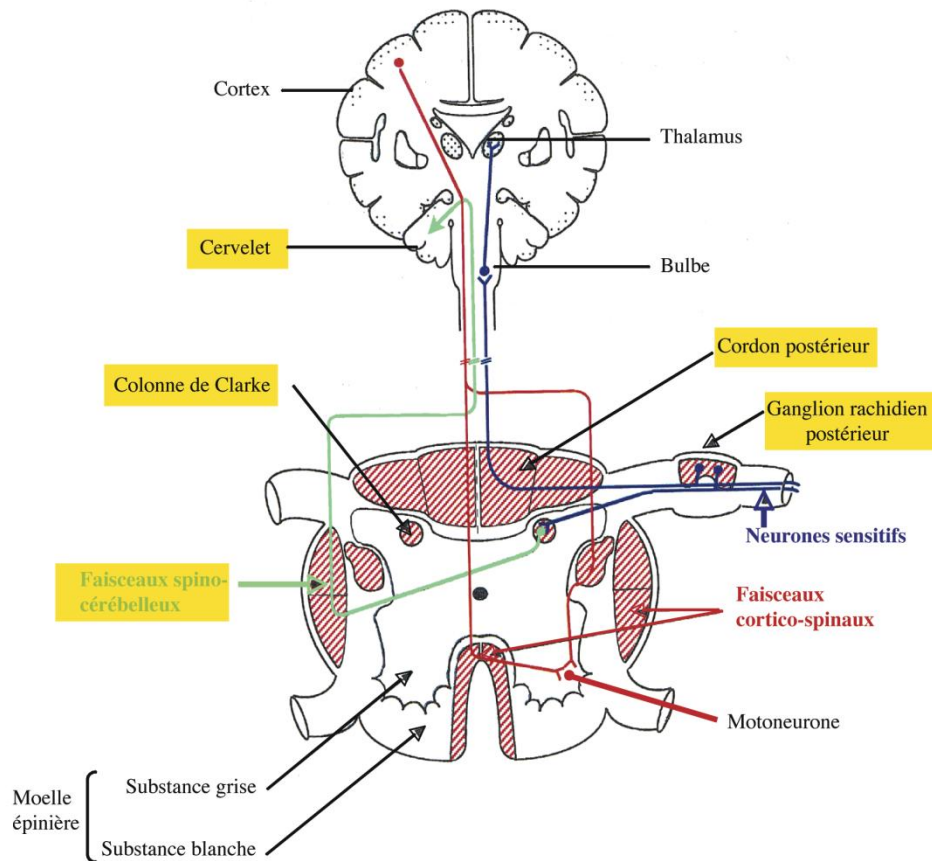


Figure 1: Les différents sites de dégénérescence dans les ataxies progressives

Une atteinte du cervelet est responsable d'une ataxie cérébelleuse pure. Lorsque les faisceaux spino-cérébelleux sont touchés, l'ataxie est une ataxie spino-cérébelleuse. L'ataxie est sensitive en cas de dégénérescence des cordons postérieurs de la moelle épinière. La plupart des ataxies sont mixtes; certaines sont spinocérébelleuses et sensibles d'autres cérébelleuses avec polyneuropathie sensitivo-motrice.

le site majeur de la dégénérescence (Figure 1) qui peut être le cervelet et/ou la moelle épinière: les ataxies cérébelleuses pures dues à une atrophie du cervelet, les ataxies spinocérébelleuses liées à la dégénérescence des faisceaux spino-cérébelleux et les ataxies sensitives dues à la dégénérescence des colonnes postérieures de la moelle épinière (Koenig, 2003). Souvent plusieurs sites sont touchés, comme dans l'ataxie de Friedreich avec une atteinte spinocérébelleuse et sensitive (Tableau 1).

Ces classifications sont controversées surtout sur le plan clinique en raison de la complexité, l'hétérogénéité phénotypique et génotypique des ataxies. Cependant, les ataxies progressives d'origine métabolique font en général partie du groupe des ataxies progressives récessives. Les ataxies congénitales sont également récessives mais ne sont pas ou peu progressives et sont associées à des manifestations phénotypiques dès la naissance et à des anomalies de développement du cervelet et de ses connections.

B. Les caractéristiques cliniques et génétiques des ataxies

1. Les ataxies dominantes

Les ataxies autosomiques dominantes SCAs sont caractérisées par une ataxie progressive due une atteinte du cervelet et de ses connections afférentes et efférentes. Elles sont caractérisées par une perte des cellules de Purkinje et les lésions pathologiques peuvent concerner en plus du cervelet, la moelle épinière, le tronc cérébral, le système nerveux périphérique et la rétine. Les SCAs ont en commun un début qui intervient généralement à l'âge adulte, et une évolution progressive vers un décès prématuré après 10 à 20 ans d'évolution. Plus de 30 loci différents et 18 gènes impliqués ont été identifiés. Les gènes responsables des formes SCA 1,2,3,6,7 et 17 possèdent des expansions CAG traduites en une longue chaîne polyglutamine au niveau de la protéine correspondante. Les SCA 1,2,3,6,7 et 17 appartiennent à un large groupe de maladies à expansions polyglutamine incluant également la maladie de Huntington, l'atrophie dentatorubro-pallido-luysienne et l'atrophie musculaire spino-bulbaire (Schols et al., 2004). En effet, la chaîne polyglutaminique est responsable d'une modification de conformation de la protéine, qui entraîne des altérations des interactions normales de cette protéine, à leur tour responsables d'une dysfonction et d'une mort neuronale. D'autres SCAs possèdent des expansions non codantes comme c'est le cas pour SCA8 (Koob et al., 1999), SCA10 (Wakamiya et al., 2006), SCA12 (Holmes et al.,

Tableau 1: Classification des ataxies récessives dégénératives proposée par Michel Koenig 2003

Maladie	Locus	Gène
Ataxies cérébelleuses pures		
Ataxie cérébelleuse autosomique récessive de type 1 (ARCA1)	6q25	<i>SYNE1</i>
Syndrome de Marinesco-Sjögren (MSS)	5q31	<i>SIL-1</i>
Ataxies cérébelleuses avec polyneuropathie sensitivo-motrice		
Ataxie télangiectasie (AT)	11q22	<i>ATM</i>
Ataxie télangiectasie-like (ATLD)	11q21	<i>MRE11</i>
Ataxie spastique autosomique récessive de Charlevoix-Saguenay (ARSACS)	13q12	<i>SACS</i>
Ataxie avec apraxie oculomotrice de type 1 (AOA1)	9p13	<i>APTX</i>
Ataxie avec apraxie oculomotrice de type 2 (AOA2)	9q34	<i>SETX</i>
Ataxie spino-cérébelleuse plus neuropathie (SCAN1)	14q31	<i>TDP1</i>
Maladie de Refsum (RD)	10p13	<i>PHYH</i>
Ataxies spinocérébelleuses, cordonales postérieures et neuropathiques sensitives		
Ataxie de Friedreich (FRDA)	9q13	<i>FXN</i>
Ataxie avec déficit en vitamine E (AVED)	8q13	<i>TTPA</i>
Abetalipoprotéïnémie (ABL)	4q23	<i>MTTP</i>
Ataxie spino-cérébelleuse de début infantile (IOSCA)	10q24	<i>Twinkle</i>
Neuropathie sensitive ataxiante avec dysarthrie et ophtalmoparésie (SANDO) ou Syndrome avec ataxie mitochondriale récessive (MIRAS)	15q26	<i>POLG</i>

1999) et SCA31 (Sato et al., 2009). SCA12 est une ataxie avec expansion de CAG dans la région non codante du gène *PPP2R2B* codant la sous-unité régulatrice de la phosphatase 2A spécifique des neurones. L'expansion CAG de SCA12 ne code donc pas pour une polyglutamine (Holmes et al., 1999).

Cependant, le nombre de gènes d'ataxies dominantes avec des mutations non expansions croît. C'est le cas de SCA5 due à des mutations dans le gène *SPTBN2* codant la spectrine β -III (Ikeda et al., 2006). SCA11 est due à des mutations dans le gène *TTBK2* codant pour une kinase impliquée dans la phosphorylation de tau (Houlden et al., 2007). Les mutations de la protéine kinase C γ sont responsables de l'ataxie spinocérébelleuse SCA14. PKC γ est exprimée au niveau de différents neurones et en particulier au niveau des cellules de Purkinje du cervelet qui dégèrent dans SCA14. Les mutations de PKC γ perturbent sa translocation à la membrane et l'activation de sa fonction kinase. Ceci résulte en une diminution de la phosphorylation des canaux calciques TRPC3 (canonical transient receptor potential) et une altération du flux calcique. Un taux intracellulaire élevé de calcium est probablement responsable de la neurodégénérescence observée dans SCA14 (Adachi et al., 2008). SCA15 et SCA16 sont causées par des mutations dans le gène *ITPR1* codant pour le récepteur à l'inositol triphosphate de type 1 (Hara et al., 2008; Iwaki et al., 2008). Une mutation dans le gène *FGF14* est responsable de SCA27 (van Swieten et al., 2003). La métalloprotéase mitochondriale *AFG3L2* est mutée dans SCA28 (Di Bella et al.). *AFG3L2* est une AAA-ATPase homologue et s'hétérodimérise avec la paraplégine 7, mutée dans *SPG7*. De plus, des mutations dans le gène *KCNC3* codant pour un canal potassium voltage-dépendant sont responsables de SCA13 (Waters et al., 2006).

Les channelopathies peuvent causer des ataxies épisodiques caractérisées par une transmission autosomique dominante et un début précoce. On peut distinguer les ataxies épisodiques de type 1 et 2 (EA1 et 2) dues à des mutations dans le gène canal potassium voltage-dépendant (*KCNA1*) pour EA1 (Browne et al., 1994) et dans le gène codant pour la sous-unité α 1 du canal calcium de type P/Q cérébral (*CACNA1*) pour EA2 (Ophoff et al., 1996). Des mutations dans le gène *CACNA1* sont aussi associées à une forme familiale de migraine hémiplégique et à l'ataxie spinocérébelleuse de type 6 (SCA6). Les patients avec EA développent des épilepsies. EA1 est caractérisée par des épisodes courts de crises ataxiques avec myokimies et par un âge de début précoce. Les mutations décrites dans le gène *KCNA1* sont distribuées sur tout le gène et altèrent la fonction de kv1.1 en augmentant l'excitabilité neuronale. EA2 est caractérisée par des épisodes plus longs de crises ataxiques et aussi par un

Tableau 2: Classification des ataxies dominantes

SCAs	Gène	Mutation
SCAs à expansions Polyglutamine		
SCA1	ATXN1	Répétition CAG
SCA2	ATXN2	Répétition CAG
SCA3	ATXN3	Répétition CAG
SCA6	CACNA1A	Répétition CAG
SCA7	ATXN7	Répétition CAG
SCA17	TBP	Répétition CAG
DRPLA	ATN1	Répétition CAG
SCAs à expansions non codantes		
SCA8	ATXN8 et ATXN80S	Répétition CTG
SCA10	ATXN10	Répétition ATTCT
SCA12	PPP2R2B	Répétition CAG
SCA31	BEAN-TK2	Répétition TGGAA
SCAs sans expansions		
SCA5	SPTBN2	Mutations faux-sens, délétions
SCA11	TTBK2	Mutations frameshift
SCA13	KCNC3	Mutations faux-sens
SCA14	PRKCG	Mutations faux-sens
SCA15/16	ITPR1	Mutations faux-sens, délétions
SCA27	FGF14	Mutations faux-sens, délétions
SCA28	AFG3L2	Mutations faux-sens
Loci de SCAs		
SCA4 , SCA18, SCA19, SCA20, SCA21, SCA22, SCA23, SCA25, SCA26, SCA30		

âge de début précoce. Les épisodes d'ataxie peuvent être déclenchés dans les 2 formes par un stress physique et émotionnel.

Les différentes ataxies spinocérébelleuses sont résumées dans le tableau 2.

2. Ataxies récessives dégénératives

Notre laboratoire s'est concentré sur les ataxies progressives récessives non métaboliques, indépendamment du site de la pathologie. Dans cette partie je décrirai les caractéristiques cliniques et moléculaires des ataxies récessives dont les gènes ont été identifiés. Les ataxies cérébelleuses récessives recouvrent un grand nombre de maladies rares, les plus fréquentes au sein de la population d'origine européenne étant l'ataxie de Friedreich (prévalence estimée entre 2 et 4 sur 100 000) suivie par l'ataxie télangectasie (1 sur 100 000).

A ce jour 14 gènes responsables d'ataxies récessives progressives non métaboliques ainsi que plusieurs loci ont été identifiés, mais environ 50% des patients sont sans diagnostic, indiquant que d'autres gènes responsables d'ataxies restent à identifier. Les différentes ataxies récessives dégénératives seront présentées en fonction de leur mécanisme physiopathologique. En effet, deux grands mécanismes semblent être communs à plusieurs ataxies récessives: une dysfonction mitochondriale et/ou un stress oxydant et une dysfonction des processus de réparation de l'ADN. Cependant d'autres voies moléculaires, impliquant des protéines liées au cytosquelette ou au contrôle du repliement protéique, sont également dérégulées dans les ataxies dégénératives (Tableau 3).

a. Protéines mitochondriales et stress oxydant

L'ataxie de Friedreich et l'ataxie avec anémie sidéroblastique sont liées à des anomalies du métabolisme des protéines à centre fer-soufre (Fe-S) qui mènent à une production accrue de radicaux libres, alors que l'ataxie avec déficit en vitamine E (AVED) et l'abétalipoprotéïnémie (ABL) partagent le même mécanisme physiopathologique résultant d'une augmentation de la peroxydation des lipides liée à un déficit sévère en vitamine E qui est l'anti-oxydant majeur des membranes à la fois dans les systèmes nerveux central et périphérique. Les différents signes neuropathologiques dus au déficit en vitamine E supportent l'hypothèse qu'elle joue un rôle important dans le maintien de la stabilité et de

Tableau 3: Classification des ataxies autosomiques récessives dégénératives en fonction du mécanisme physiopathologique impliqué

Mitochondrie et stress oxydatif	Réparation de l'ADN et métabolisme des polynucléotides	Autres mécanismes
<p>Ataxie de Friedreich (FRDA)</p> <p>Ataxie spinocérébelleuse avec anémie sidéroblastique liée à l'X (XLSA/A)</p> <p>Ataxie avec déficit en vitamine E (AVED)</p> <p>Abetalipoprotéïnémie (ABL)</p> <p>Ataxie spino-cérébelleuse de début infantile (IOSCA)</p> <p>Mutations polymérase γ (SANDO et Miras)</p>	<p>Ataxie télangiectasie (AT)</p> <p>Ataxie télangiectasie-like (ATLD)</p> <p>Ataxie avec apraxie oculomotrice de type 1 (AOA1)</p> <p>Ataxie avec apraxie oculomotrice de type 2 (AOA2)</p> <p>Ataxie spino-cérébelleuse plus neuropathie (SCAN1)</p>	<p>Ataxie cérébelleuse autosomique récessive de type 1 (ARCA1)</p> <p>Syndrome de Marinesco-Sjögren (MSS)</p> <p>Ataxie spastique autosomique récessive de Charlevoix-Saguenay (ARSACS)</p>

l'intégrité des membranes biologiques en particulier la membrane axonale qui peut être plus vulnérable à un déficit en vitamine E. Enfin, l'ataxie avec début infantile et les syndromes SANDO et MIRAS sont dus respectivement à des mutations dans des gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales *Twinkle* et *POLG* nécessaires au maintien de l'intégrité du génome mitochondrial.

a.1. Ataxie de Friedreich

En 1863, Nicholas Friedreich a décrit une atrophie dégénérative des colonnes postérieures de la moelle épinière survenant chez plusieurs membres de la même fratrie et conduisant à une ataxie progressive, une perte sensitive profonde et une faiblesse musculaire souvent associée à une scoliose, une déformité des pieds et une atteinte cardiaque. L'ataxie de Friedreich (FRDA; MIM 229300) est la forme la plus commune d'ataxie héréditaire avec une prévalence de 1/30000 dans la population caucasienne et une fréquence de porteur évaluée à 1/90 dans la population européenne (Cossee et al., 1997). Les premiers symptômes apparaissent en général avant l'âge de 25 ans et plus souvent vers la période de la puberté. Elle est caractérisée par une ataxie progressive de la marche et des membres, une absence des réflexes tendineux au niveau des membres inférieurs, une neuropathie axonale sensitive suivies après 5 ans d'évolution de la maladie d'une dysarthrie, une aréflexie de tous les membres, une altération de la sensibilité proprioceptive de la vibration, une atteinte pyramidale et des réflexes cutanés plantaires en extension (Harding, 1981; Pandolfo, 2009). L'anomalie la plus précoce de l'ataxie de Friedreich est la perte des corps cellulaires des larges neurones sensitifs situés au niveau des ganglions spinaux (Lamarche et al., 1984) suivie d'une dégénérescence des neurones de la colonne de Clarke et des colonnes postérieures et des faisceaux pyramidaux et spinocérébelleux de la moelle épinière. Une dégénérescence modérée est observée au niveau du cervelet, du pons et du tronc cérébral. D'autres signes non neurologiques sont observés comme une cardiomyopathie hypertrophique (Durr et al., 1996; Harding, 1983) et une incidence élevée de diabète.

Le gène responsable *FXN* a été identifié par clonage positionnel dans notre laboratoire et en collaboration avec l'équipe du Pr. Pandolfo en 1996. Il est localisé sur le chromosome 9q13 et code pour une protéine mitochondriale hautement conservée, la frataxine (Campuzano et al., 1996). 96% des patients sont homozygotes pour une expansion trinuécléotidique GAA allant de 100 à 1300 répétitions au niveau de l'intron 1 du gène et 4% sont des hétérozygotes

composites portant l'expansion GAA sur le premier allèle et une mutation ponctuelle dans les régions codantes sur le 2^{ème} allèle (Campuzano et al., 1996; Cossee et al., 1999; Koutnikova et al., 1997). L'expansion trinuécléotidique résulte en une perte de fonction partielle par réduction de l'expression de la frataxine. Une corrélation inverse existe entre l'âge de début, la sévérité de la maladie et les symptômes associés et la taille des expansions qui peut aller de 100 répétitions jusqu'à 1300 (la taille normale des répétitions GAA étant entre 6 et 40). Les patients avec un début tardif possèdent de petites expansions par rapport aux autres formes de FRDA (Cossee et al., 1997; Durr et al., 1996). La cardiomyopathie, l'atrophie optique ainsi que la perte auditive sont associées avec un âge de début précoce de FRDA et l'âge de perte de la marche qui sont en retour associés avec des expansions GAA plus larges (Durr et al., 1996; Filla et al., 1996; Montermini et al., 1997).

Une grande variabilité clinique est présente entre les patients atteints de FRDA notamment l'âge de début, la rapidité de l'aggravation et l'étendue des manifestations cliniques. Des formes atypiques de FRDA ont été décrites comme l'ataxie de Friedreich avec un début tardif (Lofa: late onset friedreich ataxia) ou l'ataxie de Friedreich avec présence de réflexes ostéo-tendineux (Montermini et al., 1997). La mutation fondatrice G130V est une des mutations ponctuelles les plus fréquentes (Delatycki et al., 1999) et est souvent associée avec des réflexes vifs, une démarche spastique et une absence de dysarthrie (Bidichandani et al., 1997; Cossee et al., 1999). Deux autres mutations ponctuelles ont été décrites avec un effet fondateur I154F dans le sud de l'Italie (Campuzano et al., 1996) et M1I chez 3 patients allemands et suédois (Zuhlke et al., 1998).

La frataxine est essentielle pour le développement embryonnaire puisqu'une délétion complète de la frataxine est létale chez des souris knock-out pour le gène *Fxn* (Cossee et al., 2000). Des modèles murins conditionnels ont été ensuite créés et possèdent les caractéristiques biochimiques et physiopathologiques de la maladie humaine (Puccio et al., 2001; Seznec et al., 2004; Simon et al., 2004). La déficience en frataxine entraîne une réduction sévère de l'activité des enzymes à noyau fer soufre (Martelli et al., 2007; Puccio et al., 2001; Rotig et al., 1997), une accumulation de fer mitochondrial associée à une dérégulation du fer cytosolique (Babcock et al., 1997; Puccio et al., 2001) et une augmentation de la sensibilité aux agents oxydants (Babcock et al., 1997). Des dépôts de fer ont été observés sur des biopsies de cœur de patients FRDA (Lamarche et al., 1980) et dans les mitochondries de souches de levure avec une délétion du gène *Yfh1p*, homologue de la

frataxine (Babcock et al., 1997). Ces données suggèrent que la frataxine joue un rôle important dans le métabolisme du fer et plusieurs hypothèses ont été proposées concernant sa fonction: la biosynthèse des centres fer-soufre (Rotig et al., 1997), le transport du fer (Babcock et al., 1997), le stockage du fer (Adamec et al., 2000), une stimulation de la phosphorylation oxydative (Ristow et al., 2000) et une activité anti-oxydante (Babcock et al., 1997). Le rôle de la frataxine dans la biosynthèse des noyaux fer-soufre associés à des enzymes cytosoliques ou nucléaires a été bien démontrée (Martelli et al., 2007; Schmucker and Puccio). Devant l'implication d'un stress oxydant dans la physiopathologie de FRDA, les stratégies thérapeutiques se sont orientées vers l'utilisation de molécules anti-oxydantes ou des chélateurs de fer. L'idébénone a montré son efficacité dans la réduction de l'hyperthrophie cardiaque (Rustin et al., 2002).

a.2. Ataxie spinocérébelleuse avec anémie sidéroblastique liée à l'X

L'ataxie spinocérébelleuse avec anémie sidéroblastique liée à l'X (XLSA/A; MIM 301310) a été décrite par Pagon chez 6 patients de 2 familles non apparentées. Elle est caractérisée par la présence chez les hommes atteints d'une ataxie cérébelleuse non progressive dès l'âge de 1 an, une diminution des réflexes ostéo-tendineux, une incoordination des mouvements et des taux élevés de protoporphyrine au niveau des érythrocytes. Les patients présentent une anémie hypochrome microcytaire modérée et des sidéroblastes sur des préparations de moelle osseuse (Hellier et al., 2001; Pagon et al., 1985). Les femmes porteuses présentent aussi des anomalies hématologiques mais aucun signe neurologique n'a été observé (Maguire et al., 2001; Pagon et al., 1985).

Le gène responsable de cette ataxie, *ABCB7*, a été localisé sur le chromosome Xq13 (Allikmets et al., 1999; Bekri et al., 2000; Shimada et al., 1998). *ABCB7* code pour un transporteur de type ATP-binding cassette (ABC transporter) localisé au niveau de la membrane interne mitochondriale et est impliqué dans l'export des centres fer-soufre de la mitochondrie vers le cytosol (Kispal et al., 1999). La délétion du gène *ATMI*, orthologue de *ABCB7* chez la levure entraîne une accumulation du fer mitochondrial, un stress oxydant et une instabilité de l'ADN mitochondrial (Kispal et al., 1997). Le phénotype observé est similaire à celui des levures mutantes pour le gène *YFHI*, homologue de la frataxine (Babcock et al., 1997). Le gène de la levure *ATMI* joue un rôle central dans l'export des

centres fer-soufre de la mitochondrie vers le cytosol et dans la maturation des protéines cytosoliques à noyaux fer-soufre.

a.3. Ataxie avec déficit en vitamine E

L'ataxie avec déficit en vitamine E (AVED MIM 277460) décrite en 1981 par Burck est caractérisée par un phénotype très similaire à celui de FRDA avec un âge de début entre 2 et 52 ans, le plus souvent avant 20 ans (Cavalier et al., 1998). Les patients développent une ataxie du tronc et de la marche, une dysarthrie, une aréflexie des membres inférieurs, une abolition des réflexes ostéo-tendineux, la présence de signes de Romberg et des troubles de la sensibilité profonde (Benomar et al., 2002; Cavalier et al., 1998). Bien que l'AVED ressemble à une ataxie de Friedreich typique en ce qui concerne l'âge de début, le tableau clinique et l'évolution de la maladie, les patients AVED ne développent pas de cardiomyopathie et de diabète, présentent des taux effondrés de vitamine E, une dystonie dans 13% des cas, un tremblement de la tête dans 28% des cas et parfois une rétinite pigmentaire (Ben Hamida et al., 1993a; Ben Hamida et al., 1993b; Benomar et al., 2002; Cavalier et al., 1998; Yokota et al., 1996).

L'étude pathologique d'un patient montre une démyélinisation sévère des colonnes postérieures de la moelle épinière, une atrophie des noyaux sensitifs, une perte des cellules de Purkinje au niveau du cervelet et une atrophie modérée des faisceaux pyramidaux latéraux, des ganglions spinaux et des nerfs périphériques (Larnaout et al., 1997). L'AVED est diagnostiquée par un taux sérique trop bas de vitamine E ou α -tocophérol (inférieur à 1-2 mg/L, normal: 6 à 15 mg/L) en absence d'une malabsorption des lipides, exclue par un lipidogramme normal (Ben Hamida et al., 1993b; Harding et al., 1985).

Le gène responsable de l'AVED, *TTPA*, a été localisé au niveau du chromosome 8q13 (Arita et al., 1995; Ben Hamida et al., 1993a) et code pour une protéine cytosolique du foie l' α -TTP (α -tocophérol transfer protein) (Hentati et al., 1996; Ouahchi et al., 1995). Une mutation fondatrice, 744delA, est très fréquemment retrouvée en Afrique du Nord (Marzouki et al., 2005; Ouahchi et al., 1995), une autre mutation fondatrice, 513insTT, est retrouvée en Europe et en Amérique du Nord (Cavalier et al., 1998; Hentati et al., 1996) ainsi qu'une mutation faux-sens, H101Q, au Japon et associée avec un phénotype modéré et un début tardif (Gotoda et al., 1995; Yokota et al., 1997).

La vitamine E est normalement transportée de l'intestin vers le plasma dans les chylomicrons. Les chylomicrons remnants sont repris par le foie et l' α -tocophérol, la seule forme biologique active de la vitamine E circulant dans le plasma, sera transférée du foie aux lipoprotéines VLDL. L'absorption de la vitamine E est normale chez les patients AVED ainsi que son incorporation dans les chylomicrons mais son transfert aux VLDLs, assuré par la protéine α -TTP, est altéré chez les patients AVED (Traber et al., 1990). Les autres formes de vitamine E sont normalement absorbées au niveau de l'intestin grêle et transportées par les chylomicrons jusqu'au foie mais ne sont pas incorporées dans les VLDL par l' α - TTP. En conséquence, les taux plasmatiques de vitamine E sont inférieurs à 10% des valeurs normales dans le cas de l'AVED et les patients doivent être supplémentés en vitamine E.

La vitamine E est une molécule anti-oxydante qui empêche la peroxydation des lipides membranaires et sa déficience est responsable de la dégénérescence neuronale observée suite à un stress oxydant chronique (Taroni and DiDonato, 2004; Yokota et al., 2001). En absence de traitement avec la vitamine E, les patients seront confinés dans un fauteuil roulant après 13 ans d'évolution de la maladie (Benomar et al., 2002; Yokota et al., 1997). Un traitement substitutif en vitamine E (800mg/jour) permet de limiter la progression de la maladie et une amélioration des signes neurologiques notamment ceux de la neuropathie (Gabsi et al., 2001; Martinello et al., 1998). La supplémentation en vitamine E semble être plus efficace dans le cas d'une évolution de moins de 15 ans de la maladie. Dans des cas avancées de la maladie, une supplémentation en vitamine E prévient l'aggravation des symptômes mais aucune amélioration clinique n'est obtenue bien que le taux de vitamine E plasmatique atteigne la valeur normale (Martinello et al., 1998). Un modèle souris knock-out a été développé et présente un début tardif d'ataxie, un tremblement de tête et une dégénérescence rétinienne. Ce modèle montre que l'ataxie et la dégénérescence rétinienne sont associées à une augmentation significative de la peroxydation des lipides extraits du cerveau. De plus, les signes neurologiques peuvent être améliorés par une supplémentation en vitamine E (Yokota et al., 2001).

a.4. Abetalipoprotéinémie

L'abetalipoprotéinémie (ABL; MIM 200100) a été initialement décrite en 1950 par Bassen et Kornzweig chez une fille issue d'une famille juive consanguine. Le tableau clinique ressemblait à celui d'une ataxie de Friedreich mais présentait aussi une rétinite pigmentaire

atypique et la présence d'acanthocytes correspondant à une déformation des érythrocytes (Bassen and Kornzweig, 1950). Les premiers signes neurologiques apparaissent dans l'enfance avec une ataxie cérébelleuse et cordonale postérieure associée à une neuropathie périphérique sensitive. Cette forme rare d'ataxie métabolique est caractérisée par un défaut d'absorption des graisses qui peut apparaître dans la période néonatale et entraîne des taux plasmatiques très bas de triglycérides et de cholestérol ainsi qu'un déficit en vitamines liposolubles (A, E, K). Un traitement restrictif en graisses et de larges doses de vitamines liposolubles est indiqué chez ces patients. Le traitement avec la vitamine E permet de prévenir la progression des signes neurologiques et de la rétinite pigmentaire (Muller and Lloyd, 1982; Muller et al., 1977). Il existe une surcharge lipidique intracellulaire au niveau du foie et de l'intestin, et dans de rares cas la stéatose hépatique peut évoluer vers une cirrhose (Braegger et al., 1998).

L'ABL n'est pas due à des mutations dans le gène Apo-B mais à des mutations dans le gène *MTTP* localisé sur le chromosome 4q23 et codant pour la grande sous-unité de la protéine microsomale de transfert des triglycérides (MTP :Microsomal triglyceride Transfer Protein) (Narcisi et al., 1995; Sharp et al., 1993). La protéine MTP effectue le transfert des esters de triglycérides et de cholestérol entre les vésicules lipidiques. Le déficit en MTP est responsable des défauts de biogénèse des chylomicrons dans l'intestin grêle et des VLDLs contenant l'apo-B dans le foie et de leur sécrétion dans le plasma (Berriot-Varoqueaux et al., 2000; Sharp et al., 1993). L'absence dans le plasma de l'apolipoprotéine B et donc des lipoprotéines VLDL et LDL et des chylomicrons entraîne un défaut d'absorption des graisses et donc une accumulation des triglycérides au niveau des entérocytes intestinaux due à une abolition de leur transport.

L'ABL est une affection rare mais chez les juifs ashkénases la fréquence des hétérozygotes pour une mutation fondatrice (p.G865X) a récemment été évaluée à 1:131 (Benayoun et al., 2007)

a.5. L'ataxie spino-cérébelleuse de début infantile

L'ataxie spino-cérébelleuse de début infantile (IOSCA;MIM 271245) est caractérisée par un début précoce entre 9 et 18 mois et a été décrite dans 13 familles finlandaises comprenant 19 patients (Koskinen et al., 1994). Les signes cliniques comprennent une ataxie spino-cérébelleuse, une neuropathie sensitive progressive, des mouvements athétoïdes, une

hypotonie musculaire, une ophtalmoplégie, une perte auditive, une épilepsie et un hypogonadisme de type hypergonatrophique chez les filles (Lonnqvist et al., 1998). L'IRM montre une atrophie du cervelet, du tronc cérébral, et de la moelle épinière (Nikali et al., 1997). L'examen neuropathologique révèle une neuropathie sensitive axonale avec une perte des fibres larges myélinisées, une atrophie de la moelle épinière et des ganglions rachidiens, similaire à celle observée dans la maladie de Friedreich, ainsi que du tronc cérébral et du cervelet (Lonnqvist et al., 1998). Les signes cliniques observés chez ces patients étaient très similaires de ceux trouvés dans des maladies mitochondriales mais aucune anomalie mitochondriale n'a été observée.

Cependant, IOSCA représente une nouvelle forme d'ataxie récessive (Nikali et al., 1994) et le gène responsable a été localisé par clonage positionnel dans des familles finlandaises au niveau du chromosome 10q24 (Nikali et al., 1997; Nikali et al., 2002; Nikali et al., 1995). Une mutation fondatrice p.Y508C dans le gène C10orf2 codant pour la protéine *twinkle* est présente à l'état homozygote chez tous les patients finlandais (Nikali et al., 2005) à l'exception d'un patient hétérozygote composite héritant en plus de la mutation p.Y508C une mutation silencieuse. Le phénotype neurologique sévère observé chez les patients IOSCA suggère que *twinkle* joue un rôle crucial dans le maintien et/ou la fonction des sous-populations neuronales affectées. La mutation Y508C ne perturbe pas la localisation subcellulaire de *twinkle*.

Twinkle est une hélicase mitochondriale nécessaire au déroulement de l'ADN mitochondrial dans le sens 5' vers 3' d'une manière dépendante de l'ATP et elle est spécifiquement stimulée par l'action de la protéine mitochondriale SSBP (single-strand binding protein) (Korhonen et al., 2003; Spelbrink et al., 2001). L'inhibition de *twinkle* entraîne une déplétion de l'ADNmt alors que sa surexpression induit une accumulation de ce dernier ce qui suggère un rôle primordial de *twinkle* dans la régulation du nombre de copies d'ADNmt (Tyynismaa et al., 2004).

Des mutations dans le gène C10orf2 ont été décrites préalablement chez des individus présentant une ophtalmoplégie dominante externe progressive (adPEO) associée à des délétions de l'ADN mitochondrial (Spelbrink et al., 2001). La maladie se manifeste par une myopathie affectant souvent les muscles extra-oculaires et une intolérance à l'exercice. Cette pathologie présente une accumulation de multiples délétions de l'ADNmt dans les tissus post-mitotiques surtout dans le cerveau, le muscle squelettique et le cœur. AdPEO est génétiquement hétérogène puisqu'en plus des mutations dans le gène *twinkle*, elle peut être

due à des mutations dans les gènes *ANTI* (Kaukonen et al., 2000) ou *PolG* (Van Goethem et al., 2001).

a.6. SANDO et MIRAS: mutations de l'ADN polymérase mitochondriale POLG

Les mutations de *POLG*, codant pour la sous-unité A de l'ADN polymérase γ mitochondriale, sont responsables d'un large spectre de manifestations cliniques avec une sévérité et un âge de début très variables (Horvath et al., 2006; Wong et al., 2008). En effet, les mutations ont été initialement décrites dans l'ophtalmoplégie externe progressive autosomique dominante (adPEO ;MIM 157640) (Van Goethem et al., 2001), puis chez des patients avec un syndrome parkinsonien, une ménopause précoce et des troubles psychiatriques (Luoma et al., 2004). Des mutations récessives de *POLG* ont été associées à l'ophtalmoplégie externe progressive autosomique récessive (arPEO; MIM 258450) (Van Goethem et al., 2001), au syndrome d'Alpers (MIM 203700) caractérisé par un déficit hépatocérébral sévère dans l'enfance avec déplétion de l'ADNmt (Ferrari et al., 2005; Naviaux and Nguyen, 2005; Nguyen et al., 2005), mais également chez des patients avec un syndrome parkinsonien.

Enfin, deux syndromes avec ataxie de transmission récessive ont été associés à des mutations de *POLG* : la neuropathie sensitive ataxiante avec dysarthrie et ophtalmoparésie (SANDO, MIM 607459) (Van Goethem et al., 2003) et le syndrome avec ataxie mitochondriale récessive (également appelé MIRAS) (Hakonen et al., 2005; Winterthun et al., 2005). L'ataxie peut être cérébelleuse ou secondaire à une neuropathie sensitive. Elle peut être associée à une myopathie, une neuropathie périphérique, une ophtalmoplégie, des migraines, une épilepsie ou des myoclonies. La biopsie musculaire peut retrouver des fibres rouges déchiquetées (Ragged Red Fibers). L'étude de l'ADNmt extrait des biopsies musculaires retrouve des délétions multiples de l'ADN.

Le gène *POLG* est localisé en 15q26 et code pour la polymérase γ qui est la seule ADN polymérase localisée dans la mitochondrie. Cette protéine fait partie d'un complexe multi-enzymatique localisé sur la membrane interne de la mitochondrie et qui a un rôle fondamental dans la réplication et la réparation de l'ADNmt. Des mutations de *POLG* ont été décrites sur l'ensemble du gène et sont responsables d'un défaut de la maintenance du génome mitochondrial avec une accumulation secondaire de délétions, de mutations ponctuelles et de déplétion de l'ADNmt (Hudson and Chinnery, 2006) et un déficit de la chaîne respiratoire mitochondriale.

a.7. La maladie de Refsum

La maladie de Refsum (RD,266500) appelée également neuropathie héréditaire sensitivo-motrice de type IV, décrite par Refsum en 1949, est une maladie rare caractérisée par une surcharge en acide phytanique (Refsum et al., 1949). Les symptômes peuvent apparaître à un âge tardif mais généralement apparaissent avant l'âge de 20 ans. Les caractéristiques cliniques principales de ce syndrome incluent en plus de l'ataxie cérébelleuse une rétinite pigmentaire, une polyneuropathie périphérique ainsi que d'autres signes non neurologiques comme une surdité, des arythmies cardiaques, une anosmie, des anomalies de la peau (ichtyose) et des anomalies osseuses, en particulier le raccourcissement de la phalange distale du pouce (Wills et al., 2001).

L'accumulation de l'acide phytanique dans le sang et les autres tissus est due à un déficit en alpha oxydation qui constitue la 1^{ère} étape de dégradation de l'acide phytanique et des autres acides gras à nombre impair d'atomes de carbone au niveau du peroxyosome (Jansen et al., 2000; Jansen et al., 1997). Une réduction de l'apport journalier en acide phytanique peut rétablir son taux plasmatique, entraîner un arrêt de progression de la neuropathie périphérique, l'amélioration de l'ichtyose et la correction des anomalies observées sur l'électrocardiogramme (Wills et al., 2001). Une plasmaphérèse répétée peut améliorer la maladie en diminuant le taux d'acide phytanique circulant (Weinstein, 1999).

La maladie de Refsum est transmise de façon récessive, est génétiquement hétérogène et est due à des mutations dans le gène *PHYH* ou dans le gène *PEX7* (Jansen et al., 1997; Weinstein, 1999; Wills et al., 2001). Le gène *PHYH* localisé sur le chromosome 10pter-p11.2 code pour la phytanyl coenzyme A hydroxylase qui catalyse la première étape de l'alpha oxydation de l'acide phytanique.

Une autre forme infantile de la maladie de Refsum résulte de mutations dans le gène *PEX7*. Le gène *PEX7* code pour le récepteur peroxine 7 qui est indispensable pour l'import peroxisomal des protéines contenant un signal de ciblage peroxisomal PTS2 dont la *PHYH* (van den Brink et al., 2003).

Les maladies peroxysomales sont divisées en 2 parties: la 1^{ère} comprend les maladies associées à un défaut de la biogénèse ou de l'assemblage des peroxyosomes et dans laquelle on distingue: la maladie de Refsum infantile, l'adrénoleucodystrophie néonatale, le syndrome de Zellweger et la chondrodysplasie rhizomélique punctata de type I; la 2^{ème} partie comprend la forme adulte de la maladie de Refsum et l'adrénoleucodystrophie liée à l'X dans lesquelles la structure péroxyosomale est intacte (van den Brink et al., 2003).

b. Réparation de l'ADN

Dans les neurones, plus que 10000 cassures d'ADN ont lieu dans la cellule par jour et peuvent être causées par un stress oxydant ou l'exposition à des agents oxydants. Bien que les cassures simple brin (SSB) sont la forme la plus commune de cassures d'ADN au niveau des neurones, les cassures double brin (DSB) peuvent aussi avoir lieu si les bases touchées sont très proches sur les 2 brins. Un grand nombre de pathologies humaines caractérisées par un dysfonctionnement neurologique sont associées avec des défauts de réparation de l'ADN. Il existe deux groupes distincts dus à des défauts de réparation de l'ADN: le premier est caractérisé à la fois par des déficits neurologiques et extra-neurologiques et inclut l'ataxie télangectasie (AT), l'ataxie télangectasie-like (ATLD) et le syndrome de Nijmegen (NBS) qui résultent de dommages suite à des cassures double brin d'ADN (Figure 2.A). Le second groupe est caractérisé par l'absence de signes extra-neurologiques et inclut les ataxies avec apraxie oculomotrice de types 1 (AOA1) et 2 (AOA2) et l'ataxie spinocérébelleuse avec neuropathie (SCAN1), qui résultent de dommages suite à des cassures simple brin de l'ADN (Figure 2.B). La perte de fonction des différents gènes responsables de ces maladies entraîne la perte précoce des cellules de Purkinje et des neurones des ganglions spinaux.

b.1. L'Ataxie Télangectasie

Le diagnostic de l'AT (AT, MIM 208900) repose sur une triade clinique associant des signes neurologiques dominés par une ataxie cérébelleuse progressive dégénérative survenant à l'âge de 1 à 3 ans, des télangectasies cutanées et conjonctivales, un déficit immunitaire à la fois cellulaire et humoral responsable d'infections sinopulmonaires, une instabilité chromosomique avec une susceptibilité accrue à certains cancers, des défauts de contrôle du cycle cellulaire, une hypersensibilité aux radiations ionisantes. La sensibilité accrue aux radiations ionisantes permet de classer l'AT parmi les syndromes d'instabilité génomique qui résultent de défauts de réponse aux lésions d'ADN (Shiloh, 2003). C'est la deuxième forme la plus fréquente d'ataxie après l'ataxie de Friedreich avec une prévalence de 1 sur 100000. Les patients perdent la capacité de la marche vers l'âge de 10 ans (Chun and Gatti, 2004; Woods and Taylor, 1992). Les télangectasies, dilatations chroniques des capillaires provoquant des tâches rouges sombres au niveau des yeux et de la peau, constituent le 2^{ème} signe clinique de la maladie et apparaissent entre l'âge de 2 à 8 ans. L'AT peut être associée à d'autres signes

A. Réparation des cassures double brin

B. Réparation des cassures simple brin

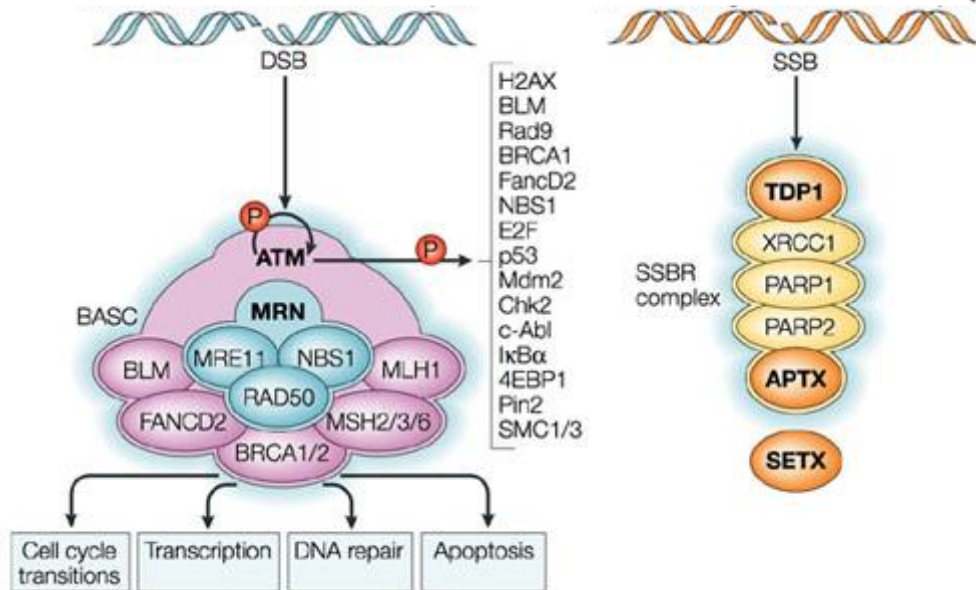


Figure 2: Réparation de l'ADN et ataxies autosomiques récessives

Deux groupes d'ataxies sont dus à des défauts de réparation de l'ADN.

A. Le 1er groupe inclut l'AT et l'ATLD et est caractérisé par un défaut de réparation des cassures double brin de l'ADN (DSBs). ATM est associée au complexe MRE11–RAD50–NBS1 (MRN) qui possède des activités hélicases et exonucléases essentielles pour la reconnaissance et la réparation des cassures double brin. ATM est activée par les cassures double brin et s'autophosphoryle.

B. Le 2ème groupe comprend les ataxies AOA1, AOA2 et SCAN1 et est caractérisé par la réparation des cassures simple brin d'ADN (SSBs). TDP1 et APTX sont des composants du complexe de réparation des cassures simple brin (SSBR) avec les (ADP-ribose) polymérases (PARP) 1 et 2 et XRCC1 (X-ray repair cross-complementing group 1). TDP1 est impliquée dans la réparation des cassures simple brin générées par la topoisomérase I (TOPO1). APTX est impliquée dans la reprise de ligations avortées.

Les cassures d'ADN simple et double brin (DSBs et SSBs) sont causées par un stress génotoxique, par la formation des ROS (reactive oxygen species), ou des radiations ionisantes (IR).

comme la choréoathétose, une apraxie oculomotrice, un retard mental, un diabète, des aberrations chromosomiques le plus souvent des translocations des chromosomes 14 et 7, qui touchent les gènes codant pour les chaînes lourdes de la superfamille des immunoglobulines et pour les récepteurs des lymphocytes T, respectivement.

Un taux sérique augmenté d' α -fœtoprotéine constitue un argument fort pour le diagnostic de l'AT en plus d'une diminution des taux d'immunoglobulines IgA, IgE et IgG (Chun and Gatti, 2004)

Chez les patients âgés de moins de 10 ans, le cervelet apparaît normal sur l'IRM ou montre une atrophie modérée. Cette dernière sera plus marquée et diffuse au niveau du vermis cérébelleux après l'âge de 10 ans. La dégénérescence touche principalement les cellules de Purkinje et granulaires du cervelet. Une certaine corrélation directe existe entre la durée de la maladie et la sévérité de l'atrophie. Les patients les plus jeunes ont l'atrophie la plus modérée et inversement. La plupart des patients incapables de marcher possèdent une atrophie bien marquée mais l'incapacité de la marche peut aussi provenir de l'implication d'autres structures (Tavani et al., 2003). Les cellules en culture des patients présentent une sensibilité accrue aux radiations ionisantes et des cassures chromosomiques sont retrouvées au caryotype (Chun and Gatti, 2004; Gatti, 1991; Woods and Taylor, 1992).

L'AT résulte de mutations dans le gène *ATM* (Savitsky et al., 1995), localisé en 11q22 et constitué de 62 exons codants. Des mutations ont été décrites sur l'ensemble du gène (Campbell et al., 2003). Il s'agit le plus souvent de mutations tronquantes responsables d'une absence complète d'expression de la protéine ATM et du phénotype classique de la maladie. (Gilad et al., 1998). La protéine ATM est une sérine/thréonine kinase dont la partie C-terminale est homologue à une famille de protéines contenant un domaine phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire, la réponse cellulaire aux altérations de l'ADN et donc dans le maintien de la stabilité génomique (Savitsky et al., 1995; Shiloh, 2003). La protéine ATM est ubiquitaire (Savitsky et al., 1995) et est localisée d'une façon prédominante dans le noyau avec une fonction de contrôle de l'intégrité de l'ADN en agissant sur le cycle cellulaire (Chen and Lee, 1996).

Le phénotype des cellules issues de patients atteints suggère une implication du gène *ATM* aussi bien dans la régulation du cycle cellulaire et le mécanisme apoptotique que dans la détection des cassures double-brin et la stabilité génomique. Plusieurs substrats phosphorylés par ATM ont été reportés dont la protéine p53 (Canman and Lim, 1998). ATM interagit avec le complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1) qui a des activités hélicase et exonucléase essentielles pour la reconnaissance et la réparation des cassures double brin (Uziel et al.,

2003) (Figure 2.A). Le complexe MRN est un senseur des dommages d'ADN et sa localisation au niveau de ces cassures est indépendante d'ATM (Lavin et al., 2007). Une caractéristique de la protéine ATM est l'augmentation rapide de son activité kinase immédiatement après l'exposition à des radiations ionisantes ou en présence de cassures double brin d'ADN (Canman and Lim, 1998) et ceci par son auto-phosphorylation entraînant la dissociation du dimère d'ATM en monomères actifs (Bakkenist and Kastan, 2003).

La neurodégénérescence progressive dans AT peut être un résultat d'accumulation de dommages durant le développement. Les souris *Atm*^{-/-} imitent le phénotype des patients AT et montrent un retard de croissance, une infertilité, une prédisposition aux lymphomes thymiques et une sensibilité accrue aux radiations ionisantes mais les symptômes neurologiques sont moins sévères que chez l'homme (Barlow et al., 1996). Les cellules de patients AT et de souris déficientes en *Atm* présentent une instabilité génomique, une sensibilité accrue aux radiations ionisantes et des défauts de réparation des cassures double brin (Herzog et al., 1998). Les cellules de patients AT présentent aussi des fusions télomériques au niveau des chromosomes suggérant une fonction d'ATM au niveau des télomères permettant la protection des extrémités chromosomiques et prévenant leur fusion aberrante et la perte d'information génétique (Pandita et al., 1995).

Des mutations hypomorphes dans deux protéines constituant le complexe MRN, MRE11 et NBS1 ont également été identifiées. En effet, des mutations dans MRE11 sont responsables du syndrome «Ataxia telangiectasia-like disorder» (ATLD; MIM 604391) (Stewart et al., 1999) alors que le syndrome de Nijmegen est dû à des mutations du gène *Nbs1* codant pour la nibrine (Varon et al., 1998). Ce syndrome est caractérisé par une microcéphalie, un retard de croissance, une immunodéficience, une prédisposition aux cancers et l'absence d'ataxie, de télangectasies et de taux élevés d' α -fœtoprotéine. Contrairement aux souris knock-out pour *ATM* (Barlow et al., 1996), une létalité embryonnaire précoce chez les souris des gènes *Mre11* (Xiao and Weaver, 1997) et *Nbs1* (Zhu et al., 2001) a été observée (Ball and Xiao, 2005).

b.2. L'ataxie télangectasie-like

Les patients ATLD (ATLD; MIM 604391) présentent des signes cliniques similaires à ceux de l'AT avec une ataxie cérébelleuse progressive avec un début plus tardif que dans le cas de l'AT. Cependant, les télangectasies sont absentes ainsi que la prédisposition au cancer et l'immunodéficience puisque les patients possèdent des taux normaux d'IgG, IgA et IgM.

Sur le plan biologique, les patients ne présentent pas d'élévation de l' α -fœtoprotéine. Comme les 2 autres syndromes (AT et NBS), ATLD présente une certaine susceptibilité de translocations impliquant surtout les chromosomes 7 et 14 et une sensibilité accrue aux radiations ionisantes (Stewart et al., 1999; Taylor et al., 2004).

Le syndrome ATLD est dû à des mutations dans le gène *MRE11* localisé sur le chromosome 11q21 et contenant 19 exons codants (Stewart et al., 1999). Il est surprenant qu'une déficience en MRE11 conduise à un phénotype AT-like plutôt qu'un phénotype NBS-like. Comme pour NBS, les mutations responsables d'ATLD sont des mutations hypomorphes, c.à.d. entraînant une perte de fonction partielle de la protéine, la perte de fonction totale à l'état homozygote n'étant vraisemblablement pas viable, comme chez la souris.

MRE11 a une activité exonucléase et une activité endonucléase dépendante de l'ATP, qui permet d'ouvrir les structures «en épingle à cheveux» (Paull and Gellert, 1998). Le complexe MRN joue un rôle primordial dans la réparation par recombinaison homologue des cassures double brin de l'ADN, mais également dans d'autres processus tels que le maintien des télomères, les recombinaisons homologues méiotiques ou l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire (Deng et al., 2009). Il se peut que MRE11 et ATM soient associées à la réparation par jonction des extrémités non-homologues (NHEJ), une voie de réparation des cassures double brin qui joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité du génôme.

b.3. L'ataxie avec Apraxie Oculomotrice de type 1

Cette forme d'ataxie a été décrite en premier chez des familles d'origine japonaise par Inoué et al en 1971. Bien que les signes neurologiques observés sont similaires à ceux de l'AT, les signes extra-neurologiques comme les télangectasies, l'immunodéficiences et la susceptibilité aux cancers n'ont pas été reportés dans AOA1 (AOA1; EAOH; MIM 208920). AOA1, appelée également «early-onset ataxia with oculomotor apraxia and hypoalbuminemia», est caractérisée par une ataxie cérébelleuse débutant durant l'enfance, une neuropathie axonale sensitivo-motrice, une hypoalbuminémie, une hypercholestérolémie et une aréflexie précoce. (Aicardi et al., 1988; Barbot et al., 2001; Shimazaki et al., 2002). Elle constitue la 2^{ème} forme d'ataxie la plus fréquente au Portugal (Barbot et al., 2001; Le Ber et

al., 2003). Un début plus tardif à l'âge adulte a été décrit chez certains patients (Criscuolo et al., 2005a; Criscuolo et al., 2004b; Date et al., 2001; Tranchant et al., 2003).

L'IRM met en évidence une atrophie cérébelleuse avec une prédominance vermiennne alors que le tronc cérébral et la moelle épinière apparaissent généralement intacts. L'apraxie oculomotrice correspond à la dissociation entre les mouvements de la tête et des yeux où la tête atteint une cible latérale avant les yeux. Elle est présente chez la plupart des patients (86%). Deux stades phénotypiques distincts peuvent être distingués: une ataxie cérébelleuse et une chorée sont présents au début de la maladie alors que l'apraxie et la neuropathie sont normalement absentes et ensuite une neuropathie sévère et handicapante prédomine le tableau clinique plus tard. Les patients se retrouvent en fauteuil roulant après une évolution de 5 à 20 ans (Le Ber et al., 2003). Des lignées lymphoblastoïdes de patients avec AOA1 montrent une sensibilité élevée aux agents responsables des cassures simple brin de l'ADN, notamment le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et aux agents alkylants (Gueven et al., 2004).

L'identification du gène a été réalisée par l'étude de liaison de 13 familles Portugaises avec AOA1 (Moreira et al., 2001a; Moreira et al., 2001b) et de 7 familles japonaises (Date et al., 2001). 14 mutations dans le gène *APTX* situé en 9p13 ont été décrites jusqu'à présent en particulier la mutation fondatrice en Europe W279X (Moreira et al., 2001b; Tranchant et al., 2003), deux mutations fondatrices au Japon (689insT et P206L) (Date et al., 2001) et une délétion homozygote de tous les exons du gène dans une famille tunisienne avec un phénotype typique de AOA1 (Amouri et al., 2004). Le gène *APTX* comprend 7 exons codants et est caractérisé par un épissage alternatif dans l'exon 3 entraînant l'utilisation d'un codon ATG alternatif dans l'exon 4 responsable de la production d'un isoforme court de la protéine (Date et al., 2001; Moreira et al., 2001b). L'aprataxine, une protéine nucléaire ubiquitairement exprimée, est un membre de la superfamille des protéines à domaine HIT (histidine-triad protein) et possède en plus de ce domaine central un domaine N-terminal de type FHA (forkhead-associated domain) homologue à la région N-terminale de la polynucléotide 5'-kinase 3'-phosphatase (PNKP) (Caldecott, 2003; Moreira et al., 2001b; Sano et al., 2004) et un domaine C-terminal en doigt de zinc (Znf) de liaison à l'ADN/ARN. Les protéines de la superfamille des protéines à domaine HIT sont des nucléotides hydrolases, transférases. Les domaines HIT et FHA sont potentiellement impliqués dans la réparation des cassures simple brin, suggérant que l'aprataxine agit au moins en partie avec le complexe protéique responsable du BER. Les mutations retrouvées sont pour la plupart situées au

niveau du domaine HIT ou du domaine Znf, c.à.d touchant à la fois l'isoforme long et l'isoforme court.

L'aprataxine est présente dans le nucléoplasme et le nucléole (Clements et al., 2004). Elle interagit grâce à son domaine Nter avec XRRC1 (Figure 2.B) ce qui suggère un rôle de l'aprataxine dans la réparation des cassures simple brin de l'ADN par excision de bases (Date et al., 2001; Sano et al., 2004). APTX peut interagir avec P53 par ses domaines FHA et HIT et à PARP-1 grâce aux domaines FHA, NL et HIT (Gueven et al., 2004). XRCC1 joue un rôle central dans le recrutement de protéines telles que la polynucléotide 5'-kinase 3'-phosphatase (PNKP), l'ADN polymérase-beta (POL β) et la DNA ligase III (LIG3) ainsi que PARP-1, formant un complexe multiprotéique de la machinerie BER (base excision repair) du système SSBR impliqué dans la réparation des cassures simple brin (Whitehouse et al., 2001). Grâce à son domaine HIT, l'aprataxine possède une activité enzymatique permettant d'hydrolyser les structures ADP-ADN-5'5'diphosphate qui sont des produits de ligations avortées. Leur résolution permet la réinitiation de l'activité ligase.

b.4. L'ataxie avec Apraxie Oculomotrice de type 2

Cette 4^{ème} forme d'ataxie avec apraxie oculomotrice (AOA2; MIM 606002) a été localisée par liaison génétique au niveau du chromosome 9q34 grâce à l'étude de deux familles japonaises et une famille d'origine pakistanaise présentant une ataxie cérébelleuse avec apraxie oculomotrice et/ou élévation de l' α -fœtoprotéine (Bomont et al., 2000; Nemeth et al., 2000; Watanabe et al., 1998). Cette nouvelle entité est différente de l'ataxie télangectasie (AT) puisqu'elle est caractérisée par un âge de début plus tardif et l'absence des signes non neurologiques de l'AT. L'âge de début est plus tardif que dans le cas de AOA1 et se situe autour de 15 ans (Duquette et al., 2005; Le Ber et al., 2004; Moreira et al., 2004; Tazir et al., 2009). L'ataxie de la marche et la dysarthrie sont les signes initiaux trouvés chez tous les patients. Une ataxie cérébelleuse progressive est observée à l'IRM avec une prédominance vermienne. Une neuropathie sensitivo-motrice caractérisée par la perte de cellules de purkinje du cervelet est commune à tous les patients observés mais se révèle moins sévère que dans le cas de AOA1 (Duquette et al., 2005; Le Ber et al., 2004). L'aparaxie oculomotrice est présente dans 60% des patients. AOA2 partage plusieurs aspects cliniques avec AOA1 incluant l'ataxie cérébelleuse, la neuropathie sensitivo-motrice (93%), l'aparaxie oculo-motrice (47%) mais les deux entités se distinguent par un âge de début plus tardif pour AOA2 (10 à 22

ans contre 2 à 15 ans pour AOA1), un taux élevé de AFP et des taux normaux d'albumine sérique après une longue durée de la maladie. D'autres signes sont variables comme la choréoathétose, les mouvements dystoniques et les taux élevés de créatine kinase. L'élévation du taux d'AFP est normalement modéré dans le cas de AOA2 (<5 fois au dessus de la limite supérieure) comparée à celle observée dans l'AT (10 fois plus que le taux normal) (Anheim et al., 2009a; Anheim et al., 2009c). AOA2 peut être considérée la 3^{ème} cause d'ARCA la plus fréquente après l'ataxie de Friedreich et l'ataxie télangectasie (Anheim et al., ; Le Ber et al., 2004) et la 3^{ème} forme la plus fréquente en Algérie après l'ataxie de Friedreich et AVED (Tazir et al., 2009).

Des mutations du gène *SETX* sont responsables de AOA2 (Moreira et al., 2004). Ce gène contient 24 exons, est ubiquitairement exprimé et code pour la senataxine (Moreira et al., 2004). Malgré l'expression ubiquitaire de *SETX*, la senataxine est présente au niveau du cerveau murin, plus spécialement au niveau du bulbe olfactif, de l'hippocampe et des cellules de purkinje du cervelet (Chen et al., 2006) et présente une localisation nucléaire (Suraweera et al., 2007). La senataxine possède un domaine C-terminal avec 7 motifs hélicase qui appartient à la superfamille I des hélicases. Les deux paralogues les plus proches sont les deux hélicases RENT1/Upf1 impliquée dans la dégradation des ARN médiée par les non-sens et IGHMBP2 mutée dans l'atrophie musculaire spinale avec détresse respiratoire et impliquée dans la transactivation de la transcription. L'homologue de la senataxine chez la levure, Sen1p, est impliqué dans la maturation des ARNs non-codants suggérant un rôle d'hélicase à ADN/ARN pour la senataxine (Rasmussen and Culbertson, 1998; Ursic et al., 2004). La senataxine interagit avec l'ARN polymérase II et donc possède en plus de son rôle potentiel dans la réparation des lésions de l'ADN un rôle dans la régulation de la transcription et la maturation du pré-ARNm (Suraweera et al., 2009).

Les cellules AOA2 montrent une hypersensibilité aux agents génotoxiques tels que H₂O₂, camptothécine et mitomycine C et présentent des défauts de réparation des cassures double brin de l'ADN (Suraweera et al., 2007).

Trois mutations faux sens (T3I, L389S, R2136H) dans le gène *SETX* sont aussi associées à une forme juvénile autosomique dominante de sclérose latérale amyotrophique (ALS4) (Chen et al., 2006). Bien que ALS4 et AOA2 sont phénotypiquement différentes, elles partagent des signes cliniques en commun comme la neuropathie périphérique motrice et la progression lente de la maladie qui conduit à un handicap moteur sévère. Etant donné le type des mutations de *SETX*, des mutations avec une perte partielle ou un gain de fonction dus à la transmission dominante conduisent au développement d'une dégénérescence des

motoneurones inférieurs et supérieurs alors qu'une perte de fonction due à une transmission récessive conduit à l'AOA2. Des anomalies de *SETX* causent probablement un dysfonctionnement nucléaire dans AOA2 qui pourrait être la cause de la neuropathie sensitivo-motrice.

b.5. L'ataxie cérébelleuse avec neuropathie de type 1

Cette forme d'ataxie (*SCAN1*; MIM 607250), décrite dans une grande famille consanguine originaire d'Arabie Saoudite (Takashima et al., 2002), est caractérisée par une ataxie cérébelleuse et une neuropathie sensitivo-motrice sévère associées à une diminution modérée de l'albumine et une hypercholestérolémie. Il n'existe cependant pas d'apraxie oculo-motrice, et la maladie débute à l'adolescence.

Le gène responsable de cette ataxie *TDPI* est localisé en 14q31 et code pour la tyrosyl-DNA phospho-diesterase 1 (Takashima et al., 2002). TDP1 est une enzyme nécessaire à la réparation des cassures simple-brin de l'ADN induites lors du déroulement de l'ADN par des liaisons covalentes de la topoisomerase 1 avec l'ADN, ou par le stress oxydant (H_2O_2) et les radiations ionisantes (Figure 2.B) (El-Khamisy et al., 2005; Ristow et al., 2000).

c. Autres mécanismes moléculaires

c.1. Ataxie spastique autosomique récessive du Charlevoix-Saguenay

L'ataxie spastique autosomique récessive du Charlevoix-Saguenay, (ARSACS, MIM 270550), a été décrite en premier par Bouchard et al en 1978 (Bouchard et al., 1978) dans une cohorte de 200 familles originaires de la région du Charlevoix-Saguenay au nord-est du Québec. Elle est caractérisée par une dégénérescence précoce et marquée du faisceau pyramidal et du vermis cérébelleux supérieur (Bouchard et al., 1998). L'atteinte pyramidale domine le tableau clinique. Il s'agit avant tout d'une spasticité des membres inférieurs associée à un signe de Babinski bilatéral. La maladie apparaît tôt, vers 1 à 2 ans, avec une ataxie et une spasticité apparente progressant rapidement et confinant les patients dans un fauteuil roulant au cours de la 5^{ème} décennie. L'IRM cérébrale met en évidence une atrophie précoce du vermis supérieur et une atrophie progressive des hémisphères cérébelleux et de la moelle épinière (Bouchard et al., 1998). L'âge moyen de début se situe entre 5,4 et 4,5 ans

chez les patients japonais et tunisiens respectivement, indiquant que les patients ARSACS non québécois présentent un début plus tardif de la maladie.

L'ARSACS est due à des mutations dans le gène *SACS* localisé sur le chromosome 13q12.12 codant pour la protéine nucléaire saccine (Engert et al., 2000). Une mutation fondatrice (6594delT) a été trouvée dans la province du Charlevoix-Saguenay. Au moins 28 mutations ont été trouvées chez les patients de différentes origines incluant ceux du Québec, de l'Italie (Criscuolo et al., 2004a; Grieco et al., 2004), la Tunisie (El Euch-Fayache et al., 2003), le Japon (Ogawa et al., 2004; Ouyang et al., 2006; Yamamoto et al., 2005), l'Espagne (Criscuolo et al., 2005b) et la Turquie (Richter et al., 2004).

Le gène *SACS* contient 5 exons codants dont un très grand exon de 12,8 Kb dans lequel la majorité des mutations sont retrouvées (Engert et al., 2000; Ouyang et al., 2006). Le gène est exprimé dans de nombreux tissus et plus fortement au niveau du système nerveux (Engert et al., 2000). La présence au niveau de la protéine de 2 domaines N-terminaux heat-shock HSP90 et d'un domaine Dnaj suggère un rôle de la saccine dans le repliement des protéines médiée par les chaperonnes (Engert et al., 2000).

c. 2. Le syndrome de Marinesco-Sjögren

Le syndrome de Marinesco-Sjögren (MSS; MIM: 248800) est une affection congénitale rare, de transmission autosomique récessive, décrite en 1931 par Marinesco et al. dans une famille Roumaine, puis par Sjögren et al. en 1950 dans 14 familles scandinaves. Il est caractérisé par l'association d'une hypotonie, d'une ataxie cérébelleuse, d'une cataracte bilatérale, d'un retard psychomoteur modéré d'une myopathie et d'un retard de croissance staturopondérale. Des modifications de type myopathique sont observées sur les biopsies musculaires incluant des fibres de taille variable et des vacuoles bordées (Suzuki et al., 1997)

Des mutations dans le gène *SIL1* ont été identifiées par notre équipe en collaboration avec le Pr Lehesjoki (Anttonen et al., 2005; Senderek et al., 2005). *SIL1* code pour une protéine de 461 acides aminés, avec un signal d'adressage vers le réticulum endoplasmique dans la partie N-terminale, et une séquence de rétention dans le réticulum endoplasmique en C-terminal. *SIL1* est un facteur d'échange nucléotidique pour la protéine BiP (aussi appelée HSPA5 ou GRP78) qui est un membre de la famille des chaperonnes HSP70 (Chung et al., 2002). En effet, BiP a une activité ATPase dépendante qui est régulée par *SIL1* laquelle induit la libération de l'ADP et la fixation d'un nouvel ATP sur BiP. BiP est une chaperonne impliquée dans la stabilisation et le repliement des polypeptides nouvellement synthétisés, et

dans le transport rétrograde à travers la membrane du réticulum endoplasmique des protéines aberrantes destinées à être dégradées (Gething, 1999).

c.3. Ataxie cérébelleuse autosomique récessive de type 1

L'ataxie cérébelleuse autosomique récessive de type 1 (ARCA1, également appelée SCAR8 ou ataxie récessive de la Beauce, MIM 610743) a été récemment décrite chez 53 patients d'origine canadienne et plus particulièrement originaires des régions de la Beauce et du Bas-St-Laurent au Québec (Gros-Louis et al., 2007). Tous les individus atteints possèdent un phénotype similaire avec une ataxie cérébelleuse débutant à l'âge adulte, progressant lentement et associée à des anomalies mineures des mouvements extra-oculaires, une incoordination des membres ou encore des réflexes ostéo-tendineux parfois vifs aux membres inférieurs. L'IRM révèle une atrophie cérébelleuse diffuse sans atteinte du tronc cérébral chez l'ensemble des sujets atteints après quelques années seulement d'évolution de la maladie.

Des mutations du gène *SYNE1* localisé en 6q25 ont été identifiées chez les patients ARCA1 (Gros-Louis et al., 2007) et code pour la protéine Syne-1 également appelée nesprine-1. Syne-1 contient des répétitions de type spectrine similaires à celles trouvées dans la dystrophine et l'utrophine ainsi qu'un domaine homologue à la partie C-terminale de la protéine Klarsicht (KASH) chez la drosophile associée avec les noyaux et impliquée dans leur migration et leur localisation (Apel et al., 2000; Grady et al., 2005). En microscopie électronique, Syne-1 (Nesprine-1) est de manière prédominante une protéine de la membrane interne de l'enveloppe nucléaire et colocalise avec les lamines nucléaires A/C, l'émerine et LAP1 au niveau de l'enveloppe nucléaire ce qui suggère que Syne-1 participe à la migration des noyaux et/ou leur ancrage au niveau post-synaptique (Zhang et al., 2001).

Chez les patients ARCA1, Gros-Louis et al. (Gros-Louis et al., 2007) retrouvent une diminution du nombre de noyaux localisés sous la membrane post-synaptique comparé à un muscle contrôle bien que la formation des jonctions neuromusculaires NMJs semble normale. Syne-1 semble être une protéine multifonctionnelle avec des rôles potentiels dans la fonction de l'enveloppe nucléaire interne et le positionnement du noyau dans le cytoplasme.

c.4. Syndrome ataxie/tremblement associés à l'X Fragile (FXTAS)

Le syndrome, FXTAS (MIM 300623) est caractérisé par une ataxie cérébelleuse et/ou un tremblement d'intention débutant après l'âge de 50 ans. Il a été récemment décrit chez des

patients porteurs d'une prémutation pour le syndrome de l'X fragile (Hagerman et al., 2001; Jacquemont et al., 2004; Leehey et al., 2003). FXTAS peut associer des troubles cognitifs et psychiatriques de degrés variables pouvant aller jusqu'à une démence, un syndrome de Parkinson, une neuropathie périphérique et une faiblesse musculaire.

FXTAS est dû à la présence d'une prémutation de 55 à 200 répétitions (CGG)_n dans la partie 5'UTR du gène *FMRI* localisé en Xq27.3. La plupart des prémutations associées à un syndrome FXTAS sont supérieures à 70 répétitions (Jacquemont et al., 2007). Les mutations supérieures à 200 répétitions (CGG)_n sont responsables du syndrome de l'X fragile (MIM 300624) (Kremer et al., 1991; Oberle et al., 1991). Le mécanisme physiopathologique serait un «gain de fonction» toxique de l'ARNm porteur de l'expansion trinuécléotidique (CGG)₅₅₋₂₀₀. FXTAS est donc une des maladies neurodégénératives dues à des expansions dans les parties non codantes d'ARNm et incluant les dystrophies myotoniques de type 1 et 2, les SCA de type 8, 10, 12 (Ranum and Cooper, 2006). L'ARNm porteur de la prémutation pourrait séquestrer les protéines dont la fonction normale est de fixer l'ARNm contenant le motif CGG et entraîner leur déplétion fonctionnelle et des anomalies du métabolisme des ARNm.

Les différentes voies moléculaires impliquées dans les ataxies héréditaires sont schématisées sur la figure 3.

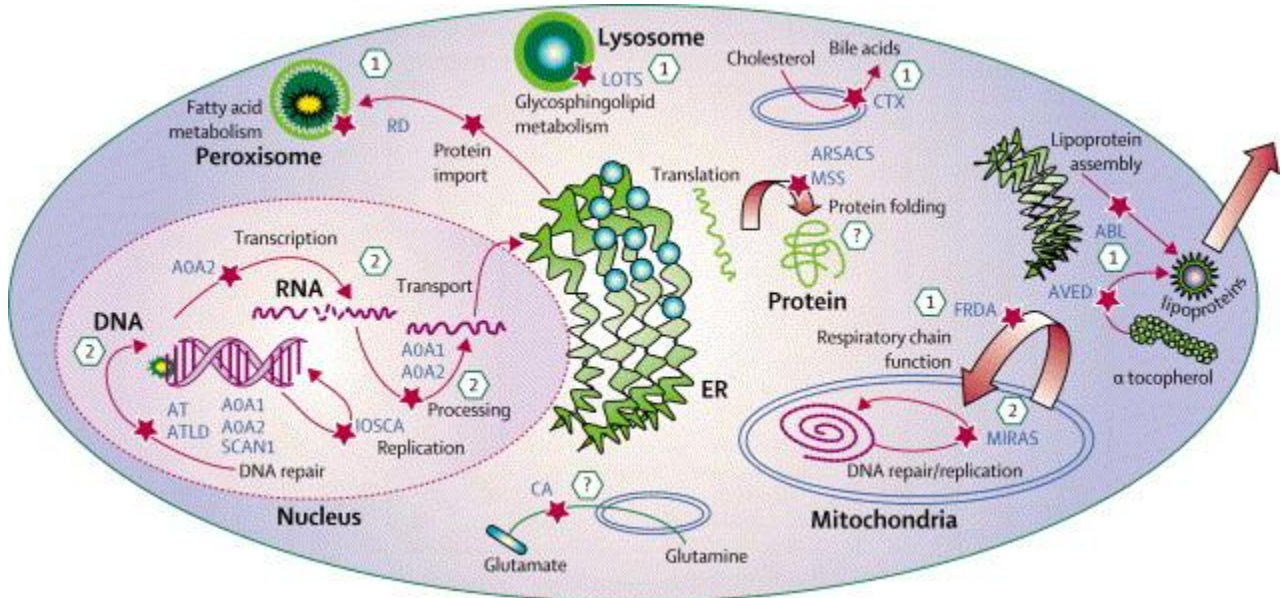


Figure 3: Mécanismes physiopathologiques impliqués dans les ataxies récessives

Les voies défectueuses dans les ataxies autosomiques récessives sont indiquées par une étoile rouge. Les causes des ataxies incluant une augmentation du stress oxydant et d'autres anomalies métaboliques conduisant à la mort cellulaire (1) et l'instabilité génomique (2) sont indiquées.

ER: réticulum endoplasmique. FRDA: ataxie de Friedreich. AVED: ataxie avec déficit en vitamine E. ABL: abetalipoprotéïnémie. RD: syndrome de Refsum. SCAN1: ataxie spinocérébelleuse avec neuropathie axonale. AT: ataxie télangectasie. AOA1: ataxie avec apraxie oculomotrice de type 1. AOA2: ataxie avec apraxie oculomotrice de type 2. ARSACS: ataxie autosomique récessive du Charlevoix-Saguenay. IOSCA: ataxie spinocérébelleuse avec début infantile. MSS: syndrome de Marinesco-Sjögren. CTX: xanthomatose cérébrotendineuse. LOTS: maladie de Tay-Sachs avec début tardif.

(D'après Fogel BL, Perlman S. Lancet Neurol 2007; 6: 245-57)

En conclusion, le diagnostic des ataxies héréditaires peut donc être orienté par les signes cliniques et biologiques caractérisant les différentes formes. Parmi les signes cliniques, on peut citer la spasticité dans ARSACS et les téléangiectasies dans AT. Les signes biologiques constituent un outil important pour le clinicien et peuvent orienter vers l'AVED ou l'ABL dans le cas de taux bas de vitamine E, des taux élevés de l' α -fœtoprotéine dans le cas de l'AT et de AOA2, et des taux élevés d'acide phytanique dans le cas de la maladie de Refsum (Figure 4)

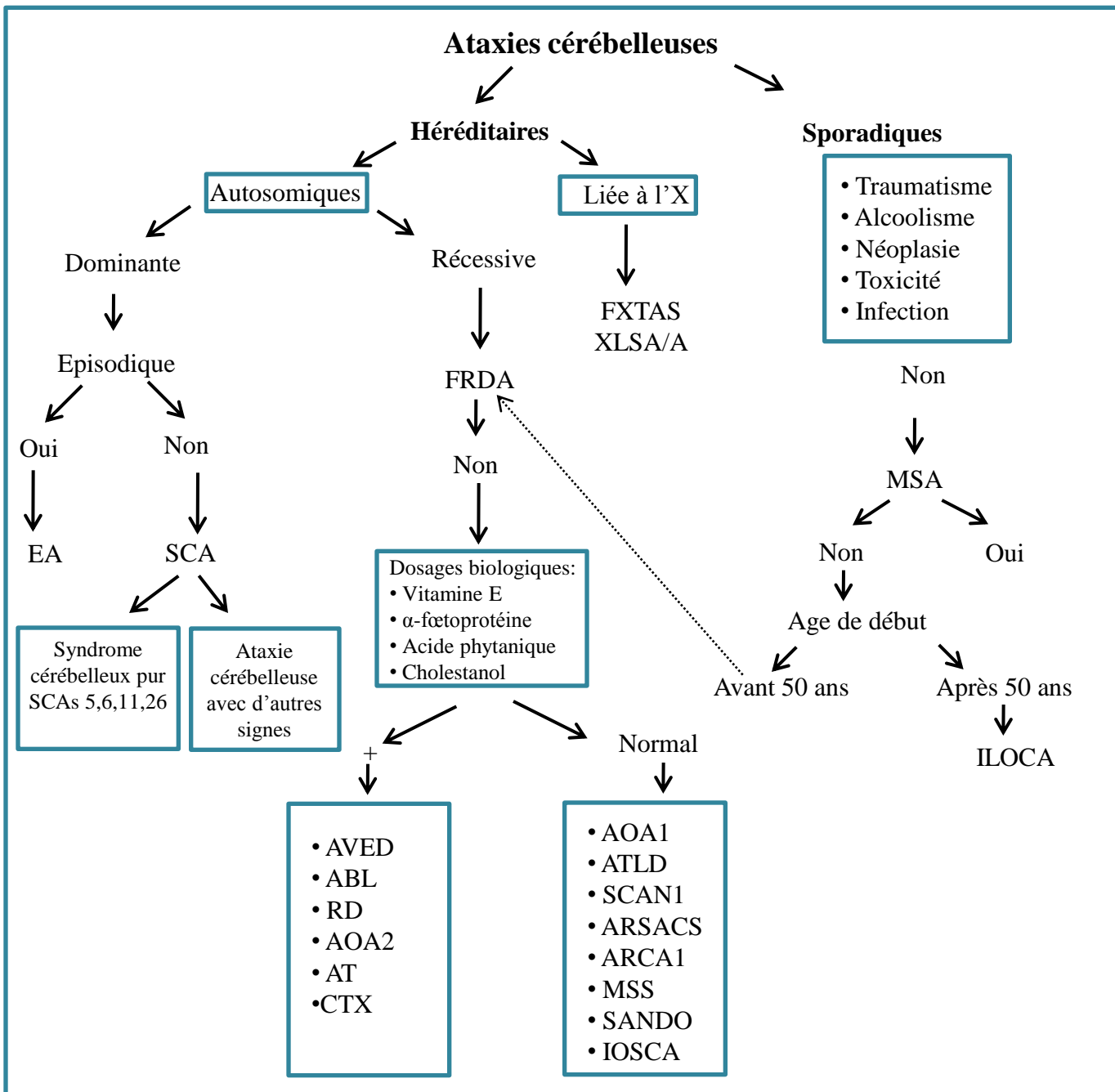


Figure 4: Différents signes d'orientation diagnostique des ataxies

EA: ataxie épisodique. SCA: ataxie spinocérébelleuse. FXTAS: Syndrome ataxie et tremblement associé à l'X Fragile. XLSA/A: Ataxie spinocérébelleuse avec anémie sidéroblastique liée à l'X Fragile. FRDA: ataxie de Friedreich. AVED: ataxie avec déficit en vitamine E. ABL: abetalipoprotéinémie. RD: syndrome de Refsum. AOA2: ataxie avec apraxie oculomotrice de type 2. AT: ataxie télangectasie. CTX: xanthomatose cérébrotendineuse. AOA1: ataxie avec apraxie oculomotrice de type 1. ATLD: Ataxie télangectasie-like. SCAN1: ataxie spinocérébelleuse avec neuropathie axonale. ARSACS: ataxie autosomique récessive du Charlevoix-Saguenay. ARCA1: ataxie autosomique récessive cérébelleuse de type 1. MSS: syndrome de Marinesco-Sjögren. SANDO: neuropathie sensitive ataxiante avec dysarthrie et ophthalmoparésie. IOSCA: ataxie spinocérébelleuse avec début infantile. ILOCA: ataxie cérébelleuse idiopathique avec début tardif .

II. Les paraplégies spastiques héréditaires

Les paraplégies spastiques héréditaires constituent un groupe hétérogène de maladies neurologiques caractérisées par une spasticité et une faiblesse des membres inférieurs, une hyperréflexie, une hypertonicité des membres inférieurs et un signe de Babinski bilatéral. Les patients ont une démarche trébuchante spastique et sollicitent de l'aide avec l'évolution de la maladie. La neuropathologie des HSP a été étudiée seulement dans un petit nombre de cas. Elles peuvent être divisées en deux groupes : les formes pures non compliquées si l'atteinte neurologique est limitée à la spasticité et à la faiblesse des membres inférieurs et les paraplégies compliquées qui peuvent être associées à un des signes suivants: signes cérébelleux, amyotrophie, démence, épilepsie, neuropathie périphérique. Les paraplégies spastiques pures sont marquées par la présence de signes pyramidaux dans les membres inférieurs et progressent lentement. Comme les ataxies progressives, elles peuvent être classées selon leur mode de transmission: autosomique ou lié à l'X, récessif ou dominant. Elles peuvent être classées selon le mécanisme physiopathologique qui peut être dû à des mutations dans des gènes codant pour des protéines mitochondriales ou impliquées dans le transport axonal et le trafic vésiculaire. Les paraplégies spastiques sont hétérogènes et peuvent avoir un âge de début variable (Harding, 1983; Harding, 1993b). Des formes infantiles ont été décrites comme la forme liée à des mutations de l'alsine.

Leur prévalence est estimée entre 3 et 10/100000 dans la population européenne. Plus de 40 loci et 20 gènes ont été identifiés. Les différentes formes de paraplégies spastiques sont résumées dans le tableau 4. Je détaillerai plus les formes impliquées dans le trafic vésiculaire et le transport axonal.

A. Physiopathologie des PSH

La principale caractéristique neuropathologique des PSH est la dégénérescence axonale des parties terminales des voies descendantes (faisceaux corticospinaux) et ascendantes (colonnes dorsales) de la moëlle épinière. La dégénérescence axonale est dépendante de sa longueur.

L'étude des gènes impliqués dans les PSH suggèrent qu'ils affectent le transport axonal des macromolécules et des organelles qui, d'une façon prédominante, touche la partie distale des axones neuronaux. Les axones longs (longueur plus d'1 mètre) sont probablement

Tableau 4: Les différentes paraplégies spastiques

Maladie	Chromosome	Gène	protéine	Mode de transmission	Signes cliniques
SPG1	Xq28	L1CAM	Protéine L1 d'adhésion cellulaire	Liée à l'X	syndrome MASA et hydrocéphalie liée à l'X
SPG2	Xq22	PLP1	protéine protéolipide de la myéline	Liée à l'X	paraplégie spastique pure et compliquée (retard mental et convulsions)
SPG3A	14q12–q21	ATL1	Atlastine	AD	paraplégie spastique pure et compliquée avec début précoce et progression lente
SPG4	2p22	SPAST	Spastine	AD	principalement paraplégie spastique pure avec un âge de début variable
SPG5A	8q21.3	CYP7B1	Cytochrome P450, famille 7, sous-famille B, polypeptide 1	AR	paraplégie spastique pure avec un âge de début variable
SPG6	15q11.2–q12	NIPA1	transporteur du magnésium	AD	paraplégie spastique pure avec un début à l'âge adulte
SPG7	16q24.3	SPG7	Paraplégine	AR	paraplégie spastique pure et compliquée (atrophies optique, corticale et cérébelleuse)
SPG8	8q24	KIAA0196	Strumpelline	AD	paraplégie spastique pure avec un début à l'âge adulte (spasticité marquée)
SPG10	12q13	KIF5A	membre 5A de la famille des Kinésines	AD	paraplégie spastique pure et compliquée avec un début précoce
SPG11	15q21.1	SPG11	Spatacsine	AR	paraplégie spastique pure avec un âge de début variable et un corps calleux fin
SPG13	2q24–q34	HSPD1	Protéine chaperonne 60	AD	paraplégie spastique pure avec un début à l'âge adulte
SPG15	14q24.1	ZFYVE26	Spastizine	AR	paraplégie spastique pure avec un début à l'adolescence (Kjellin syndrome)
SPG17	11q12–q14	BSCL2	Seipine	AD	paraplégie spastique compliquée avec un âge de début variable (Silver syndrome)
SPG20	13q12.3	SPG20	Spartine	AR	paraplégie spastique compliquée avec un début infantile (Troyer syndrome)
SPG21	15q21–q22	SPG21	Maspardine	AR	Paraplégie spastique compliquée avec un début à l'âge adulte précoce (Mast syndrome)
SPG22	Xq13.2	SLC16A2	membre 2 de la famille 16 des porteurs de solutés	Liée à l'X	syndrome d'Allan–Herndon–Dudley (AHDS)
SPG31	2p12	REEP1	Receptor expression-enhancing protein 1	AD	paraplégie spastique pure avec un début variable
SPG39	19p13	PNPLA6	estérase	AR	paraplégie spastique avec une fonte musculaire marquée au niveau des 4 membres
SPG42	3q25.31	SLC33A1	transporteur d'acétyl-CoA	AD	paraplégie spastique pure avec un début variable
SPG44	1q42.13	GJC2	Connexine 47	AR	paraplégie spastique compliquée avec un âge tardif (ataxie, dysarthrie et convulsions)

plus sensibles à des défauts du trafic membranaire, du transport associé aux microtubules, de l'organisation du cytosquelette et du fonctionnement mitochondrial pour un transport efficace des signaux, molécules et organelles vers et à partir des terminaisons nerveuses.

Les mécanismes pathologiques observés incluent donc des défauts de signalisation ou de migration cellulaire, des anomalies de chaperonnes mitochondriales, des anomalies de myélinisation ainsi que des défauts de transport et du trafic intracellulaire (Fink, 2002; Fink, 2003; Salinas et al., 2008). Les différentes protéines impliquées dans les paraplégies spastiques héréditaires ainsi que leur localisation cellulaire sont indiquées sur la figure 5.

A.1. Dysfonctionnement Mitochondrial dans les paraplégies spastiques héréditaires

Il est évident que le dysfonctionnement mitochondrial et le stress oxydatif jouent un rôle important dans les maladies neurodégénératives. Plusieurs gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales sont mutés dans des formes de paraplégies spastiques héréditaires.

A.1.1. SPG7

Cette forme de paraplégie (SPG7 MIM , 607259) est due à des mutations dans le gène localisé sur le chromosome 16q23.4 (Casari et al., 1998). Ce gène code pour la paraplégine, une métalloprotéase mitochondriale qui est un membre de la famille des protéines à domaine AAA ATPase. Des défauts de la phosphorylation oxydative mitochondriale ont été observés sur des biopsies de muscle de patients PSH avec des mutations dans le gène *paraplégine* (Atorino et al., 2003; Casari et al., 1998). La paraplégine est une protéine de la membrane mitochondriale interne où elle forme un complexe avec AFG3L2, une protéase homologue mutée dans une ataxie dominante, SCA28. Ce complexe est aberrant dans les fibroblastes des patients PSH en absence de paraplégine. Ceci entraîne une diminution de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire et une augmentation de la sensibilité au stress oxydant qui peuvent être rétablies par l'expression d'une paraplégine exogène. Le complexe paraplégine-AFG3L2 peut avoir un rôle dans l'assemblage du complexe I et en absence de ce complexe,

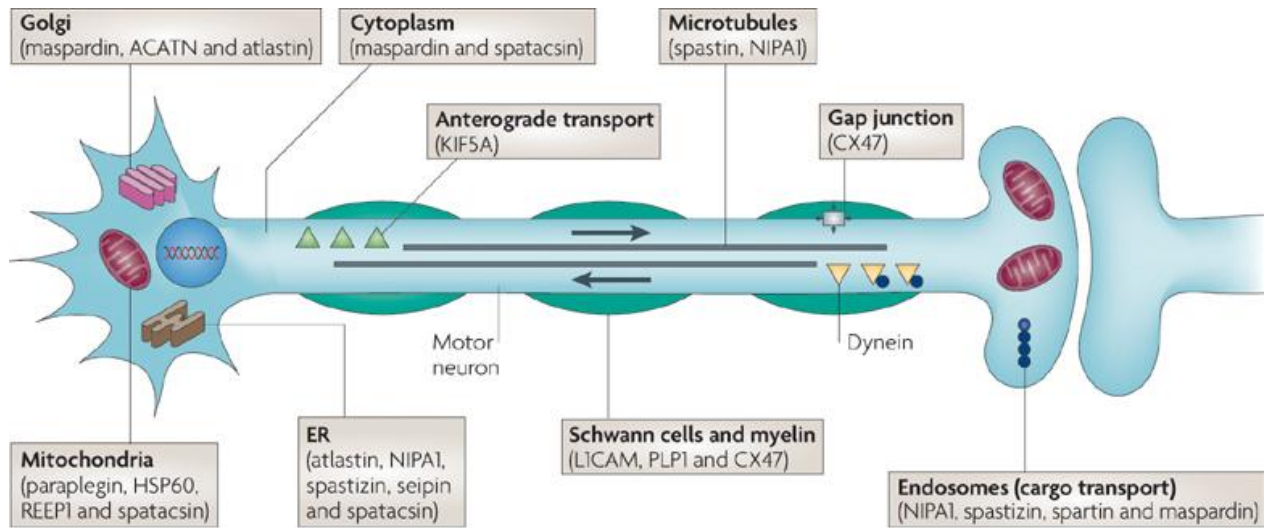


Figure 5 : Physiopathologie des paraplégies spastiques

Deux voies physiopathologiques sont impliquées: le dysfonctionnement mitochondrial et les défauts de transport axonal et cytosolique. La majorité des protéines mutées dans les paraplégies spastiques est liée au transport axonal antérograde ou rétrograde et au trafic vésiculaire. D'autres protéines impliquées sont des protéines mitochondriales.

(D'après Patrick A. Dion, Hussein Daoud and Guy A. Rouleau. Nature Reviews| Genetics volume 10 | November 2009)

des défauts de repliement et d'assemblage des protéines de ce complexe ont été mis en évidence (Atorino et al., 2003).

A.1.2. SPG13

Cette forme de PSH (SPG13, MIM, 605280) est due à des mutations dans le gène codant pour HSP60 (Heat shock protein 60), une chaperonine mitochondriale qui pourra assister au repliement des protéines mitochondriales (Hansen et al., 2002).

A.1.3. SPG31

Le gène *REEP1*, responsable de SPG31 (SPG31, MIM, 610250), est ubiquitairement exprimé et code pour une protéine mitochondriale (Receptor expression-enhancing protein 1) qui a aussi une activité chaperonne (Zuchner et al., 2006).

A.2. Trafic vésiculaire et transport axonal

Le trafic vésiculaire est hautement organisé. L'endocytose commence par la formation des vésicules revêtues de clathrine au niveau de la membrane plasmique et qui contiennent les récepteurs et/ou d'autres protéines transmembranaires. Les vésicules sont transportées le long des microtubules du cytosquelette et ensuite l'attachement et la fusion des endosomes aura lieu pour livrer les macromolécules aux différentes localisations subcellulaires. Ces processus dépendent d'une famille de protéines, telle que la famille des petites Rab GTPases et les protéines associées à l'ESCRT (endosomal sorting complex required for transport).

Le transport axonal qui dépend principalement des microtubules est renforcé par deux classes de moteurs moléculaires, la dynéine (transport rétrograde) et les kinésines (transport antérograde). La dynéine cytoplasmique ubiquitaire appartient à la famille des AAA (ATPase-associated with various cellular activities) et comprend plusieurs sous-unités responsables de l'attachement aux microtubules. La dynéine est nécessaire pour une large variété de processus cellulaires comme la division cellulaire, le maintien du golgi et en particulier le transport axonal au niveau des neurones. Dans la plupart des cas, HSP semble être progressive mais elle peut aussi être non progressive. Les PSH sont des maladies neurodégénératives dont l'étiologie peut être neurodéveloppementale pour une fraction d'entre elles, comme SPG1 et SPG3A (Fink, 2002; Fink, 2003; Salinas et al., 2008).

A.2.1.SPG4

SPG4 (MIM, 182601) est une forme de paraplégie spastique pure de transmission autosomique dominante. SPG4 est la forme la plus fréquente des paraplégies spastiques et compte pour plus de 40% des HSP. Elle est due à des mutations dans le gène *spastine* localisé au niveau du chromosome 2p. Ce gène code pour la protéine spastine membre de la famille de protéines de type AAA (ATPases associated with diverse cellular activities) contenant la protéine katanine, une protéine impliquée dans la dissociation des microtubules (Hazan et al., 1999). Le gène *spastine* est ubiquitairement exprimé à la fois dans les tissus neuronaux et non neuronaux fœtaux et adultes (Charvin et al., 2003; Hazan et al., 1999). La plupart des mutations observées sont localisées au niveau du domaine C terminal AAA. Les mutations observées sont des mutations perte de fonction (Lindsey et al., 2000).

Les différentes études d'immunolocalisation dans une variété de tissus et de types cellulaires suggèrent que la spastine est une protéine multifonctionnelle, de localisation cytoplasmique et nucléaire. La spastine peut présenter une distribution nucléaire et cytoplasmique, et bien qu'ubiquitaire, elle est clairement enrichie dans les tissus neuronaux à la fois chez l'homme et la souris (Charvin et al., 2003). Mais elle peut avoir une localisation cytoplasmique diffuse restreinte aux cellules neuronales ou au niveau des terminaisons synaptiques de différents types de cellules neuronales incluant les motoneurons en plus de sa localisation nucléaire (Wharton et al., 2003). Errico et al et McDermott et al trouvent que la spastine est localisée au niveau du cytoplasme et de structures ponctiformes et interagit transitoirement avec les microtubules via son domaine N-terminal et cette interaction est régulée par l'activité ATPase du domaine AAA. Ceci peut lui conférer un rôle direct dans la régulation de la dynamique des microtubules (Errico et al., 2002; McDermott et al., 2003). Les mutations faux-sens du domaine AAA sont responsables d'une liaison constitutive de la protéine aux microtubules et entraînent une redistribution du cytosquelette. Les mutations de la spastine entraînent une abolition du transport des organelles tels que les mitochondries et les peroxysomes tout le long du réseau de microtubules et peuvent conduire alors à la dégénérescence des parties distales des axones longs (McDermott et al., 2003). La spastine est enrichie au niveau des régions cellulaires contenant des microtubules dynamiques comme les centrosomes (Svenson et al., 2005) et les microtubules du fuseau mitotique durant la métaphase, au niveau du midbody et de la région centrale du fuseau mitotique durant la cytokinèse et au niveau des terminaisons distales des neurites dans les motoneurons. Elle interagit avec la protéine centrosomale NA14 qui agit comme un adaptateur pour l'interaction de la spastine avec les microtubules (Errico et al., 2004) et avec la protéine CHMP1B, une

protéine associée au complexe des sorting endosomes (Reid et al., 2005) grâce à son domaine MIT (microtubule interacting and trafficking domain). Les mutations du gène CHMP2B sont responsables d'une forme héréditaire de démence fronto-temporale (Skibinski et al., 2005).

Ces données suggèrent que la spastine joue un rôle dans la régulation de la fonction ou de la stabilité des microtubules et que ses mutations peuvent détruire le réseau de microtubules entraînant l'altération du trafic intracellulaire essentiel à la fonction axonale. La dissociation des microtubules assurée par la spastine peut être essentielle pour le transport efficace des polymères de tubuline vers les régions synaptiques distales. Si de tels défauts sont présents chez les patients PSH ceci permet de spéculer que la perte des microtubules des terminaisons présynaptiques des neurones corticospinaux peut affecter le transport antérograde du matériel synaptique et/ou rétrograde des facteurs trophiques. Ces défauts de transport causent ainsi la dégénérescence distale des axones.

A.2.2. SPG3A

Cette forme pure de PSH autosomique dominante (MIM, 182600) est caractérisée par un début très précoce. Le gène responsable est localisé sur le chromosome 14q11–q21 et code pour la protéine atlastine (Zhao et al., 2001b). Le gène *SPG3A* est exprimé d'une façon prédominante au niveau du système nerveux central.

L'atlastine montre une forte homologie pour des GTPases en particulier GBP1 (guanylate binding protein-1), membre de la famille des dynamines qui sont des grandes GTPases. L'atlastine est une GTPase oligomérique, composée de sous-unités membranaires avec les extrémités C et N terminales exposées du côté cytoplasmique. L'atlastine est localisée au niveau du Golgi et plus particulièrement au niveau du cis-golgi. Elle est exprimée dans plusieurs tissus et est enrichie au niveau des cellules pyramidales du cortex cérébral, une sous-population qui montre une axonopathie longue chez les patients avec *SPG3A*, et au niveau de l'hippocampe. L'atlastine peut aussi être localisée au niveau du Golgi, du réticulum endoplasmique, des neurites et des cônes de croissance et forme un homotétramère (Zhu et al., 2003; Zhu et al., 2006). Les mutations de *SPG3A* résultent en une perte de fonction de l'activité GTPase de l'atlastine et en des anomalies du développement axonal. (Zhu et al., 2006). Des mutations dans le domaine GTPase altèrent la morphologie du Golgi et du réticulum endoplasmique. Ceci montre que l'atlastine est impliquée dans le trafic vésiculaire à l'interface Golgi/ER et dans la maturation de l'appareil de Golgi (Namekawa et al., 2007)

D'une manière intéressante, la spastine et l'atlastine interagissent ensemble par leurs parties N-terminale et C-terminale respectivement. Ceci suggère que ces deux protéines participent à une même voie biochimique et que la pathologie moléculaire des deux formes de PSH sont liées.

A.2.3. SPG6

Des mutations du gène *NIPA1*, hautement exprimé dans les tissus neuronaux, sont responsables de cette forme pure autosomique dominante de HSP (SPG6, MIM, 600363) (Rainier et al., 2003). Ce gène code pour un transporteur de Mg^{2+} membranaire associé principalement aux endosomes précoces et à la surface cellulaire des cellules neuronales et épithéliales (Goytain et al., 2007). D'une manière intéressante, les mutations faux-sens de *NIPA1* empêchent le transfert de la protéine des endosomes jusqu'à la membrane plasmique. Des changements de concentration de Mg^{2+} entraînent une redistribution de la protéine NIPA1 entre le compartiment endosomal et la membrane plasmique: une augmentation de la concentration résulte en une diminution de NIPA1 au niveau de la membrane alors qu'une diminution de la concentration de Mg^{2+} entraîne une accumulation de NIPA1 au niveau des endosomes précoces et de son recrutement à la membrane. Wang et al. ont caractérisé l'homologue de NIPA1 chez la drosophile, appelée spichthyine (Wang et al., 2007). Ils ont montré que la spichthyine localisée au niveau des endosomes précoces et qu'elle régule le trafic endosomal des récepteurs aux protéines BMP (Bone Morphogenic Protein) en inhibant la signalisation BMP /TGF- β . La signalisation BMP régule la croissance synaptique, le maintien des microtubules et le transport axonal. La spichthyine permet alors la régulation de la croissance synaptique et la stabilisation de la jonction neuromusculaire.

A.2.4. SPG10

SPG10 (MIM, 604187) est une forme pure de paraplégie spastique due à des mutations du gène *KIF5A* (Kinesin heavy chain) qui code pour une protéine neuronale, KIF5A constituant la chaîne lourde de la kinésine impliquée dans le transport axonal antérograde dépendant des microtubules (Reid et al., 2002). Les études *in vitro* montrent que les mutations de *KIF5A* sont responsables d'une diminution du transport axonal des organelles et autres structures due à une réduction de l'affinité de la protéine pour les microtubules (Ebbing et al., 2008).

A.2.5. SPG15

Des mutations dans le gène ZFYVE26 sont responsables de cette forme de paraplégie (SPG15 MIM, 270700). Ce gène code pour la spastizine, une protéine avec un domaine doigt de zinc de type FYVE exprimée ubiquitairement avec un rôle probable dans le trafic intracellulaire puisqu'elle est localisée au niveau des endosomes et du réticulum endoplasmique (Hanein et al., 2008). Les domaines de type FYVE sont des domaines de liaison aux phosphoinositides membranaires.

A.2.6. SPG20 ou Syndrome de Troyer

Le syndrome de Troyer (SPG20, MIM, 275900) est une forme de paraplégie spastique compliquée associée à une dysarthrie, une amyotrophie distale, un retard de croissance modéré et une petite taille. L'âge de début est précoce et la transmission est autosomique récessive. Une délétion fondatrice tronquante a été trouvée dans le gène *SPG20* localisé au niveau du chromosome 13q12.3. *SPG20* est exprimé ubiquitairement (Patel et al., 2002). Ce gène code pour la spartine qui contient une séquence similaire à la partie N-terminale de la spastine et d'autres protéines impliquées dans la morphologie et le trafic membranaire des endosomes. La partie N-terminale de la spartine contient le domaine MIT suggérant un rôle dans le trafic membranaire médié par les microtubules (Ciccarelli et al., 2003). La spartine est localisée d'une façon prédominante au niveau du cytosol mais a aussi une localisation nucléaire (Robay et al., 2006) ou peut être associée aux membranes et interagit avec Eps15, une protéine probablement impliquée dans l'endocytose et le trafic vésiculaire (Bakowska et al., 2005). Toutes ces données suggèrent que la spartine possède des fonctions similaires. Lu et al ont montré aussi une localisation mitochondriale (Lu et al., 2006).

A.2.7. SPG11

Cette forme de paraplégie spastique (MIM, 604360) est caractérisée par un corps calleux fin et une altération de la fonction cognitive. Des mutations dans le gène *SPG11* ont été identifiées. Ce gène est localisé sur le chromosome 15q21.1 et code pour la spatacsine de fonction inconnue (Stevanin et al., 2008; Stevanin et al., 2007). Des mutations dans le gène *spatacsine* ont été reportées aussi dans une forme juvénile autosomique récessive de sclérose latérale amyotrophique avec un âge de début avant 25 ans et ne présentant pas de corps

calleux fin (Orlacchio et al.) ainsi que dans une forme de parkinsonisme juvénile (Anheim et al., 2009b).

A.2.8. SPG21 ou Syndrome de Mast

Cette forme autosomique récessive de HSP (SPG21, MIM, 248900) est compliquée et associée à une démence, un corps calleux fin, des troubles cognitifs et des signes cérébelleux. Le gène responsable est localisé sur le chromosome 15q22.31 et code pour la protéine ACP33/masparidine (Simpson et al., 2003). Cette protéine est localisée au niveau du cytoplasme et des membranes du réseau endosomes/trans Golgi suggérant un rôle dans le trafic membranaire (Hanna and Blackstone, 2009).

A.2.9. Paraplégie spastique héréditaire avec un début infantile

Le gène *ALS2* est impliqué dans des formes autosomiques récessives de maladies touchant les motoneurones et incluant la sclérose latérale amyotrophique (ALS), une forme juvénile de sclérose latérale primaire (JPLS) (Hadano et al., 2001; Yang et al., 2001) et la paraplégie spastique ascendante héréditaire avec un début infantile (IAHSP) (Eymard-Pierre et al., 2002; Hadano et al., 2007; Topp et al., 2004). Ces 3 formes sont caractérisées par une dégénérescence des motoneurones supérieurs avec ou sans implication des motoneurones inférieurs. L'ALS est plus sévère et affecte les motoneurones supérieurs du cortex moteur et les motoneurones inférieurs du tronc cérébral et de la moelle épinière alors que la dégénérescence dans la PLS touche seulement les motoneurones supérieurs et progresse lentement. IAHSP (MIM, 607225) peut être distinguée de ces deux dernières par l'âge de début à l'enfance avec une progression ascendante mais une longue survie durant la vie adulte et une atrophie progressive des faisceaux pyramidaux apparente à l'IRM après plus de 20 ans d'évolution. Cette forme de paraplégie spastique apparaît généralement vers l'âge de 2 ans et inclut les membres supérieurs dans les années qui suivent. Ce gène possède deux transcrits ubiquitairement exprimés. Dans le système nerveux murin, ce gène est exprimé au niveau du cerveau, cervelet, moelle épinière et en particulier au niveau de l'hippocampe (Hadano et al., 2001)

Le gène *ALS2* code pour l'alsine qui possède 3 domaines correspondant aux GEFs (Guanine nucleotide exchange factors) activant des membres de la famille des Ras GTPases. Ces domaines sont: un domaine N-terminal contenant 5 répétitions RCC1-like (Ran GEF), une région centrale contenant un domaine DH (diffuse B cell lymphoma homology) et un domaine d'homologie à la pleckstrine (PH) qui constituent ensemble un domaine RhoGEF et un domaine C-terminal VPS9-like (vacuolar sorting protein) qui est un Rab5-GEF. Sept répétitions de motifs MORN (membrane occupation and recognition nexus) sont présentes aussi au niveau de l'alsine et caractérisent les protéines impliquées dans la signalisation des phosphoinositides. Tous ces domaines liés à la signalisation cellulaire indiquent que l'alsine pourrait être impliquée dans la régulation de l'activité des petites GTPases impliquées dans le trafic vésiculaire (Eymard-Pierre et al., 2002; Hadano et al., 2001; Yang et al., 2001). En effet, l'alsine colocalise avec Rab5 et Rac1 et catalyse l'échange de guanine au niveau de ces deux GTPases. En plus de sa localisation cytoplasmique, l'alsine est observée au niveau d'autres structures ponctiformes dans les neurones et les fibroblastes ainsi que des structures actine-positives comme les lamellipodes et les plis membranaires. L'alsine peut être importante pour le maintien des motoneurones en régulant le réseau d'actine (Topp et al., 2004). Les souris *Als2*^{-/-} ne montrent aucune anomalie motrice, développementale ou reproductive mais présentent une perte progressive des cellules de Purkinje cérébelleuses. D'une manière intéressante, elles présentent une altération du trafic endosomal (Hadano et al., 2006).

III. Trafic Vésiculaire

Au cours de ma thèse, j'ai identifié un nouveau gène codant pour une nouvelle protéine que nous avons nommée «RunDataxine». La rundataxine contient un domaine RUN et un motif C-terminal riche en cystéines et qui ressemble au domaine C1 de liaison au diacylglycérol. Nous avons montré que cette protéine colocalise avec Rab7, une petite GTPase de la famille Rab. Je détaillerai dans cette partie les fonctions connues des domaines RUN et C1 et le rôle des protéines de la famille des Rab GTPases.

A. Domaines RUN

Le domaine RUN est présent dans la majorité des protéines associées aux petites GTPases de la famille Rab et Rap. Malgré la divergence entre les domaines RUN, ils sont tous organisés en 6 motifs (A-F) riches en acides aminés hydrophobes conservés et possèdent une structure secondaire dominée par des hélices α . Des acides aminés basiques (R, K et H) présents dans les blocs A et D sont très conservés et peuvent jouer un rôle dans l'interaction avec les petites GTPases de la famille Rab et Rap (Callebaut et al., 2001). La fonction des domaines RUN n'est pas bien connue et les différentes études montrent une interaction simple avec d'autres protéines. Le domaine RUN de RUFY1 n'a pas d'influence sur l'interaction de RUFY1 avec Rab4 mais est responsable de l'association de RUFY1 avec le cytosquelette (Mari et al., 2001). Contrairement au cas de RUFY1, il a été montré que le domaine RUN de RUFY3 (ou RPIP_x; Rap2-interacting protein x), homologue de RUFY1, est responsable de son interaction avec Rap2 (Kukimoto-Niino et al., 2006). L'iporine interagit avec Rab1 via son domaine RUN (Bayer et al., 2005). Nesca est une protéine régulatrice de la voie de signalisation du récepteur tyrosine kinase A (trkA) qui est un récepteur au NGF (neurite growth factor). Cette protéine contient un domaine RUN essentiel pour sa translocation du cytoplasme sous-membranaire au noyau. En réponse aux neurotrophines, Nesca est activée par phosphorylation et va activer des gènes cibles de réponse au NGF. Nesca a un rôle dans la différenciation neuronale des cellules PC12 en facilitant la croissance des neurites. Elle peut avoir aussi un rôle dans l'activation prolongée des MAPKinases par le récepteur tyrosine kinase A (MacDonald et al., 2004).

B. Domaines C1 et Diacylglycérol

Les protéines kinases C (PKCs) représentent une famille de kinases régulant la prolifération et la différenciation et sont responsables de transformation maligne en cas de dérèglement. Les PKCs possèdent une région régulatrice N-terminale contenant 2 domaines C1 et C2 et une région catalytique C-terminale (activité kinase) contenant 2 domaines C3 et C4. Le domaine C1 fait environ 50 acides aminés de long et est riche en cystéines. Le domaine C1 constitue un motif de liaison au diacylglycérol et joue un rôle crucial dans la translocation des PKCs et d'autres molécules du cytosol vers la membrane en réponse au DAG et aux esters de phorbol qui sont des analogues du DAG. Le DAG est un second messager qui résulte de l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5 biphosphate PI(4,5)P₂ au niveau de la membrane plasmique par la phospholipase C (Gomez-Fernandez and Corbalan-Garcia, 2007). Le DAG et les esters de phorbol se lient au même site au niveau des PKCs. Le domaine régulateur C1 des PKCs contient 2 régions riches en cystéines liant chacune 2 atomes de zinc. Le domaine C1 est organisé sous forme de 2 feuillets β et d'une petite hélice α . Trois cystéines et une histidine forment les sites de coordination de 2 atomes de Zn²⁺ à la fin du feuillet β . Les feuillets β forment une poche dans laquelle se lient le DAG ou les esters de phorbol. Les domaines C1 dans les PKCs ont la signature: HX₁₂CX₂CX₁₃₋₁₄CX₂CX₄HX₂CX₇C, H est une histidine, C une cystéine, X un acide aminé quelconque (Colon-Gonzalez and Kazanietz, 2006).

En se basant sur leurs propriétés biochimiques, les PKCs sont classées en 3 groupes :

- Les PKCs classiques ou conventionnelles comprenant PKC α , PKC β I, PKC β II, PKC γ
- Les PKCs nouvelles: ce groupe inclut les PKC δ , PKC ϵ , PKC η et PKC θ
- Les PKCs atypiques qui comprennent PKC ζ et PKC ι/λ

Les PKCs classiques et nouvelles sont sensibles aux DAG et phorbols esters contrairement aux PKCs atypiques. La PKC γ , spécifique des neurones, est mutée dans SCA14. Les PKCs classiques sont activées par le calcium contrairement aux PKCs atypiques. Le domaine C1 est responsable de la translocation au réseau trans-golgien. Dans les protéines kinases atypiques, le domaine C1 est incapable de lier le DAG ou phorbol ester et peut être impliqué dans les interactions protéine-protéine. D'autres protéines non-kinases contiennent un domaine C1 comme les membres de la famille de Vav qui sont des facteurs d'échange de guanine (GEF)

pour les Rho GTPases et régulent différentes fonctions cellulaires incluant l'activation des lymphocytes T (Tybulewicz, 2005).

C. Trafic vésiculaire et Rab GTPases

Les Rab GTPases sont impliquées dans le trafic vésiculaire entre les différents compartiments membranaires de la cellule (membrane plasmique, réticulum, Golgi, endosomes...), lui-même dépendant de la composition en phosphoinositides des membranes mises en jeu. Je décrirai d'abord les différentes étapes de l'endocytose et le rôle joué par les phosphoinositides avant d'aborder la fonction des Rab GTPases.

1. L'endocytose

L'endocytose constitue une étape de contrôle ou d'arrêt des voies de signalisation par internalisation puis dégradation des récepteurs membranaires des facteurs de croissance et des hormones. La voie de l'endocytose peut être dépendante ou indépendante de la clathrine. Les molécules de clathrine forment un manteau autour des vésicules d'endocytose transportant majoritairement des récepteurs. Les complexes récepteurs-ligands internalisés transitent par une série de compartiments endosomaux. Les complexes récepteurs-ligands seront triés dans les endosomes précoces par le découplage du récepteur de son ligand. Le pH de ces endosomes est légèrement acide (pH~6.2) grâce à l'action des pompes à protons et de canaux ioniques, ce qui dissocie la plupart des ligands de leurs récepteurs internalisés (Gruenberg, 2001). Au niveau des endosomes de tri (Sorting endosome), certains récepteurs sont recyclés à la membrane plasmique, d'autres sont dirigés vers l'appareil de Golgi par une voie dite rétrograde tandis que d'autres récepteurs sont dirigés vers les endosomes tardifs puis les lysosomes pour être dégradés. Le recyclage à la membrane plasmique a lieu soit directement à partir des endosomes précoces soit via les endosomes de recyclage qui se présentent sous forme de structures tubulaires situées dans le Golgi périnucléaire. Les récepteurs internalisés par la voie de l'endocytose dépendante de la clathrine sont découplés de leurs ligands dans les endosomes de tri puis recyclés à la membrane plasmique pour être réutilisés.

Les protéines membranaires destinées à être dégradées par les lysosomes se concentrent au niveau des endosomes tardifs ou corps multivésiculaires. Les endosomes tardifs deviennent de plus en plus acides et se transforment en corps multivésiculaires qui fusionnent aux lysosomes afin de dégrader leur contenu. Les lysosomes sont des organelles dynamiques qui reçoivent et dégradent des macromolécules des voies de sécrétion et d'endocytose. Ils contiennent des ATPases pompes à protons qui maintiennent l'acidification de la lumière des lysosomes à un pH de 4,6-5,0. Ils peuvent être distingués des endosomes par l'absence du récepteur au mannose-6 phosphate (M6PR).

2. Les phosphoinositides

Les phosphoinositides sont des seconds messagers lipidiques qui permettent la localisation des protéines au niveau des domaines membranaires en se liant à des motifs protéiques spécifiques. Le PtdIns(4,5)P₂ est présent à la membrane plasmique où il contrôle la formation des vésicules d'endocytose. Les PtdIns(3)P et PtdIns(3,5)P₂ sont aussi localisés au niveau des endosomes et semblent avoir un rôle important dans le trafic membranaire. Le PtdIns(4,5)P₂ est essentiel à la membrane plasmique pour le recrutement de la machinerie de vésiculation dépendante de la clathrine et le PtdIns(3)P est nécessaire à l'invagination des vésicules à l'intérieur des corps multivésiculaires.

3. Les étapes du transport vésiculaire

Les protéines Rab font partie d'une famille de 60 membres et appartiennent à la superfamille des petites GTPases Ras. Elles participent à la régulation du transport vésiculaire et du trafic de protéines réceptrices membranaires entre les différentes organelles des voies endocytaires et sécrétoires.

Les Rab GTPases sont impliquées dans le transport vésiculaire (Stenmark, 2009; Stenmark and Olkkonen, 2001; Zerial and McBride, 2001) qui comprend 5 étapes (Figure 6):

1- le bourgeonnement vésiculaire: les complexes ligands-récepteurs destinés à être internalisés sont recrutés sélectivement dans des puits recouverts de clathrine, recrutement suivi d'une invagination du manteau, d'une constriction et d'une scission de la vésicule recouverte de clathrine contenant les cargos (ligands, lipides, récepteurs...). Les Rab GTPases

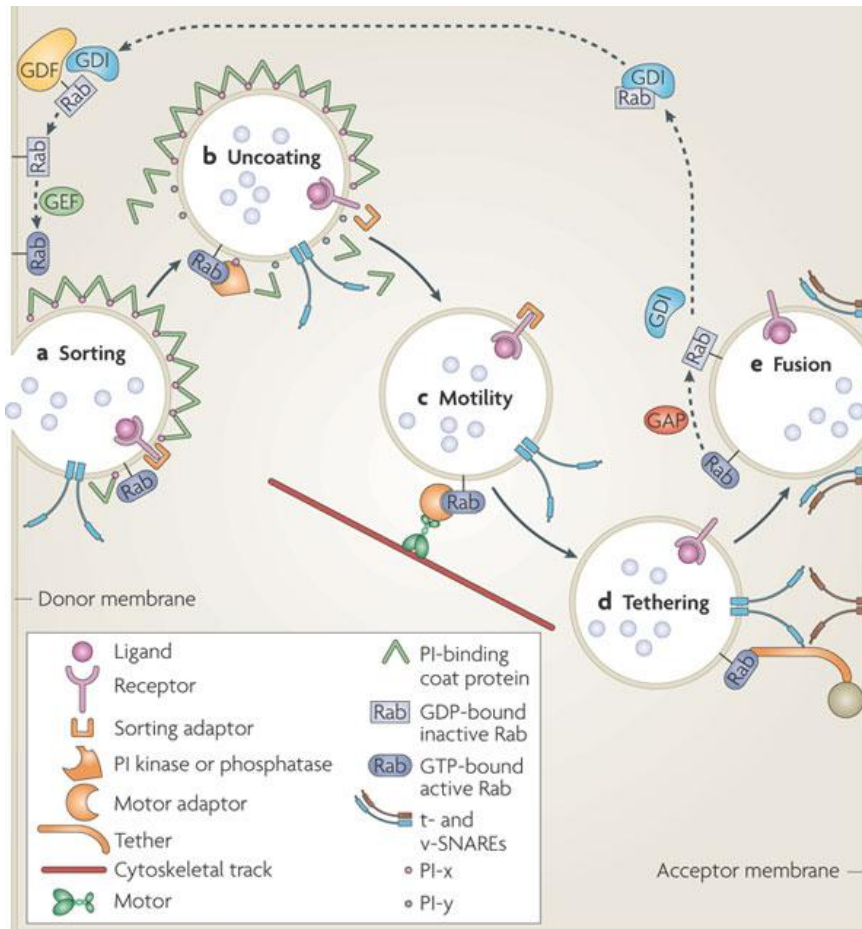


Figure 6: Différentes étapes du transport vésiculaire contrôlées par les RabGTPases et leur effecteurs (en orange)

- Une Rab GTPase activée par son GEF et donc liée au GTP est recrutée à la membrane et se lie à une molécule adaptatrice assurant la formation et la constriction des vésicules contenant les récepteurs internalisés. Ces vésicules peuvent être revêtues de manteau de clathrine
- Fission vésiculaire et dissociation des manteaux de clathrine. Des phosphoinositides kinases ou phosphatases sont recrutées par les RabGTPases et sont responsables de l'hydrolyse des phosphoinositides. Cette hydrolyse entraîne le dévêtement du manteau des vésicules qui est provoqué par le changement de composition en phosphoinositides.
- Transport des vésicules le long des éléments du cytosquelette médié par les Rab GTPases. Les RabGTPases peuvent assurer seules ce transport ou recruter des protéines motrices .
- Adressage spécifique vers le compartiment accepteur. L'arrimage de la vésicule à la membrane du compartiment accepteur est assuré par les RabGTPases qui s'associent à des protéines d'arrimage ou « tethering proteins » et les complexes SNARE.
- Fusion des membranes et relargage du contenu de la vésicule dans la lumière du compartiment accepteur. Les protéines d'arrimage peuvent interagir avec les SNARE pour activer la formation du complexe SNARE. Le complexe SNARE est formé entre le t-SNARE de la vésicule et le v-SNARE de la membrane acceptrice. Après la fusion des membranes et l'exocytose, les Rab GTPases sont converties en leur forme inactive liée au GDP. L'hydrolyse du GTP est favorisée par une GAP (protéine activatrice des GTPases). La Rab GTPase associée à son GDI (inhibiteur de dissociation du nucléotide Guanine) est ciblée à la membrane par un GDF (facteur de déplacement du GDI). Le GEF (facteur d'échange du nucléotide Guanine) catalyse la conversion de la Rab GTP en Rab GDP

se transforment en leur forme active afin d'assurer la formation des vésicules contenant des récepteurs.

2- la fission de la vésicule et la dissociation du manteau: les vésicules d'endocytose se déchargent ensuite de leur manteau de clathrine et fusionnent avec les endosomes précoces.

3- le transport vésiculaire vers le compartiment accepteur: les Rab GTPases assurent le transport des vésicules le long des microtubules et du cytosquelette d'actine. Les Rab GTPases régulent aussi les filaments moteurs: la kinésine qui permet le transport membranaire vers la périphérie de la cellule et la dynéine cytoplasmique qui permet le trafic vésiculaire vers la région péricentriolaire. Les kinésines peuvent être des effecteurs des Rab GTPases; par exemple rabkinésine 6 (ou KIF20A, régulateur de la cytokinèse) est un effecteur de Rab6 localisée au niveau du Golgi; KIF16B, impliqué dans le recyclage endocytique est recruté à la membrane des endosomes par liaison avec les PtdIns(3)P dont la formation est contrôlée par Rab5. La dynéine est un effecteur indirect de Rab7.

4- l'arrimage (tethering): après dissociation de la vésicule de son manteau, la vésicule est attelée à la membrane du compartiment receveur grâce à la combinaison d'une Rab liée au GTP et d'un facteur d'arrimage. Les Rab GTPases coopèrent avec les autres composants incluant les complexes SNAREs qui sont impliqués dans l'arrimage et la fusion vésiculaire avec la membrane acceptrice. L'arrimage dépend plus des effecteurs des Rab que des complexes SNARE.

5- la fusion vésiculaire: Les SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor) jouent un rôle important dans la fusion des membranes cellulaires (Bonifacino and Glick, 2004). Les différentes protéines de la famille des SNARE peuvent s'associer, en particulier les protéines complémentaires présentes sur les deux membranes, celles de la vésicule d'endocytose, les v-SNARE, et celles de l'endosome précoce cible, les t-SNARE. Chaque v-SNARE ne peut se lier qu'avec une t-SNARE, assurant ainsi en partie la spécificité de l'adressage. Ces protéines sont constituées d'une partie transmembranaire et d'une ou de deux longues hélices dans le cytoplasme. Les protéines v-SNARE et t-SNARE s'associent en entremêlant leurs hélices. Après l'accrochage de l'intermédiaire de transport sur la membrane acceptrice, les hélices s'enroulent en un complexe serré qui conduit au rapprochement des membranes, puis à leur fusion. La membrane acceptrice peut être celle du Golgi en cas des des vésicules en provenance du réticulum endoplasmique. Les Rabs peuvent être impliquées dans cette fusion; c'est le cas par exemple de Rab1 et son effecteur P115.

Après la fusion des vésicules à la membrane acceptrice, les Rab GTPases retournent à leur forme inactive liée au GDP une fois l'exocytose terminée.

4. Cycle des Rab GTPases

Deux classes de protéines régulatrices contrôlent le passage d'un état actif à inactif des petites GTPases et vice-versa: les GEFs (guanine nucleotide exchange factors) et les GAPs (GTPases activating proteins). Les GEFs favorisent l'échange d'une molécule de GDP par une molécule de GTP ce qui entraîne un changement conformationnel des GTPases permettant leur interaction avec toute une série de molécules effectrices qui déclencheront des cascades de signalisation aboutissant à de nombreuses réponses cellulaires. Les GAPs accélèrent l'hydrolyse du GTP lié aux GTPases ramenant ainsi la protéine à l'état inactif. Une troisième catégorie de régulateurs contrôlant l'activité des GTPases comprend les GDIs (guanine nucleotide dissociation inhibitors) qui empêchent la dissociation du GDP des petites GTPases, stabilisant ainsi la forme inactive. Les GDF (membrane-bound GDI displacement factors) favorisent la libération du GDI facilitant ainsi l'insertion du groupement géranylgeranyl de la Rab GTPase active à la membrane. Une fois dissociés des GDI, les Rabs sont capables d'assurer leurs diverses fonctions dans le trafic membranaire en se liant à des effecteurs spécifiques. Les effecteurs des Rab peuvent être des protéines avec des domaines coiled-coil, des enzymes, ou des protéines associées au cytosquelette. Les PI3kinases sont des effecteurs de Rab5. Une fois que les vésicules ont atteint leur cible, les Rab GTPases sont inactivées par des GAPs spécifiques et peuvent être recyclés vers le cytoplasme grâce à des GDI vers la surface cellulaire. (Figure 7).

5. Localisation des Rab GTPases

Les Rab GTPases sont localisées au niveau de compartiments intracellulaires spécifiques en relation avec leur fonction dans les différents processus vésiculaires. La localisation des Rab dépend de leur prénylation, une modification post-traductionnelle des protéines Rab nouvellement synthétisées et effectuée par une géranylgeranyltransférase qui est aussi une protéine de transport des Rab (REP: Rab escort protein). REP capte les protéines

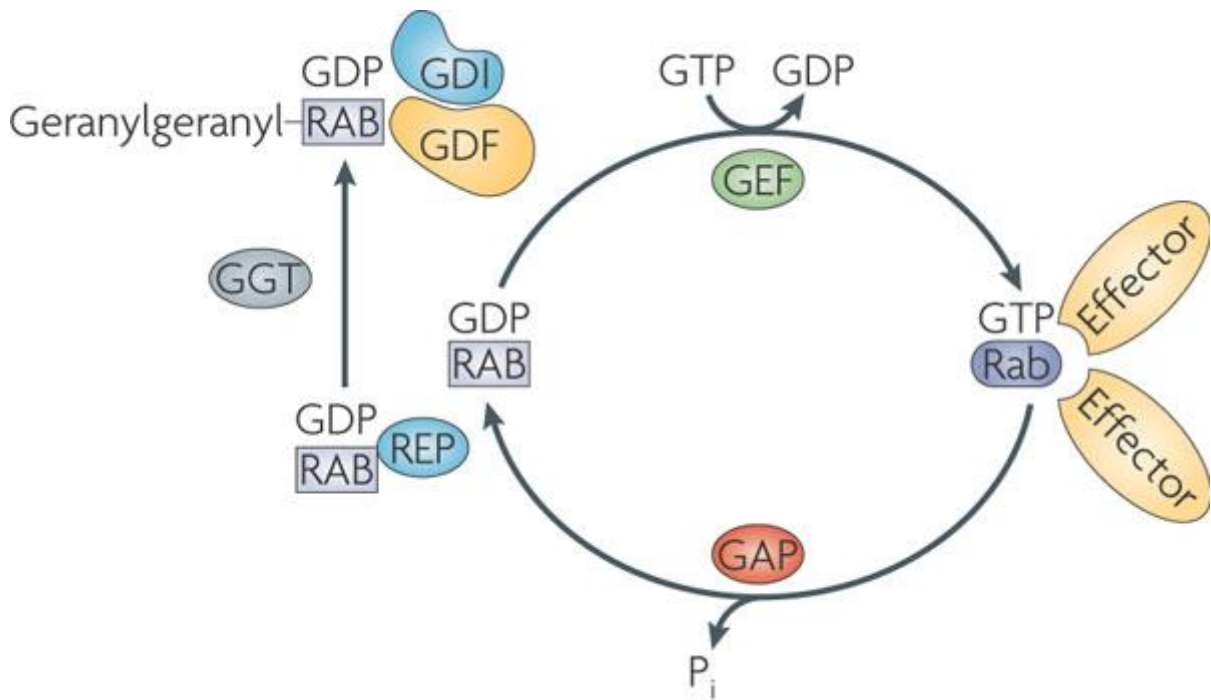


Figure 7 : Cycle de conversion des Rab GTPases

Une Rab GTPase, nouvellement synthétisée et sous sa forme inactive liée au GDP, est reconnue par une REP (protéine escort des Rab). La REP présente la Rab GDP à la géranylgeranyl transférase (GGT) qui ajoute un groupement géranylgeranyl à l'extrémité C-terminale de la Rab. La Rab-GDP géranylgeranylée est reconnue par un GDI (inhibiteur de dissociation du nucléotide Guanine) qui régule le cycle des Rab au niveau de la membrane. L'interaction avec un GDF (facteur de déplacement du GDI) permet le recrutement du complexe Rab-GDI à la membrane cible. La conversion de la forme inactive liée au GDP en forme active liée au GTP est catalysée par un GEF (facteur d'échange du nucléotide guanine) qui permet l'échange du GDP en GTP. La Rab GTPase active est reconnue par ses effecteurs et est convertie à sa forme inactive par hydrolyse du GTP qui est stimulée par une GAP (protéine activatrice de GTPase). L'hydrolyse du GTP génère du GDP et du phosphate inorganique.

(D'après Mario Manto and Daniele Marmolino Current Opinion in Neurology 2009, 22:419-429)

Rab nouvellement synthétisées et les présente à la géranylgeranyltransférase avant de les délivrer à la membrane appropriée. Une fois que la Rab GTPase est associée à la membrane, un GEF catalyse l'échange du GDP en GTP et donc la dissociation entre une Rab et son REP.

Dans les cellules, les Rab sont localisées au niveau de la face cytosolique des différentes membranes intracellulaires (Figure 8). Rab1 est localisée au niveau du réticulum endoplasmique et le compartiment pré-golgien et assure le trafic entre le réticulum et le Golgi. Rab2 est localisée au niveau du compartiment intermédiaire pré-golgien et joue le même rôle que Rab1. Rab5, Rab4 et Rab11 sont localisées au niveau des endosomes précoces. Les expériences d'immunomarquage montrent que Rab4, Rab5 et Rab11 sont situés au niveau de la membrane endosomale et forment 3 compartiments: un qui contient exclusivement Rab5, un 2^{ème} qui contient Rab4 et Rab5 et un 3^{ème} qui contient Rab4 et Rab11. Le compartiment contenant Rab5 et Rab4 correspond au compartiment endosomes précoces/endosomes de tri et le compartiment contenant Rab4 et Rab11 correspond aux endosomes de recyclage périnucléaires. La transferrine internalisée se trouve au début au niveau des domaines Rab5, puis dans des structures contenant Rab4 et Rab11. Rab4 et Rab11 peuvent réguler la machinerie de recyclage et de tri de la transferrine (Zerial and McBride, 2001). Rab11 régule le recyclage au niveau des endosomes de recyclage alors que Rab4 régule le recyclage directement à partir des endosomes précoces. Rab6 est localisée au niveau de l'appareil de Golgi et est impliquée dans le transport intra-golgien. Rab7 et Rab9 sont localisées au niveau des endosomes tardifs. Rab9 assure le recyclage des récepteurs du mannose-6-phosphate des endosomes tardifs au réseau trans-golgien. Rab9 a un rôle dans le bourgeonnement à partir des endosomes des vésicules qui seront dirigées vers le trans golgi (Riederer et al., 1994). Rab7 est associée aux endosomes tardifs (Chavrier et al., 1990), principalement aux lysosomes, qui s'aggrègent et fusionnent aux lysosomes dans la région périnucléaire. Rab7 est essentielle pour l'aggrégation et la fusion des endosomes tardifs avec les lysosomes et donc pour le maintien de la fonction lysosomale. En absence de Rab7 fonctionnelle, les lysosomes seront dispersés au niveau du cytoplasme alors qu'une surexpression de la forme active Rab7 entraîne un élargissement des structures lysosomales. L'expression de dominants négatifs de Rab7 perturbent l'acidification des lysosomes, normalement impliqués dans la dégradation intracellulaire grâce à leurs hydrolases acides (Bucci et al., 2000; Vitelli et al., 1997).

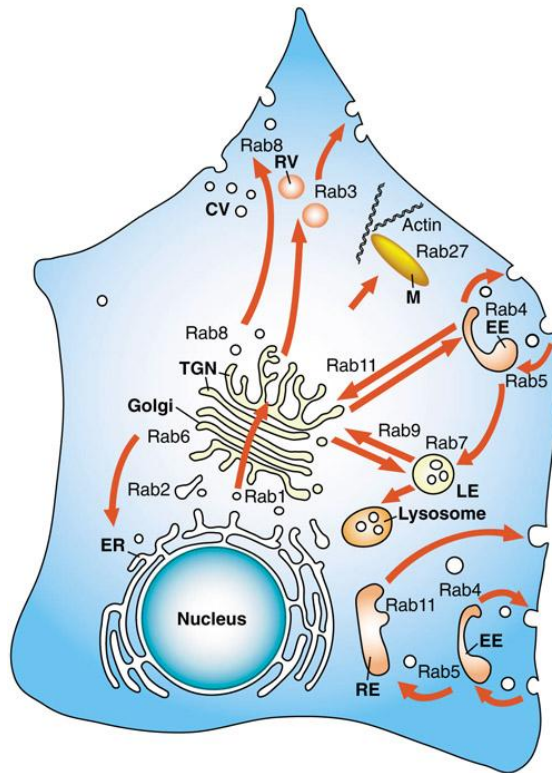


Figure 8: Localisation des différentes Rab GTPases au niveau de la voie de l'endocytose

Rab1 et Rab2 sont localisées à l'interface réticulum endoplasmique (RE) et Golgi. Rab1 assure le trafic du RE vers le Golgi alors que Rab2 assure le transport rétrograde du Golgi au RE. Rab3 est située au niveau des vésicules synaptiques et régule la libération du neurotransmetteur. Rab4 et Rab5 sont localisées au niveau des endosomes précoces (EE) contenant le matériel internalisé. Rab4 est impliquée dans le recyclage direct à partir des endosomes précoces vers la membrane. Rab5 assure la formation des vésicules et leur fusion aux endosomes précoces. Rab11 est localisée au niveau des endosomes de tri et assure le recyclage. Rab6 est localisée au niveau de l'appareil de Golgi et est impliquée dans le transport intra-golgien. Rab8 est localisée au niveau du réseau trans golgien et de la membrane plasmique pour assurer le transport entre ces deux compartiments. Rab7 et Rab9 sont localisées au niveau des endosomes tardifs.

EE: endosomes précoces; LE: endosomes tardifs; ER: réticulum endoplasmique; TGN: réseau trans-golgien

(D'après Stenmark H, Olkkonen VM. *Genome Biology* 2001, 2(5):reviews3007.1–3007.7)

6. Rôle des Rab GTPases dans le système nerveux

Actuellement, le rôle de certaines RabGTPases dans les neurones et les cellules gliales est bien établi en particulier celui de Rab7. (Ng and Tang, 2008). La fonction connue des Rab GTPases dans les neurones et les cellules gliales ainsi que leur localisation est résumée dans le tableau 5.

7. Rab GTPases et maladies

Des expressions aberrantes de Rab GTPases peuvent favoriser la tumorigenèse ou être liées à des maladies héréditaires. D'une manière intéressante, des mutations de Rab7 ont été reportées dans la neuropathie Charcot-Marie-Tooth de type II ulcéro-mutilante (Houlden et al., 2004; Meggouh et al., 2006; Verhoeven et al., 2003). Cette forme de neuropathie est caractérisée par une perte sensitive, une faiblesse musculaire des jambes marquée et une fréquence élevée d'ulcères au niveau des pieds, des infections et des amputations des orteils. Des mutations de Rab27a sont liées au syndrome de Griscelli de type 2 associé à des défauts immunitaires et qui cause un albinisme partiel. Rab27a régule le mouvement des mélanosomes de la périphérie cellulaire des mélanocytes et l'absence de Rab27a entraîne un défaut de pigmentation dû à une accumulation aberrante des mélanosomes dans les mélanocytes suite à un défaut dans leur transport (Hume et al., 2001; Menasche et al., 2000). Le syndrome de Griscelli de type 1 associé avec des symptômes neurologiques est dû à des mutations dans le gène codant pour la myosineVa qui est un effecteur de Rab27a. Des mutations de REP1 sont liées à la choroïdémie, liée à l'X, qui implique une dégénérescence de l'épithélium pigmentaire de la rétine et les couches cellulaires de la choroïde et des photorécepteurs rétiniens entraînant une cécité. La 2^{ème} isoforme REP2 est suffisante pour la géranylgeranylation de toutes les Rab GTPases dans tous les tissus à l'exception de l'épithélium rétinien alors que REP1 est essentielle pour la géranylgeranylation de Rab27a dans ce tissu (Seabra et al., 2002).

Tableau 5: Résumé de la fonction connue des Rab GTPases dans les neurones et les cellules gliales ainsi que leur localisation (d'après Ee Ling Ng, Bor Luen Tang ; Brain Research Reviews 58 (2008) 236–246)

Rab	association à la membrane cellulaire/subcellulaire	Fonction impliquée dans les neurones/ cellules gliales
Rab2	interface réticulum endoplasmique–Golgi	adhésion des cellules neuronales et croissance des neurites in vitro
Rab3 (A–D)	vésicules synaptiques, membrane plasmique présynaptique	exocytose des vésicules synaptiques; exocytose dans les astrocytes et les oligodendrocytes
Rab5	endosomes précoces	régulation de la taille des vésicules synaptiques ; endocytose des récepteurs AMPA; tri endosomal et transport axonal rétrograde
Rab6	Golgi/ trans-Golgi	transport de la rhodopsine dans les photorécepteurs rétiniens
Rab7	endosomes tardifs	Tri des endosomes et transport axonal rétrograde
Rab8	Golgi, vésicules et plis de la membrane plasmique	transport dendritique polarisé; transport de la rhodopsine dans les photorécepteurs rétiniens; trafic des récepteurs AMPA
Rab11	endosomes, synapses	régulation de la sécrétion; transport de la rhodopsine dans les photorécepteurs rétiniens; trafic membranaire polarisé dans les neurones
Rab13	vésicules cytoplasmiques, jonctions serrées dans les cellules épithéliales polarisées	régulation possible de la croissance des neurites
Rab22B/Rab31	Golgi/trans-Golgi	transport des oligodendrocytes
Rab23	membrane plasmique, endosome	développement du CNS, mutations responsables du syndrome de Carpenter chez l'homme
Rab24	Limite ER–Golgi, autophagosomes noyau	Augmentation de l'expression du transcrit dans les motoneurones endommagés
Rab40C	compartiment périnucléaire	rôle possible dans le transport vésiculaire dans les oligodendrocytes

IV. Stratégie utilisée

A. Clonage Positionnel et cartographie par homozygotie

Dans le cas de maladies récessives dans des familles consanguines, nous utilisons l'approche de clonage positionnel et plus particulièrement la cartographie par homozygotie pour la recherche du gène en cause. En l'absence de données fonctionnelles permettant de cibler un mécanisme particulier, la recherche du gène morbide d'une maladie peut se réaliser de manière indirecte, par clonage positionnel. Le clonage positionnel permet d'isoler un gène à partir de sa localisation subchromosomique sans connaître la protéine pour laquelle il code. Le clonage positionnel s'oppose à l'approche moléculaire préalable qui permet d'identifier le gène à partir du défaut biochimique ou à l'approche de gène candidat qui se base sur l'observation d'un phénotype similaire entre deux espèces ou sur une famille gènes connus à laquelle le gène appartient (Collins, 1992).

Les études de liaison génétique (cartographie par homozygotie) permettent de lier le gène morbide à une région génomique donnée en montrant la ségrégation de la maladie avec certains allèles des marqueurs de cette région. La cartographie par homozygotie est basée sur l'hypothèse qu'un enfant, issu d'un mariage consanguin et atteint d'une maladie génétique récessive, est homozygote par descendance et reçoit les deux allèles portant la mutation d'un ancêtre commun. Cette mutation pathogène est comprise dans une région d'une dizaine de cM limitée par les recombinaisons produites au cours de la transmission (Figure 9). L'enfant atteint reçoit non seulement la mutation mais aussi des marqueurs polymorphes proches du locus morbide. Les mêmes allèles de ces marqueurs seront partagés par les individus atteints et non par les individus sains. Ceci s'explique par une localisation du gène muté à proximité de ces marqueurs, avec une transmission d'une large région autour de la mutation sur quelques méioses.

Le génotypage de ces marqueurs polymorphes sert à localiser un gène par analyse de liaison génétique. L'analyse de ces marqueurs sur l'ensemble du génome doit être réalisée dans de grandes familles avec plusieurs enfants atteints, afin d'identifier la ou les régions d'homozygotie communes à tous les enfants atteints. Ces marqueurs doivent être suffisamment nombreux, informatifs et espacés pour permettre une bonne couverture du

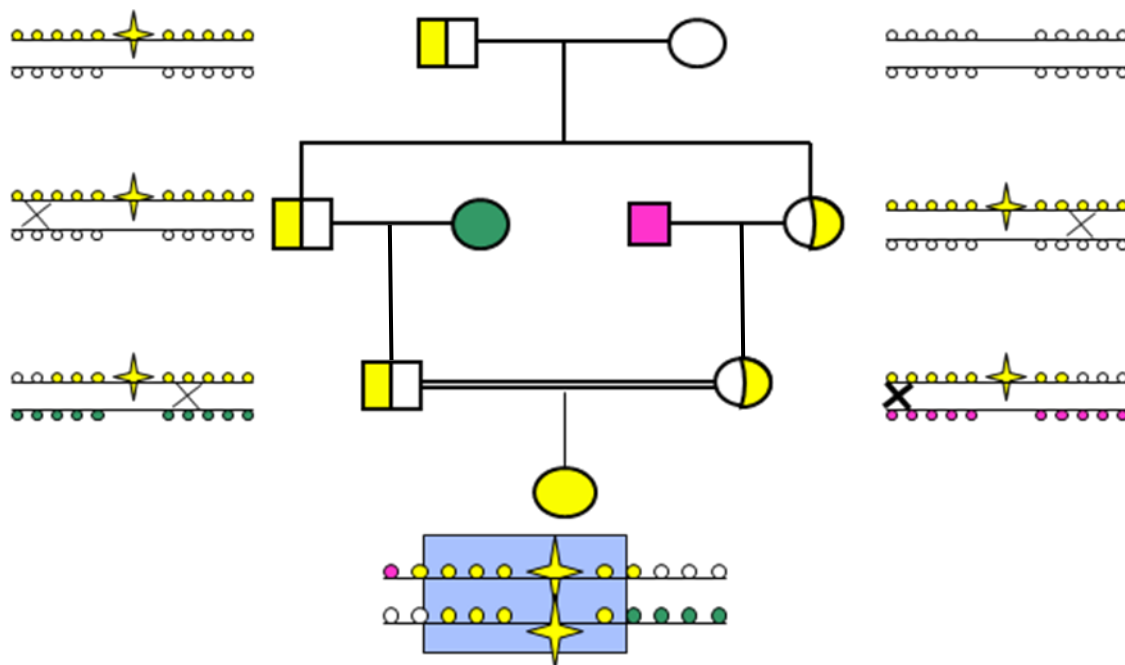


Figure 9: Principe de la cartographie par homozygotie

Un patient atteint d'une maladie génétique rare et issu de parents consanguins a probablement hérité sur ses deux chromosomes une mutation (étoile jaune) présente à l'état hétérozygote chez un ancêtre commun de ses parents (arrière grand-père sur ce schéma). Les marqueurs polymorphiques localisés dans la région chromosomique autour du gène sont représentés par des ronds de couleurs différentes en fonction des allèles. Du fait des différents événements de recombinaisons méiotiques (représentées par des croix), les allèles des marqueurs éloignés du gène changent et peuvent donc devenir hétérozygotes chez le patient alors que les marqueurs proches du gène muté sont transmis en bloc à partir de l'arrière grand-père et sont donc à l'état homozygote chez le patient. Ils définissent une région d'homozygotie par descendance (en bleu).

génomique. Une fois la région candidate minimale déterminée, les gènes localisés dans la région sont séquencés à la recherche des mutations.

A.1. Mesure statistique de la liaison: le LOD score

Les distances génétiques sont le reflet de la fréquence de recombinaison. Plus deux loci (de gènes ou de marqueurs) sont proches, moins ils ont de chance d'être séparés par une recombinaison et plus la distance génétique entre eux sera petite. Lorsque deux marqueurs sont suffisamment proches pour n'être séparés qu'une fois sur 100 gamètes, la distance génétique qui les sépare est définie comme 1 centimorgan (1cM). Il s'agit donc d'une mesure équivalente à 1% de recombinaison. Si deux marqueurs ne sont pas liés (par exemple s'ils sont situés sur deux chromosomes différents), ils seront séparés (en moyenne) une fois sur deux. En conclusion, plus la distance (en cM) entre deux marqueurs est grande, plus la fréquence de recombinaison est élevée avec une valeur maximale de 50% (0,5). Dans le cas de liaison génétique, on peut estimer l'importance de la liaison par le taux de recombinaison θ , défini comme le rapport: nombre de gamètes recombinants/nombre de gamètes parentaux.

Le LOD (Logarithm of the Odds) score est la mesure de la probabilité de liaison. C'est le logarithme du rapport de la probabilité d'observer une co-ségrégation si les loci sont liés (pour une fraction de recombinaison θ) sur la probabilité de l'observer en absence de liaison (c'est-à-dire pour une fraction de recombinaison θ égale à 0,5). Le seuil conventionnel de signification $p=0,05$ nécessite une probabilité de 1000 chances pour 1 en faveur de la liaison pour pouvoir affirmer celle-ci. Ainsi, un LOD score «Z» de 3 est la valeur minimale généralement admise en faveur de la liaison, avec un risque d'erreur de 5 %. Si $Z < -2$ (100 chances pour 1 contre la liaison génétique) on rejette la liaison, si $-2 < Z < 3$ on n'a pas assez d'informations pour conclure. Une liaison peut être détectée, en principe par l'étude de seulement quatre enfants d'un couple de cousins germains générant un LOD score de 3.

A.2. Analyse de marqueurs polymorphes du génome

Afin d'identifier les régions d'homozygotie dans les familles étudiées, nous avons procédé à une étude «pangénomique» par génotypage de marqueurs SNP chez les atteints nés de parents consanguins. Notre stratégie consiste en l'analyse de tout le génome des atteints d'une même famille afin d'identifier la ou les régions d'homozygotie communes aux atteints. Dans

un deuxième temps, les frères et soeurs sains et les parents sont analysés à l'aide de marqueurs microsatellites au niveau des régions candidates pour tester la ségrégation des haplotypes par rapport aux patients.

A.2.1. Les SNPs (Single Nucleotide Polymorphism)

Les SNP sont des modifications d'une paire de base le plus souvent caractérisées par deux allèles au sein de la population. Comparés aux autres marqueurs, les SNP présentent l'avantage d'une répartition très dense dans tout le génome. Le taux d'hétérozygotie de chaque SNP est faible. Cependant les technologies d'hybridation sur puce permettent de génotyper de très nombreux SNP chez un même individu et donc d'augmenter l'informativité et de réduire les régions chromosomiques non explorées.

Le protocole expérimental suit les mêmes étapes pour les 4 catégories de puces (10K, 50K, 250K, 900K). Les puces de génotypage sont basées sur un principe d'hybridation allèle spécifique. Pour chaque SNP biallélique, des sondes oligonucléotidiques de 25 pb spécifiques de chacun des 2 allèles, sont fixées sur la puce. L'ADN génomique est digéré est ensuite ligué à un adaptateur qui reconnaît les bouts cohésifs de 4 paires de bases générés par l'enzyme spécifique (Figure 10). Tous les fragments générés par la digestion enzymatique, peu importe leur taille, sont soumis à une ligation. Une amorce générique qui reconnaît les séquences adaptatrices est utilisée pour amplifier l'ADN précédemment digéré et ligué. Les conditions PCR sont optimisées de manière à amplifier des fragments, dont la taille varie entre 200 et 1100 pb, et dans lesquels ont été choisis les SNP présents sur la puce. Les produits d'amplification correspondant à chaque enzyme sont mélangés et purifiés. Après une fragmentation et un marquage à l'aide d'un anticorps anti-streptavidine biotinylée, l'ADN amplifié est hybridé sur la puce. Les étapes de lavage sur la station fluide et d'hybridation de la puce étaient assurées par la plateforme des puces de notre institut. La détermination du génotype est réalisée à partir de l'intensité d'hybridation au niveau de chaque oligonucléotide spécifique d'un allèle. Chez un individu homozygote pour l'allèle A, seules les sondes spécifiques de cet allèle seront hybridées, et inversement chez un homozygote pour l'allèle B, alors qu'une hybridation sera retrouvée sur les deux types de sondes chez un individu hétérozygote AB. Le génotype de chaque SNP est déterminé par le logiciel fourni par Affymetrix (GeneChip DNA Analysis Software, GDAS, ou plus récemment le GeneChip Genotyping Analysis Software, GTYPE). Les génotypes peuvent être organisés en fonction de

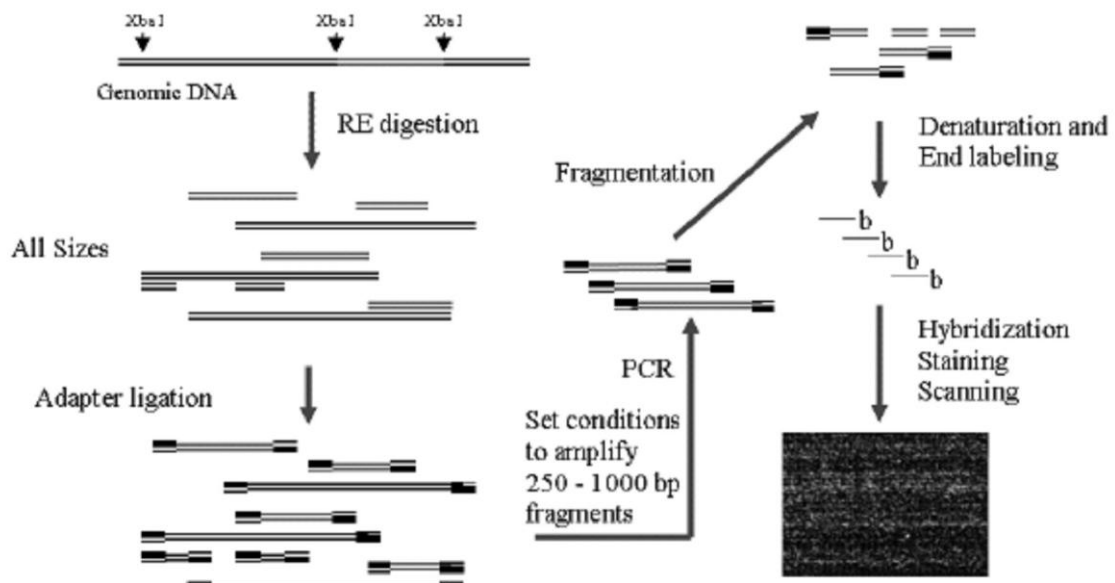


Figure 10: Etapes expérimentales de l'étude pangénome par puces de génotypage Affymetrix

L'ADN génomique est digéré avec une enzyme de restriction (XbaI dans le cas des puces 10K); un adaptateur est ligé aux fragments; une PCR avec une amorce complémentaire de l'adaptateur amplifie préférentiellement les fragments XbaI d'environ 250 à 1000 pb qui ont été ciblés par la compagnie Affymetrix pour contenir les SNPs analysés; l'ADN amplifié est fragmenté; puis marqué et hybridé sur la puce.

(D'après GeneChip® Mapping 10K 2.0 Assay Manual, Affymetrix)

la localisation chromosomique de chaque SNP et les haplotypes de plusieurs individus peuvent donc être comparés. Afin de pouvoir visualiser et comparer facilement les régions d'homozygotie entre différentes familles, Frédéric Plewniak a développé au sein de l'institut un logiciel appelé homoSNP. Ce logiciel correspond à une interface graphique permettant de visualiser les régions pour lesquelles un nombre défini de SNP consécutifs sont homozygotes. Les régions homozygotes sont représentées en mauve, bleu clair et bleu selon le nombre de SNPs consécutifs homozygotes. Pour une puce 10K, ces couleurs correspondent respectivement à un nombre de SNPs de [15,20[, [20,25[, [25,...[, et pour une puce 50k à [20,25[, [25,30[, [30,...[. Ce logiciel permet aussi de localiser les gènes déjà connus pour une maladie afin de vérifier si des régions homozygotes identifiées ne chevauchent pas avec des gènes ou des loci d'ataxie autosomique récessive connus.

Une version plus récente des puces de génotypage (900K) comporte 906,000 SNP et 946,000 sondes pour la détection des variations du nombre de copies (CNV). Les 906,000 SNP ont été testés sur 500 échantillons d'ADN dont 270 sont des échantillons HapMap. Approximativement, 482,000 SNP ont été sélectionnés à partir des puces des générations précédentes 5.0 et 500K. Les 424,000 restants sont des TagSNP, des SNP des chromosomes X et Y et des SNP mitochondriaux. La distance moyenne entre les marqueurs (1,852 million de marqueurs et les CNV) est moins de 700 pb. Chaque SNP est représenté par seulement 3 à 4 sondes avec appariement parfait «Perfect Match». La puce (900K) offre une des meilleures couvertures en CNV. En effet, elle couvre jusqu'à 90,5% des 3400 variations connues du nombre de copies. Un SNP est analysé en moyenne tous les 3,23 Kb et une sonde CNV en moyenne tous les 3,16 Kb. Au total l'information en SNP et CNV est analysée tous les 1,6Kb en moyenne.

En fonction du degré de consanguinité des parents, le nombre de régions homozygotes observées chez les individus atteints sera plus ou moins important. Les descendants de cousins germains ont un coefficient de consanguinité de 1/16; les descendants de cousins au second degré ont un coefficient de consanguinité de 1/64 (1/64ème de leur génome est identique par descendance et donc homozygote) et les descendants de doubles cousins germains ou de demi-frère et demi-soeur de 1/8. Certaines régions sont homozygotes à cause du manque d'informativité des SNP. Ces régions faussement homozygotes peuvent être exclues grâce à l'analyse d'autres marqueurs polymorphes: les microsatellites. L'analyse des microsatellites chez tous les atteints, les parents et la fratrie saine d'une même famille peut aider à réduire la ou les zones d'homozygotie retenues grâce à l'informativité de ces marqueurs.

A.2.2. Analyse de Marqueurs Microsatellites

Les marqueurs microsatellites sont des séquences répétées d'ADN composées de répétitions de 2 à 6 nucléotides. Les répétitions (CA)_n représentent les marqueurs les plus fréquents dans le génome humain. Ces séquences microsatellites sont présentes sur l'ensemble du génome, le plus fréquemment au niveau des introns des gènes mais également au niveau d'exons. Par un mécanisme de dérapage de la polymérase lors de la réplication, ces séquences ont une tendance relativement fréquente à muter (10^{-6} à 10^{-2}). La longueur de ces séquences, c'est-à-dire le nombre de répétitions, est donc variable d'un individu à un autre et d'un allèle à l'autre chez un même individu définissant le caractère polymorphe de ce type de marqueur. La transmission génétique de ces séquences est mendélienne et l'étude de la ségrégation des allèles dans une famille est possible grâce à une amplification de la séquence répétée par PCR avec des amorces spécifiques l'encadrant. Chaque allèle est défini ainsi par la taille du fragment amplifié illustrant le nombre de répétitions. La cartographie de ces marqueurs a permis de développer progressivement une carte génétique comprenant 5264 microsatellites couvrant le génome entier (Dib et al., 1996). Celle-ci a été établie grâce à l'étude par le Génethon de huit grandes familles d'origine caucasienne (familles du CEPH, Centre d'Etude des Polymorphismes Humains). Cependant, l'intervalle moyen entre deux marqueurs est de 1,6 cM permettant de couvrir l'ensemble du génome humain.

L'ordre des marqueurs microsatellites et les distances physiques ont été obtenus sur les bases de données UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>) pour les cartes physiques. Il existe deux types principaux de cartes moléculaires :

- les **cartes de liaison génétiques** obtenues à partir de la fréquence de recombinaison entre les loci, les distances y sont exprimées en centimorgan (cM)
- les **cartes physiques**: les distances y sont exprimées en paires de bases (pb), en Kb ou en Mb.

A.3. Recherche de gènes candidats

Une fois la liaison à un locus établie, la recherche de mutations dans les gènes présents dans l'intervalle permettra de déterminer la mutation responsable de la maladie. De plus, l'identification de plusieurs familles avec un phénotype semblable et liées au même locus permet de raffiner la localisation du gène responsable et d'entamer la recherche de mutations

dans les gènes candidats. L'identification des mutations d'un gène est essentielle pour comprendre la fonction du gène et par la suite la physiopathologie de la maladie.

La recherche de mutation a été faite par PCR et séquençage direct des exons et des séquences introniques flanquantes. Le produit PCR est purifié en utilisant le Montage PCR96 Cleanup Plates (Millipore, Bedford, MA). La PCR séquence est faite à l'aide du kit BigDye terminator kit (Applied Biosystems). Le produit de séquence est migré sur l'analyseur génétique ABI PRISM 3100. Les séquences sont analysées à l'aide du logiciel Seqscape 2.5 software (Applied Biosystems).

Matériels et Méthodes

V. Matériels et Méthodes

A. Production d'anticorps

Pour l'étude de la fonction de la rundataxine, nous avons produit deux anticorps polyclonaux dirigés contre la rundataxine humaine chez le lapin. Les antigènes utilisés étaient des peptides synthétiques allant de 15 à 21 acides aminés et choisis dans les régions N et C-terminales de la protéine. Les séquences des peptides choisis sont très proches de celles des peptides correspondant chez la souris afin que les anticorps générés puissent reconnaître la protéine murine.

Les séquences des peptides choisis sont les suivantes:

Peptide N-terminal: PEESRREHWQLLGNLKTVE-cystéine (100% homologue avec souris)

Peptide C-terminal: ARQSLESYLSDYE-cystéine (seule l'arginine (R) est changée en lysine (K) chez la souris)

Les peptides ont été synthétisés et purifiés par le service de «synthèse de peptides» de l'IGBMC (Pascal Eberling). Les peptides synthétiques étant trop petits pour avoir des propriétés antigéniques, ils ont été couplés à l'ovalbumine. La réaction de couplage requiert la présence d'une cystéine à l'une des extrémités des peptides synthétiques. Les peptides lyophilisés sont hydratés dans de l'eau déminéralisée et du PBS 10X stérile pour avoir une concentration finale de 10mg/ml. Deux mg d'ovalbumine (inject Maleimide activated ovalbumin de Pierce) sont également hydratés dans 200 µl d'eau pour avoir une concentration finale de 10 ng/µl. 300 µl de peptide sont ensuite mélangés avec 200 µl d'ovalbumine. Le mélange est agité pendant 2 heures à température ambiante. Le mélange peptide-ovalbumine est transféré en doigt de dialyse pour toute la nuit sous agitation à 4°C dans un litre de PBS 1X. Une nouvelle dialyse est réalisée le lendemain dans un litre de PBS 1X stérile. Le couplage peptide-ovalbumine sera vérifié sur gel acrylamide 8% et analysé avec du bleu de coomassie. Un dosage bradford est réalisé pour déterminer la concentration.

Pour la production d'anticorps polyclonaux, 500 µg de peptide couplé à une concentration d'un mg/ml sont injectés aux lapins. Pour chaque peptide, deux lapins ont été injectés. L'injection et le suivi des lapins ont été effectués par Gilles Duval du service des «anticorps polyclonaux» de l'IGBMC. Les sérums de lapin sont ensuite récupérés et testés par

western-blot pour leur capacité à reconnaître la rundataxine humaine surexprimée dans des cellules COS et Hela. Les profils obtenus ont été comparés avec ceux obtenus avec les sérums pré-immuns du même lapin récupéré avant qu'il ne soit injecté. Les sérums 2847 et 2849 permettant de détecter la protéine à la taille attendue et absente dans le sérum pré-immun ont été ensuite purifiés par affinité avec le peptide synthétique correspondant, immobilisé sur une colonne contenant un gel «Sulfolink» (Pierce). Le gel «Sulfolink» fixe les molécules possédant un groupe sulfhydryle libre. Ainsi, les cystéines localisées à l'une des extrémités des peptides synthétiques servent à deux fonctions distinctes: le couplage du peptide à l'ovalbumine et l'immobilisation sur les colonnes pour permettre la purification par immuno-affinité des anticorps.

B. Clonage du cDNA humain *KIAA0226*

Le vecteur PFK1 contient le cDNA *KIAA0226* humain qui manque l'exon 1 et une partie de l'exon 2. Un fragment choisi entre les exons 1 et 5 (enzymes de restriction choisies sont SpeI et ClaI) a été amplifié à partir d'un cDNA extrait de fibroblastes humains en utilisant les primers suivantes: Oligo SpeI-Exon1-*KIAA0226*: ATAATACTAGTgccccggatgcgccggaggg et Oligo ClaI-Exon5 *KIAA0226*: ggacgcatcgcgatctgagccagg. Le fragment amplifié a été ensuite inséré dans le plasmide pF1K après une digestion avec les enzymes SpeI et ClaI à la fois pour le plasmide et ce fragment amplifié. La séquence a été vérifiée par séquençage. Le clonage du cDNA complet dans le vecteur d'expression PXJ41 a nécessité le changement de l'ordre des sites de restriction au niveau du vecteur. Pour cela, des oligos ont été construits (les sites SpeI et EcoRI sont en gras):

Oligo1:AATT**GA**CTAGTTTCGAAGGTAG**AA**TTCA

Oligo2:AGCTT**GA**ATTCTACCTTCG**AA**ACTAGTC

Les 2 oligos ont été phosphorylés par kination puis hybridés l'un à l'autre. Les oligos sont ensuite ligués avec le vecteur PXJ41 après une digestion du vecteur avec les enzymes EcoRI et HindIII. Ceci a permis de créer le site SpeI et de déplacer le site EcoRI au niveau du vecteur PXJ41. Le cDNA *KIAA0226* entier a ensuite été inséré dans le vecteur PXJ41 après

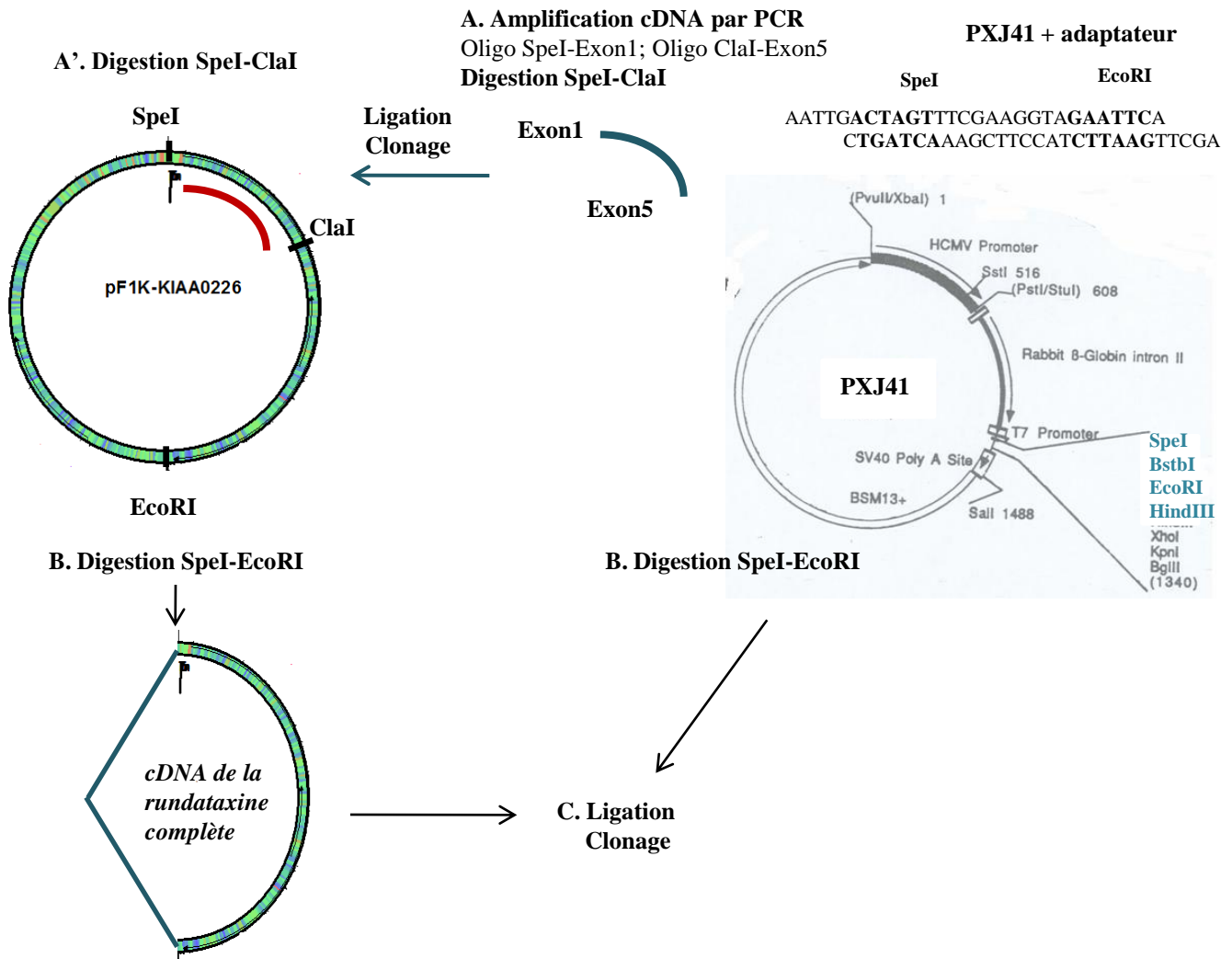


Figure 11: Clonage du cDNA de la rundataxine complète dans le vecteur d'expression PXJ41

A. Amplification par PCR du fragment exon1-exon5 à partir du cDNA hKIAA0226 suivie d'une digestion SpeI-ClaI. Le site SpeI a été construit dans l'amorce PCR.

A'. Digestion SpeI-ClaI du plasmide contenant les exons 5 à 21 pour insérer le fragment amplifié par PCR.

B. Une fois le produit contenant les exons 1 à 5 inséré, le plasmide a été digéré avec SpeI et EcoRI pour avoir la totalité du cDNA de 3kb. J'ai fait la même digestion pour le vecteur d'expression PXJ41 dont les sites de restriction ont été modifiés grâce à un adaptateur formé à partir d'oligonucléotides hybridés et phosphorylés.

C. Le cDNA et le vecteur ont été ligués à 16° pendant la nuit et le produit a été transformé dans des bactéries compétentes (clonage).

une digestion avec les enzymes SpeI et EcoRI (Figure 11). La construction finale a été vérifiée par séquençage.

La même construction PXJ41-hKIAA0226 a été utilisée pour réaliser le clonage de la mutation identifiée. Un fragment de cDNA a été amplifié à partir des fibroblastes du patient avec 2 amorces: une amorce située avant le site de restriction Tth111I et une amorce anti-sens contenant un site artificiel XhoI (XhoI est en gras).

Amorce1: GCCGACTGGCCAAGGAGCTTCTGGA

Amorce 2: GTCACCACAGACT**TCGAG**ACCCATCAACCTG

Après une digestion avec les enzymes XhoI et Tth111I, le fragment contenant la mutation (2927delC) a été inséré dans le cDNA KIAA0226 entier (Figure 12).

C. Culture de fibroblastes

Une biopsie de peau d'un patient de la famille AR a été mise en culture à 37°C en présence de 5% CO₂ afin d'obtenir des cultures primaires. Le milieu contient du DMEM contenant 1g/l de glucose supplémenté avec 10% du sérum de veau fœtal et 40 mg/l de gentamycine. Pour l'extraction d'ARN, les cellules sont récupérées dans du trizol et dans du tampon TGEK pour une extraction des protéines, après trypsinisation ou grattage des boîtes.

D. Transfection des cellules Cos et Hela

Les cellules poussées sur des boîtes de culture (10cm de diamètre) ont été transfectées avec la lipofectamine 2000 (Invitrogen Manufacturer's). Pour chaque boîte, 1,6 ml de milieu DMEM contenant 20 µl d'ADN est mélangé avec 1,6 ml de milieu contenant 60 µl de lipofectamine. Après une incubation de 30 minutes et ajout de 6,4 ml de milieu au mélange précédent (milieu+ ADN+ lipofectamine), les cellules sont couvertes avec ce mélange. Dans le cas de cellules transfectées, les protéines seront extraites après 24 heures de culture à 37°C. Pour les études de comarquage entre GFP Rab7 ou GFP Rab5 et la rundataxine, les cellules ont été co-transfectées avec les 2 constructions; celles des Rab et PXJ41-hKIAA0226 en suivant le même protocole.

B. Digestion Tth111I-XhoI

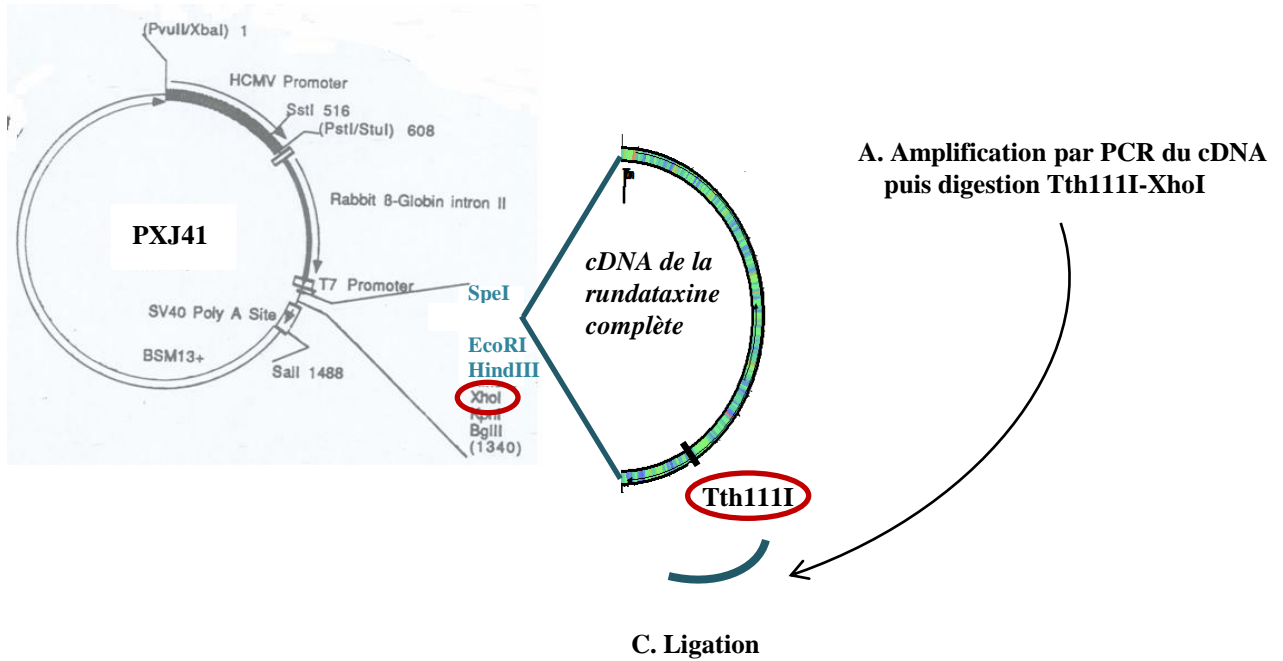


Figure 12: Clonage de la mutation 2927delC dans le vecteur d'expression PXJ41

A. Amplification par PCR du cDNA extrait à partir des fibroblastes du patient avec la mutation (**2927delC**) suivie d'une digestion Tth111I et XhoI; PCR réalisée avec les primers: Exon18-Tth111I et 3'UTR-XhoI. Le site XhoI a été construit dans l'amorce 3'UTR-XhoI à une position directement en aval du codon stop alternatif (le codon stop lié à la nouvelle phase de lecture). **B.** Digestion du vecteur PXJ41-rundataxine par les enzymes Tth111I présente dans le cDNA et XhoI. **C.** Ligation

E. Expression protéique par Western-blot

Les cellules sont lysées et les protéines sont solubilisées dans un tampon dénaturant contenant du SDS (Tampon Laemmli: Tris base, glycine et SDS). Les extraits protéiques sont portés à ébullition dans du tampon de charge (Tris 1M PH 6,8; 8% SDS; 1ml glycérol; Beta-mercaptoéthanol; 0.004% bromophénol bleu).

Les protéines sont séparées selon leur masse moléculaire sur gel de polyacrylamide-SDS 8% ou 10%. Afin de rendre les protéines accessibles à la détection par l'anticorps, elles sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. Après transfert, la membrane de nitrocellulose est bloquée dans une solution TBS1X (0,1% Tween-20) avec 5% de lait pendant 1h à température ambiante, avant d'être incubée toute la nuit avec l'anticorps primaire dirigé contre la rundataxine dilué dans une solution contenant 5% de lait dans du TBS1X+ 0,1% Tween-20. Les anticorps contre la rundataxine sont dilués à 1:10000. La membrane est ensuite lavée 5 fois pendant 10 min dans du TBS1X+0,1% Tween-20 puis incubée avec l'anticorps secondaire de chèvre dirigé contre des IgG de lapin (GAR :Goat anti-IgG rabbit) dilué à 1/10000 dans 5% de lait dans du TBS 1X +0,1% Tween-20. 5 lavages sont aussi réalisés pour la membrane. La membrane est incubée avec les anticorps secondaires anti-IgG de lapin couplés à la peroxydase de Raifort (horseradish peroxidase) pendant 2 heures à température ambiante. La peroxydase HRP catalyse la conversion d'un substrat chemiluminescent très sensible (SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate; Pierce) en molécules chemiluminescentes, produisant ainsi de la lumière. La détection est réalisée en utilisant des films autoradiographiques.

F. Immunocytochimie

Les cellules COS et Hela sont incubées à 37°C dans 2 ml de milieu de culture sur des lamelles dans des plaques 6 puits avec du milieu DMEM 1 g/l de glucose sans antibiotiques. Les cellules sont ensuite transfectées avec la lipofectamine 2000 pendant 24 heures. Les cellules transfectées sont ensuite lavées avec du PBS1X, fixées avec le paraformaldéhyde dilué à 4% pendant 1heure. Les cellules sont incubées pendant 1 heure à température ambiante avec les anticorps primaires dirigés contre la rundataxine et EEA1 dans le cas d'un co-marquage. Les anticorps sont dilués à 1:1000 dans du PBS1X-Triton 0,1%+ 3%FCS. 3 lavages de 10 minutes chacun au PBS 1X+0,1% de Tween 20 sont réalisés. Les cellules sont

ensuite incubées avec l'anticorps secondaire GAR (Goat anti-IgG rabbit) pour la rundataxine et GAM (Goat anti-IgG mouse) pour EEA1. Les anticorps secondaires GAR et GAM sont couplés à des fluorochromes Alexa 488 (fluorescence verte) et Alexa 594 (fluorescence rouge) et sont utilisés à une dilution de 1:1000. Les cellules sont lavées 3 fois puis incubées pendant 10 minutes avec du Hœchst dilué à 1:200 dans du PBS1X. Les lamelles sont ensuite fixées sur une lame par une solution Glycergel Mounting Medium. La préparation doit sécher une nuit à température ambiante dans le noir puis peut être stockée à 4°C. Les cellules sont observées au microscope à fluorescence.

Résultats

Au cours de mon stage de Master 2 et au début de ma thèse, le génotypage par puces SNP Affymetrix GeneChip Human Mapping 10K ou 50K était devenu disponible. L'étude pangéome à l'aide des puces Affymetrix a constitué une avancée majeure par rapport à l'analyse du tour du génome par le génotypage de 400 marqueurs microsatellites à la fois par la rapidité et par la densité de l'analyse. J'ai contribué alors à l'analyse de l'ensemble des familles consanguines (97 familles) adressées à notre laboratoire par les cliniciens collaborateurs; 92 familles analysées sont consanguines au premier degré et 5 autres familles ont une consanguinité ancienne ou suspectée. Nous avons commencé à analyser les grandes familles avec 4 enfants atteints puis celles qui possèdent 3 ou 2 enfants atteints. Les cas isolés étaient analysés en dernier. Le diagnostic d'ataxie de Friedreich et d'ataxie avec déficit en vitamine E a été exclu chez l'ensemble de ces familles par recherche de l'expansion GAA au niveau du premier intron du gène *FRDA* et par recherche de la mutation fondatrice (744delA) au niveau de l'exon 5 du gène *α-TTP* pour les patients d'Afrique du Nord ou par dosage de la vitamine E pour les autres patients.

Cette analyse nous a permis de confirmer l'utilité des puces Affymetrix dans notre stratégie de cartographie par homozygotie grâce à l'identification de la mutation causale dans un gène connu d'ataxie chez 10 familles (mutations dans la *sacsine*, l'*aprataxine*, *ATM* et la *senataxine*) (Manuscrit 1). Pour les 87 familles restantes pour lesquelles le diagnostic moléculaire n'a pas pu être établi, la suite de l'analyse de ces familles a consisté à confirmer, exclure ou réduire, par l'étude de marqueurs microsatellites sur les autres membres disponibles de la famille, les régions homozygotes identifiées par HomoSNP et ne contenant pas un gène connu d'ataxie. Une fois la région liée à la maladie confirmée, le séquençage direct de gènes candidats positionnels permettrait d'identifier la (les) mutations dans le gène responsable de ces nouvelles formes rares d'ataxies.

Parmi ces 87 familles, notre intérêt s'est porté sur:

- I. une large famille consanguine avec 4 atteints (Manuscrit 2)
- II. 5 familles algériennes homozygotes au niveau d'un locus connu sur le chromosome 20 appelé SCAR6, mais qui s'est avéré également correspondre à un nouveau locus appelé PHARC (Polyneuropathie, hypoacousie, ataxie, rétinite pigmentaire, cataracte) (Manuscrit 3)
- III. une famille serbe avec 3 atteints (Manuscrit 4)
- IV. une famille d'Arabie Saoudite avec 3 atteints (Manuscrit 5)

Chapitre 1 Résultats

Manuscript 1: Molecular diagnosis of known recessive ataxias by homozygosity mapping with SNP arrays

Manuscript 1: Molecular diagnosis of known recessive ataxias by homozygosity mapping with SNP arrays

Dans cette partie, nous avons démontré l'utilité du génotypage par puces Affymetrix dans notre stratégie de cartographie par homozygotie. Cette étude a été largement facilitée par l'utilisation du logiciel HomoSNP développé dans notre institut par Frédéric Plewniak. Ce logiciel permet de visualiser les régions de plus de 15 SNP homozygotes successifs sur une puce 10K et de plus de 20 SNP successifs sur une puce 50K. Cependant, ce seuil de détection génère un très grand nombre de petites régions probablement homozygotes par hasard ce qui nous a amenés à fixer un nouveau seuil pour ne retenir que les régions homozygotes partagées supérieures à 20 SNP consécutifs sur les puces 10K et 35 SNP consécutifs pour les puces 50K. Nous avons pu identifier 11 familles dont la région homozygote partagée par les atteints chevauchait avec un locus contenant l'un des 4 gènes d'ataxies choisis dans cette étude. Le séquençage direct du gène correspondant chez ces familles a abouti à l'identification de la mutation chez 10 familles parmi les 11 (Tableau 1, Manuscrit 1). Les caractéristiques cliniques des patients sont indiquées dans le tableau 2 du manuscrit.

Des mutations dans le gène *sacsine* ont été trouvées chez les 6 familles homozygotes pour le locus ARSACS, dans le gène *aprataxine* chez les 2 familles liées au locus AOA1, dans le gène *senataxine* chez la famille liée au locus AOA2 et dans le gène *ATM* chez l'une des 2 familles liées au locus AT. Ce décompte ne préjuge en rien de la fréquence de ces formes d'ataxies puisque d'autres familles de la série ont été diagnostiquées AOA1, AOA2 ou AT sur la base des données cliniques et biochimiques.

Cependant, l'analyse des familles 1 et 10 a montré les limites de l'approche par cartographie par homozygotie. En effet, aucune mutation dans le gène *ATM* n'a été trouvée chez les 4 atteints de la famille 10 liée au locus AT suggérant la présence d'un nouveau locus d'ataxie au niveau du chromosome 11q21-23 (Figure 1; Manuscrit 1). D'autre part, la famille 1 est composée d'un oncle et d'une tante paternels et de leurs neveux tous issus de mariages consanguins (Figure 2; Manuscrit 1). Dans cette famille, le gène de la sacsine a été retrouvé dans une région homozygote commune à l'oncle P2 et à la tante P1 au-dessus du seuil de 20 SNP successifs homozygotes. Chez le neveu P3, cette même région était homozygote pour 24 SNP consécutifs alors qu'elle n'était que de 10 SNP homozygotes chez le neveu P4 et donc non détectée par le programme HomoSNP (Figure 2; Manuscrit 1). Six autres régions homozygotes sont partagées par P1 et P2 alors que P3 et P4 partagent 4 autres régions

homozygotes différentes des régions partagées par P1 et P2. Devant l'absence de région homozygote partagée par les 4 patients, le gène *sacsine* a été séquencé en priorité et une délétion de 4pb entraînant un décalage du cadre de lecture chez les 4 atteints a été trouvée indiquant qu'une recombinaison chez le neveu P4 avait fortement réduit l'intervalle de liaison à 10 SNPs consécutifs. Si le patient P4 avait été analysé seul par homozygotie, le gène de la sacsine n'aurait pas été trouvé.

Pour évaluer l'efficacité du seuil de détection des régions homozygotes dans l'identification des mutations, nous avons analysé le contenu en SNP de toutes les régions homozygotes identifiées chez les atteints des 11 familles. La médiane du contenu en SNP est de 45 SNP pour les puces 10K et 68 pour les puces 50K (Figure 3; Manuscrit 1). Les régions homozygotes qui contiennent les mutations retrouvées chez les 10 familles ont une taille supérieure à la médiane sauf pour la famille 6 et les neveux de la famille 1 indiquant que ces mutations causales se trouvent préférentiellement dans les grandes régions d'homozygotie. En conclusion, les puces Affymetrix constituent un outil important pour l'analyse pangénome des familles consanguines. La couverture en SNP peut parfois limiter cette analyse et l'utilisation des puces «nouvelle génération» avec une haute densité en SNP (250K et 900K) permet de résoudre cette difficulté.

Molecular diagnosis of known recessive ataxias by homozygosity mapping with SNP arrays

D. H'mida-Ben Brahim · A. M'zahem · M. Assoum · Y. Bouhlal · F. Fattori · M. Anheim · L. Ali-Pacha · F. Ferrat · M. Chaouch · C. Lagier-Tourenne · N. Drouot · C. Thibaut · T. Benhassine · Y. Sifi · D. Stoppa-Lyonnet · K. N'Guyen · J. Poujet · A. Hamri · F. Hentati · R. Amouri · F. M. Santorelli · M. Tazir · M. Koenig

Received: 9 May 2010/Revised: 15 July 2010/Accepted: 19 July 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract The diagnosis of rare inherited diseases is becoming more and more complex as an increasing number of clinical conditions appear to be genetically heterogeneous. Multigenic inheritance also applies to the autosomal recessive progressive cerebellar ataxias (ARCAs), for which 14 genes have been identified and more are expected to be discovered. We used homozygosity mapping as a guide for identification of the defective locus in patients with ARCA born from consanguineous parents. Patients from 97 families were analyzed with GeneChip Mapping 10K or 50K SNP Affymetrix microarrays. We identified six families homozygous for regions containing the autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay

(ARSACS) gene, two families homozygous for the ataxia-telangiectasia gene (ATM), two families homozygous for the ataxia with oculomotor apraxia type 1 (AOA1) gene, and one family homozygous for the AOA type 2 (AOA2) gene. Upon direct gene testing, we were able to identify a disease-related mutation in all families but one of the two kindred homozygous at the ATM locus. Although linkage analyses pointed to a single locus on chromosome 11q22.1-q23.1 for this family, clinical features, normal levels of serum alpha-fetoprotein as well as absence of mutations in the ATM gene rather suggest the existence of an additional ARCA-related gene in that interval. While the use of homozygosity mapping was very effective at pointing to

D. H'mida-Ben Brahim · M. Assoum · M. Anheim · C. Lagier-Tourenne · N. Drouot · C. Thibaut · M. Koenig
Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/Université de Strasbourg, 67404 Illkirch, France

D. H'mida-Ben Brahim · M. Assoum · M. Anheim · C. Lagier-Tourenne · N. Drouot · C. Thibaut · M. Koenig
Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France

D. H'mida-Ben Brahim (✉)
Laboratoire de Cytogénétique,
Génétique Moléculaire et Biologie de la Reproduction Humaines, CHU Farhat HACHED, 4011 Sousse, Tunisia
e-mail: dorrahmida@yahoo.fr

A. M'zahem · Y. Sifi · A. Hamri
Centre Hospitalo-Universitaire Ben Badis, Constantine, Algeria

Y. Bouhlal · F. Hentati · R. Amouri
Institut de Neurologie, Tunis, Tunisia

F. Fattori · F. M. Santorelli
Molecular Medicine and Neurosciences IRCCS Bambino Gesù Hospital, Rome, Italy

M. Anheim
Service de Neurologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67091 Strasbourg, France

L. Ali-Pacha · M. Tazir
Service de Neurologie, Centre Hospitalo-Universitaire Mustapha, Alger, Algeria

F. Ferrat · M. Chaouch
Service de Neurologie, Etablissement Hospitalier Spécialisé de Ben Aknoun, Alger, Algeria

T. Benhassine
Institut Pasteur, Alger, Algeria

D. Stoppa-Lyonnet
Institut Curie, Service de Génétique, INSERM U830, 75248 Paris, France

D. Stoppa-Lyonnet
Université Paris Descartes, 75270 Paris, France

K. N'Guyen · J. Poujet
Hôpitaux Universitaires de Marseille, Marseille, France

the correct gene, it also suggests that the majority of patients harbor mutations either in the genes of the rare forms of ARCA or in genes yet to be identified.

Keywords Recessive ataxia · Homozygosity mapping · SNP microarrays

Introduction

The diagnosis of a wider number of rare inherited diseases is becoming increasingly difficult because of the frequent clinical overlap, non-specificity of biomarkers and expanding genetic heterogeneity, i.e., mutations in many different genes cause the same disease. In particular, multigenic inheritance applies for the autosomal recessive progressive cerebellar ataxias (ARCAs), for which 14 genes have been identified in the past 15 years [12, 14, 15], even after excluding the complex field of metabolic ataxias, for which biochemistry leads precisely to the correct molecular diagnosis. In addition, most conditions are associated with mutations in genes of remarkably large coding capacity (SYNE1 (NM_182961) 26 kb in 145 coding exons [14], Sacsin (NM_014363) 14 kb in 9 exons [11, 20], ATM (NM_000051) 9 kb in 62 exons [21], Senataxin (NM_015046) 8 kb in 24 exons [17], PolG (X98093) 4 kb in 22 exons [28]), further complicating the definition of an efficient strategy for seeking pathogenic mutations [1]. On the other hand, in some populations where inbreeding is frequent, the resulting consanguinity tends to increase the observation of rare recessive diseases. Homozygosity mapping of patients born from consanguineous parents can be used as a powerful guide for identification of the defective locus [4]. We demonstrate here the usefulness and limits of homozygosity mapping with SNP arrays [15, 24] in consanguineous cases for the molecular diagnosis of spastic ataxia of the Charlevoix-Saguenay (ARSACS, saccin gene), ataxias with oculomotor apraxia types 1 and 2 (AOA1 and AOA2, aprataxin (NM_017692) and senataxin genes), and ataxia-telangiectasia (A-T, ATM).

Materials and methods

Patients and families

DNA samples of ARCA patients were first analysed for Friedreich ataxia (FRDA) [7] and ataxia with vitamin E deficiency (AVED) [19] using molecular or metabolic investigations, respectively. The patients negative for FRDA and AVED represented 97 families, of different origins: 67 kindred were Algerian, 27 French, 8 Saudi

Arabian, 2 Tunisian, 3 were from the USA and 11 from other origins.

SNP genotyping

Genome-wide homozygosity mapping of 97 families was undertaken using either the GeneChip Mapping 10k Xba 142 2.0 Array containing 10,204 SNP markers or the Mapping 50K Xba 240 Array containing 58,102 SNPs (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA). SNP genotypes were obtained by following the Affymetrix protocol for the GeneChip Mapping Array (Mapping 10K2.0 Assay Manual (701722 Rev.3), Mapping 100K Assay Manual (P/N 701684 Rev.3)). Briefly, 250 ng of genomic DNA isolated from peripheral blood were digested with the restriction endonuclease XbaI for 2.5 h. Digested DNA was mixed with Xba adapters and ligated using T4 DNA ligase for 2.5 h. Ligated DNA was added to 4–5 separate PCR reactions, amplified, pooled and purified to remove unincorporated dNTPs. The purified PCR product was then fragmented with DNase I, end-labeled with biotin and hybridized to an array for 16 h at 48°C in a standard Affymetrix 640 hybridization oven. After hybridization, the arrays were stained and washed using an Affymetrix Fluidics Station F450 and images were obtained using an Affymetrix GeneChip scanner 3000 7G. Single-nucleotide polymorphism (SNP) allele calls were generated by the GeneChip Genotyping analysis Software (Gtype v4.1). Homozygous regions were identified with the HomoSNP software developed to visualize shared regions of homozygosity in consanguineous families (software available on request from plewniak@igbmc.u-strasbg.fr) [15, 24, 25]. The minimal number of consecutive homozygous SNP necessary to define a region of homozygosity was calculated as resulting in a likelihood of 0.05 to be observed by chance, with a mean SNP heterozygosity of 0.38 and 0.30 for the 10K and 50K SNP arrays, respectively, and by assuming gross linkage equilibrium between the markers.

Microsatellite marker analysis

Microsatellite markers from chromosome 11q were designed from the UCSC Human genome database (<http://genome.ucsc.edu>, March 2006 release). Analysis was undertaken on an ABI Prism 3100 genetic analyzer with allele sizes determined using the ABI PRISM1 Genotyper software package (Applied Biosystems, Foster City, CA) [16].

Mutational analysis

Sequencing of the candidate genes for recessive ataxias, including all exons and intronic–exonic boundaries was

undertaken using PCR primers as previously reported [15]. Amplified PCR products were purified on Montage PCR96 Cleanup Plates (Millipore, Bedford, MA) and bi-directionally sequenced using BigDye Terminator

chemistry implemented on an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer. Sequences were aligned and compared with consensus sequences obtained from the human genome databases (<http://genome.ucsc.edu>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Table 1 Shared homozygous regions of affected patients from the 11 studied families and identified mutations

Family	No. of patients	SNP density	Chromosomal localisation	Size (Kb)	No. of consecutive homozygous SNP	Ataxia genes	Diagnosis and mutation
1							
Uncle and aunt	2	10K	1p31.1	7049	27		ARSACS
			2p25.1-p22.3	21567	94		c.12851_12854 delAGAG
			6p25.1-p23	8693	40		p.Glu4284AlafsX23
			7p14.3-12.2	17765	87		
			7q35	3861	20		
			11q14.2-q22.1	12827	67	<i>MRE11</i>	
			13q12.11-q12.3	11351	58	<i>SACS</i>	
Nephews	2	10K	6q23.2-q24.1	6936	15 ^a		
			13q12.12-12.13	2890	10 ^a	<i>SACS</i>	
			13q21.2-q22.1	15219	72		
			13q33.3-qter	8301	36		
			16p13.1-p13.2	8423	25		
2	2	50K	2q31.2-q32.3	19084	441		ARSACS
			3q12.3-q13.1	1940	42		c.10290C>G
			4p12-q13.1	18409	355		p.Tyr3430X
			5q14.1-q21.2	24028	607		
			5q35.1-qter	11910	160		
			8q13.1-q13.2	2760	35		
			8q24.13-q24.21	4004	70		
			9q33.2-q34.11	4898	37		
			13q11-q12.3	5864	141	<i>SACS</i>	
			17p11.2-q12	7075	59		
			17p12-p11.2	10779	143		
3	2	50K	1p22.1-p21.3	4091	80		ARSACS
			1q23.3-q25.1	11436	359		c.7372_7376delCTTAT
			1q42.12-q43	12372	253		p.Leu2458AlafsX5
			4p16.2-p16.1	4827	33		
			13q12.11-q12.12	2165	72	<i>SACS</i>	
			13q14.11-q14.12	1679	34		
			15q21.1	1462	36		
			15q21.2-q21.3	1959	43		
4	4	50K	10p11.21-q11.21	6296	35		ARSACS
			13q12.11-q12.2	9335	233	<i>SACS</i>	c.12220G>C p.Ala4074Pro
5	2	50K	1p36.11-p35.2	4788	26		ARSACS
			3q26.31-q26.33	9460	168		c.6409C>T
			4q13.3	2208	38		p.Gln2137X
			13q11-q12.13	7478	189	<i>SACS</i>	
6	3	10K	13p13-q12.12	23584	27	<i>SACS</i>	ARSACS
							c.4882_4886
							delCAGTT/insAGAAGC
							p.Gln1628ArgfsX12

Table 1 continued

Family	No. of patients	SNP density	Chromosomal localisation	Size (Kb)	No. of consecutive homozygous SNP	Ataxia genes	Diagnosis and mutation
7	2	50K	2p24.3	1669	36	<i>APTX</i>	AOA1
			2p22.1	848	39		c.837G>A
			3p22.1	1584	35		p.Trp279X
			4p15.33-p15.32	3940	114		
			5q14.3	1550	41		
			5q21.1	1630	43		
			9p21.1-q21.13	46488	349		
			14q23.1	1564	38		
8	2	10K	1p31.1	6107	50	<i>APTX</i>	AOA1
			2p23.3-p21	20134	96		c.781C>T
			2p13.2-q11.2	24591	44		p.Leu261Phe
			4q21.22-q23	18877	67		
			7p13-q21.2	46233	116		
			7q22.2-q31.2	11705	30		
			9p21.1-q33.1	49549	70		
			9q33.1-q34.11	10938	39		
9	1	10K	1p13.2-q23.3	43273	71	<i>ATM</i>	A-T
			5p14.3-p13.3	10420	32		c.IVS36+3del4
			5q13.2-q14.3	19480	72		Skipping of exon 36
			6p22.3-p21.32	11100	40		
			6q24.2-q25.1	147666	29		
			9p23-p22.3	4319	36		
			11q22.3-q23.3	12473	46		
			14q23.1-q31.1	18577	65		
10	4	50K	11q21-q23.3	10017	302	<i>ATM</i>	A-T ?
			11q21-q23.3	10017	302		
11	1	50K	1q25.3-q31.3	11121	300	<i>SETX</i>	AOA2
			5q31.3-q33.1	10217	272		c.6848_6851delCAGA
			6p12.1-q14.1	19729	403		p.Thr2283LysfsX32
			9q33.2-q34.3	13598	89		

number, *a* indicates that a recombination in one of the affected reduced the SNP content of the shared homozygous region to a value below the threshold (20 SNP for 10K arrays and 35 SNP for 50K arrays)

using the software package Seqscape. (Version 2.5; ABI). All PCR primers and conditions are available upon request. Parental segregation of the identified mutations was investigated in all available family members.

Results

Families with a diagnosis of FRDA, AVED, metabolic ataxias, ataxia with leukodystrophy or congenital ataxia [9] were excluded from the study. Some families had a direct molecular testing for ATM, AOA1 or AOA2, based on canonical clinical and biochemical findings, and were

therefore not analysed on SNP arrays. The remaining 92 consanguineous ataxia families and five families with suspected ancient consanguinity were analyzed with Affymetrix 10K or 50K SNP Genechip microarrays. Only affected individuals from each family were genotyped. Regions of homozygosity shared within each family and overlapping with the ARSACS, AOA1, AOA2 and A-T loci were identified with HomoSNP. In order to rapidly define homozygous regions, only the number of consecutive homozygous SNPs was taken into account, assuming that for large regions, the global informativeness of the markers would be roughly equal to the number of analyzed SNPs. The threshold for identification of homozygous

Table 2 Clinical features of the patients

Family and diagnosis	1		2		3			
	ARSACS		ARSACS		ARSACS			
	Tunisia		Algeria		Algeria			
Degree of consanguinity	First	Second	First	First	First	First		
Patient	1	2	4	5	6	7	8	9
Sex	F	M	M	M	F	F	M	M
Age of onset (years)	1	1	1	NA	6	2	9	30
Disease duration (in years)	29	37	16	NA	25	25	16	(deceased)
Cerebellar ataxia	+	+	+	NA	+	+	+	+
Gait	Ataxo spastic	Ataxo spastic	Ataxo spastic	Ataxo spastic	Spastic>ataxic	Spastic>ataxic	Unstable	Unstable
Dysarthria	+	+	-	NA	+	+	-	+
Bilateral Babinski sign	+	+	+	NA	+	+	-	-
Knee DTR	Brisk	Brisk	Brisk	Brisk	NA	Brisk	Brisk	Present
Ankle DTR	Absent	Absent	Brisk	Brisk	NA	Absent	Absent	Absent
Mental retardation	-	-	-	NA	Mild	Mild	-	?
Ocular abnormalities	Horizontal nystagmus	Horizontal nystagmus	Horizontal nystagmus	NA	Nystagmus	Nystagmus	Nystagmus	Nystagmus
Pes cavus	-	-	-	NA	+	+	+	-
MRI	NA	NA	Cerebellar and total spinal cord atrophy	NA	Cerebellar atrophy	Cerebellar atrophy (vermis> hemispheres) and temporal atrophy	NA	NA
EMG	Axonal sensory neuropathy	Axonal sensory neuropathy	Axonal sensory neuropathy	NA	Sensorimotor axonal neuropathy	Sensorimotor axonal neuropathy	Sensorimotor neuropathy	NA
AFP (ng/μl)	NA	NA	NA	NA	2.1	NA	NA	NA
Miscellaneous		Systolic mitral murmur						

Table 2 continued

Family and diagnosis	4		5		6				
	ARSACS	Algeria	ARSACS	Algeria	ARSACS	Algeria			
Origin	Algeria		Algeria		Algeria				
Degree of consanguinity	First		First		First				
Patient	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Sex	F	F	M	F	M	F	F	F	M
Age of onset (years)	21	4	5	5	6	12	6	7	12
Disease duration (in years)	25	39	36	25	17	14	23	21	10
Cerebellar ataxia	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gait	Unstable	Unstable	Unstable	Unstable	Unstable	Unstable	Unstable	Unstable	Unstable
Dysarthria	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Bilateral Babinski sign	+	+	+	+	+	+	+	-	Equivocal
Knee DTR	Brisk	Brisk	Brisk	Brisk	Brisk	Brisk	Brisk	Present	Reduced
Ankle DTR	Absent	Brisk	Brisk	Absent	Brisk	Absent	Absent	Absent	Absent
Mental retardation	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Ocular abnormalities	Horizontal nystagmus	Horizontal nystagmus	Strabismus nystagmus	Horizontal nystagmus	Nystagmus	Strabismus nystagmus	Strabismus nystagmus	Nystagmus	Nystagmus
Pes cavus	+	+	+	+	+	+	+	-	+
MRI	NA	NA	Cerebellar atrophy	Cerebellar atrophy	Cerebellar atrophy	NA	Vermis atrophy	NA	NA
EMG	NA	NA	Demyelinating neuropathy	Demyelinating neuropathy	Demyelinating neuropathy	NA	Sensorimotor neuropathy	Demyelinating neuropathy	Demyelinating neuropathy
AFP (ng/ μ l)	NA	NA	NA	NA	1.67	NA	NA	NA	NA
Miscellaneous	Scoliosis	Amblyopia	Deafness	Hyperlordosis anemia	Cyphosis	Scoliosis	Scoliosis	Scoliosis	Scoliosis

Table 2 continued

Family and diagnosis	7 AOA1 Algeria First	8 AOA1 Lebanon First	9 A-T Algeria First	10 Linked to 11q21-23 Algeria First	11 AOA2 Algeria Remote consanguinity					
Patient	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Sex	M	M	F	F	M	M	M	F	M	M
Age of onset (years)	5	6	16	32	4	7	8	7	9	15
Disease duration (years)	11	8	NA	NA	7	27	21	13	24	5
Cerebellar ataxia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gait	Unstable	Unstable	in wheelchair	With aid	Unstable	Unstable	Unstable	Unstable	Unstable	Unstable
Dysarthria	+	+	±	-	+	+	+	+	+	+
Bilateral Babinski sign	-	-	Equivocal	-	+	+	-	+	-	-
Knee DTR	Absent	Absent	Absent	Absent	Reduced	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
Ankle DTR	Absent	Absent	Absent	Absent	Reduced	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
Mental retardation	+	+	-	NA	-	-	-	-	-	-
Ocular abnormalities	Oculomotor apraxia	Oculomotor apraxia	Abnormal ocular movements	-	Oculomotor apraxia	Oculomotor apraxia	Oculomotor apraxia	Oculomotor apraxia	Oculomotor apraxia	Unilateral strabismus
Pes cavus	+	-	-	NA	-	+	+	Flat feet	+	+
MRI	Cerebellar atrophy	NA	Vermis atrophy	NA	Normal	NA	NA	Cerebellar atrophy	Cerebellar atrophy	Cerebellar atrophy
EMG	Sensory neuropathy	Sensory neuropathy	Sensory neuropathy	NA	Axonal neuropathy	Axonal neuropathy	NA	NA	Axonal neuropathy	Sensory neuropathy
AFP (ng/μl)	2.06	3	NA	NA	207	1.9	1.7	0.6	NA	21.5
Miscellaneous	Scoliosis	Scoliosis	NA	Dysphagia	NA	Upper-limb wasting	Upper-limb wasting	Scoliosis	Upper-limb wasting	Upper-limb wasting

M male, F female, NA not available, DTR deep tendon reflexes, MRI magnetic resonance imaging, EMG electromyography, AFP alpha fetoprotein

regions was set to a minimum of 20 consecutive homozygous SNPs identified with the 10K SNP Genechip microarrays and 35 consecutive homozygous SNPs identified with the 50K SNP Genechip microarrays. Because regions smaller than the threshold likely represent homozygosity by state (i.e., by chance), they were not subsequently analyzed. Overall, we identified six families homozygous for the region flanking the *SACS* gene, two families each for the *ATM* and the *APTX* genes, and one for the *SETX* gene (Table 1). The clinical features of the patients of these families are shown in Table 2. A mutation was identified in all the cases with the exception of one of the two families homozygous for the *ATM* region (Table 1). This family, family #10, consisted of four patients and one healthy sibling. Analysis of the entire family with 11q21-23 microsatellite markers (Fig. 1) confirmed linkage of the disease to this locus with a LOD score of 3.1 ($\theta = 0$) and re-analysis of the SNP data set indicated that there were no other homozygous regions shared

between the four affected. Since the *MRE11* (NM_005591) gene—whose mutations have been detected in families with ataxia-telangiectasia-like disorder (*MRE11A*; MIM 604391) lies just outside the region of shared homozygosity due to a recombination in one of the patients (Fig. 1), we also analyzed the coding exons and the flanking intronic sequences of *MRE11* but did not detect any disease-related mutation.

ARSACS mutation in family #1 was initially searched only in the affected uncle and aunt of family #1 and not in the affected nephews since homozygosity for the ARSACS region was above the threshold in the uncle and aunt (241 and 58 consecutive SNPs, respectively) and was below the threshold in one of the two nephews (24 consecutive SNPs in one nephew and ten in the other, Fig. 2). Because no known ataxia gene was localized in the large homozygous regions shared by the nephews, the ARSACS mutation of the uncle and aunt was subsequently searched and found in homozygosity in the nephews, indicating that the small

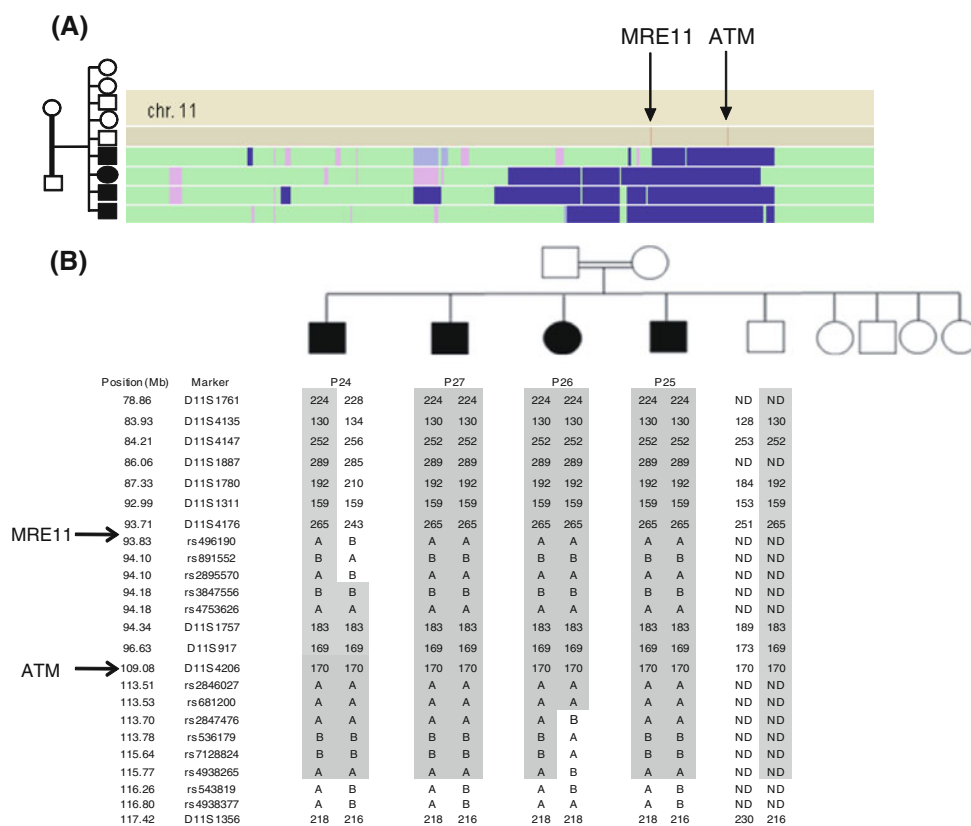
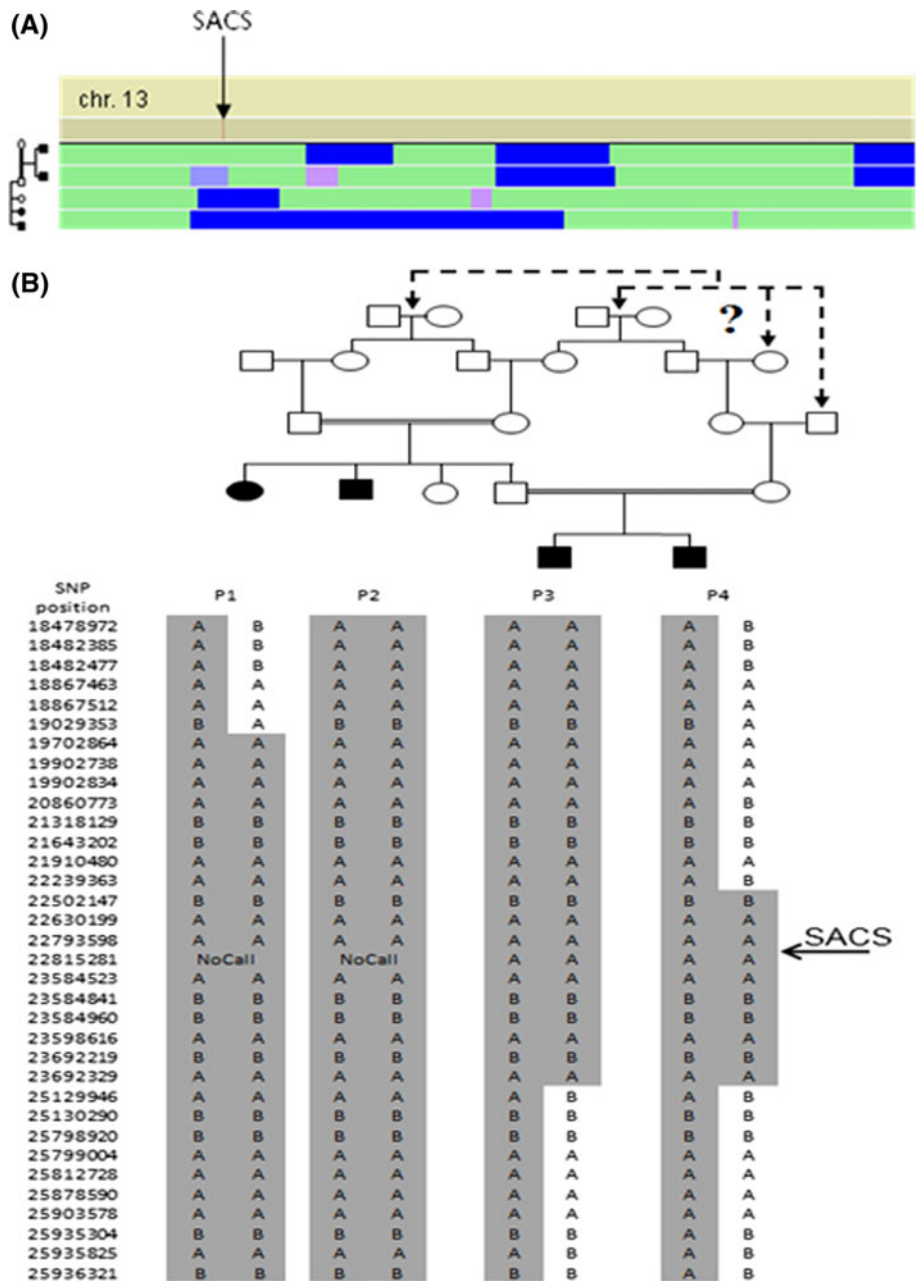


Fig. 1 Genotyping results of family #10. **a** Homozygous regions over chromosome 11 in the patients of family #10. Homozygous regions are displayed by the HomoSNP software as blue bars (more than 30 consecutive homozygous SNPs), purple bars (more than 25 consecutive homozygous SNPs) and pink bars (more than 20 consecutive homozygous SNPs). SNP results were obtained with 50K arrays. The four patients share a region of homozygosity by descent on 11q21-q23, which contains the *ATM* gene. Vertical green bars that interrupt

the regions of homozygosity correspond to one or two heterozygous SNPs that are in fact calling errors. **b** Pedigree of family #10 with microsatellite markers and selected SNP genotypes that locate precisely the recombination breakpoints. The recombination in patient P27 excludes the *MRE11* gene. This was corroborated by direct gene testing (see text). Markers and physical positions are indicated on the left and are organized from top to bottom in the centromeric to telomeric order

Fig. 2 Genotyping results of family #1. **a** Homozygous regions over chromosome 13 in the patients of family #1. Homozygous regions are displayed by the HomoSNP software as *blue bars* (more than 25 consecutive homozygous SNPs), *purple bars* (more than 20 consecutive homozygous SNPs) and *pink bars* (more than 15 consecutive homozygous SNPs). SNP results were obtained with 10K arrays. The *top horizontal line* indicates the position of recessive-ataxia loci and genes. Subsequent lines indicate individual results of the patients represented on the left. Three of the four patients share a region of homozygosity by descent on 13q12, which contains the *SACS* gene. **b** Pedigree and SNP analysis of family #1 showing that homozygosity for the disease in the affected nephews is due to inbreeding (*dotted arrows*) rather than to consanguinity. The uncle and aunt, born from a first degree consanguineous marriage, share a large homozygous region overlapping the ARSACS locus while the nephews were homozygous over only 24 and 10 consecutive SNP, respectively, also overlapping the ARSACS locus



homozygous region around the ARSACS gene in the nephews is due to ancient inbreeding, rather than to the second degree consanguinity of their parents (Fig. 2). In order to see whether the thresholds used to define regions of homozygosity allowed efficient identification of the regions of linkage, we analyzed the SNP content of all homozygous regions identified in the 11 families reported in this study. With a threshold of 20 consecutive homozygous SNPs for the 10K SNP arrays and 35 consecutive homozygous SNPs for the 50K SNP arrays, the median SNP content of the homozygous regions was 45 SNPs for the former and 68 SNPs for the latter. However the

distribution of SNP content indicated that the largest fraction of homozygous regions was in the lower range (20–30 SNP fraction for the 10K arrays and 35–50 SNP fraction for the 50K arrays, Fig. 3), suggesting that most small homozygous regions either represent homozygosity by state rather than by descent, or result from high inbreeding in the respective populations. The SNP content of the homozygous regions containing the mutation (Table 1) was above the median SNP content of all homozygous regions (Fig. 3) with the exception of family #6 and of the nephews of family #1, indicating that the threshold for defining homozygous regions was set at safe

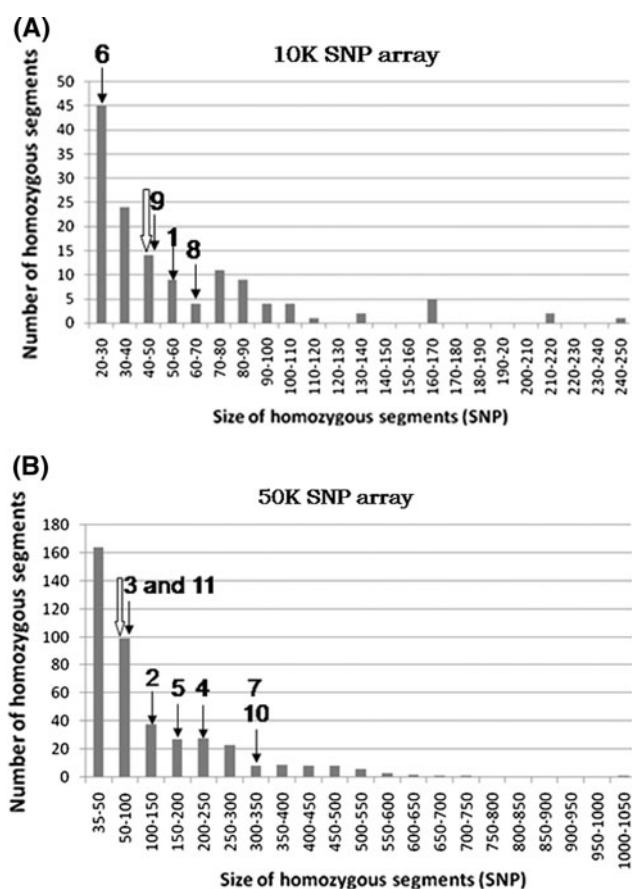


Fig. 3 Distribution of the size of the homozygous regions identified with the 10K (a) and 50K (b) SNP microarrays in the patients of the 11 recessive ataxia families described in this study. The size of homozygous segments is estimated by the number of consecutive homozygous SNPs. It is likely that a significant fraction of the small homozygous regions represents homozygosity by state rather than by descent. The empty arrow indicates the median SNP content of all homozygous regions. The small arrows indicate the SNP content of the shared homozygous regions containing the mutation (the SNP content of the shared homozygous region between the uncle and the aunt for family #1 or of the unique linked region of family #10). Numbers at the top of the arrows are family numbers

lower value. However, while the threshold appeared appropriate when the disease is the consequence of first degree consanguinity, it is probably not suitable for ancient consanguinity.

Discussion

The use of homozygosity mapping as an orientation for identification of the defective gene pointed to the correct locus in 10 out of 11 families for which the linked homozygous region overlapped with one of the four investigated genes. This strategy turned out to be highly effective for ARSACS, as all six linked families had mutations in SACS, while clinical presentation alone

would not have permitted easy distinction between ARSACS and other spastic ataxias. Interestingly, all investigated ARSACS patients had sensorimotor peripheral neuropathy, which was often mixed axonal and demyelinating [13], even though one or the other presentation may have appeared more prominent (Table 2). On the other hand, the clinical and paraclinical presentation of one AOA1 family (#7), of the AOA2 family and of the A-T family would have been sufficient to directly orient mutation search in the correct gene without prior SNP analysis [3, 27]. This was not the case for AOA1 family #8, for which patients had a very late onset disease and no motor neuropathy, even after a long disease duration [8], and for family #10. In the latter case, it is not possible to conclude at present whether this is a very atypical form of A-T with normal alpha-fetoprotein serum level [22] due to a mutation in the regulatory or deep intronic sequences (which were not analyzed when mutation scanning was performed) or whether it corresponds to a novel form of ARCA linked to chromosome 11q21-23.

While the use of homozygosity mapping was very effective at pinpointing the correct gene in ARCA kindred, it also revealed that the majority of remaining recessive ataxia cases may be caused by mutations either in the recently identified genes of the less common forms of ARCA, including *MRE11* [23], *TDPI* [26], *POLG1* [28], *twinkle* [18] and *SYNE1* [10, 14], etc.), or more likely in genes yet to be discovered. It is also possible that homozygosity mapping failed at identifying the correct gene either because the patients were compound heterozygous despite consanguinity or because our thresholds for identifying homozygous regions excluded small regions of homozygosity due to inbreeding. This caveat is well illustrated by cases 3 and 4 in family #1. This family was initially excluded from the ARSACS locus by microsatellite linkage analysis (family 14 in ref [5]). Our SNP strategy has led to the identification of the mutation in this family [6]. Homozygosity for the mutation is presumably not explained by the second degree consanguinity of the parents but by inbreeding that relates the mother with her husband's grand-grand-parents (Fig. 2b). This corresponds to the small region of homozygosity around the ARSACS gene in the nephews, not easily identified if those individuals had been studied separately (Fig. 2a). It is predictable that the use of SNP arrays with higher density should circumvent this difficulty.

Our finding that most consanguineous ataxia families segregate with loci not corresponding to known ataxia genes is in agreement with the reported high percentage of ataxia patients from a different series having no causal gene mutation identified [1] and indicates that many new recessive ataxia entities remain to be identified. In most families, identification of novel homozygous regions in

patients with recessively inherited forms of cerebellar ataxia paves the way for the discovery of novel causative genes [2, 15].

Acknowledgments We wish to thank Catherine Dubois d'Enghien for ATM gene sequencing and Mustafa A. Salih for sharing material and information on the families from Saudi Arabia. This study was financially supported by funds from the Institut National de la Santé et de la Recherche Scientifique (INSERM), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), and the Agence Nationale pour la Recherche-Maladies Rares (ANR-05-MRAR-013-01) to M.K., and the E-Rare EUROSPA network (to F.M.S.). D.H–B.B. was supported by the French association “Connaitre les Syndromes Cérébelleux”; M.A. is supported by a BDI fellowship from CNRS; F.F. is a fellow of the Roma Tre University-IRCCS Bambino Gesù Hospital joint PhD programme.

References

- Anheim M, Fleury M, Monga B, Laugel V, Chaigne D, Rodier G, Ginglinger E, Boulay C, Courtois S, Drouot N, Fritsch M, Delaunoy JP, Stoppa-Lyonnet D, Tranchant C, Koenig M (2010) Epidemiological, clinical, paraclinical and molecular study of a cohort of 102 patients affected with autosomal recessive progressive cerebellar ataxia from Alsace, Eastern France: implications for clinical management. *Neurogenetics* 11:1–12
- Assoum M (2010) Rundataxin, a novel protein with RUN and diacylglycerol binding domains, is mutant in a new recessive ataxia. *Brain* 133:2439–2447
- Barbot C, Coutinho P, Chorao R, Ferreira C, Barros J, Fineza I, Dias K, Monteiro J, Guimaraes A, Mendonca P, do Ceu Moreira M, Sequeiros J (2001) Recessive ataxia with ocular apraxia: review of 22 Portuguese patients. *Arch Neurol* 58:201–205
- Ben Hamida M, Belal S, Sirugo G, Ben Hamida C, Panayides K, Ionannou P, Beckmann J, Mandel JL, Hentati F, Koenig M et al (1993) Friedreich's ataxia phenotype not linked to chromosome 9 and associated with selective autosomal recessive vitamin E deficiency in two inbred Tunisian families. *Neurology* 43:2179–2183
- Bouhhal Y, El-Euch-Fayeche G, Amouri R, Hentati F (2005) Distinct phenotypes within autosomal recessive ataxias not linked to already known loci. *Acta Myol* 24:155–161
- Bouhhal Y, El Euch-Fayeche G, Hentati F, Amouri R (2009) A novel SACS gene mutation in a Tunisian family. *J Mol Neurosci* 39:333–336
- Campuzano V, Montermini L, Molto MD, Pianese L, Cossee M, Cavalcanti F, Monros E, Rodius F, Duclos F, Monticelli A, Zara F, Canizares J, Koutnikova H, Bidichandani SI, Gellera C, Brice A, Trouillas P, De Michele G, Filla A, De Frutos R, Palau F, Patel PI, Di Donato S, Mandel JL, Coccozza S, Koenig M, Pandolfo M (1996) Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 271:1423–1427
- Criscuolo C, Mancini P, Menchise V, Sacca F, De Michele G, Banfi S, Filla A (2005) Very late onset in ataxia oculomotor apraxia type I. *Ann Neurol* 57:777
- De Michele G, Coppola G, Coccozza S, Filla A (2004) A pathogenetic classification of hereditary ataxias: is the time ripe? *J Neurol* 251:913–922
- Dupre N, Bouchard JP, Gros-Louis F, Rouleau GA (2007) Mutations in SYNE-1 lead to a newly discovered form of autosomal recessive cerebellar ataxia. *Med Sci (Paris)* 23:261–262
- Engert JC, Berube P, Mercier J, Dore C, Lepage P, Ge B, Bouchard JP, Mathieu J, Melancon SB, Schalling M, Lander ES, Morgan K, Hudson TJ, Richter A (2000) ARSACS, a spastic ataxia common in northeastern Quebec, is caused by mutations in a new gene encoding an 11.5-kb ORF. *Nat Genet* 24:120–125
- Fogel BL, Perlman S (2007) Clinical features and molecular genetics of autosomal recessive cerebellar ataxias. *Lancet Neurol* 6:245–257
- Garcia A, Criscuolo C, de Michele G, Berciano J (2008) Neurophysiological study in a Spanish family with recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Muscle Nerve* 37:107–110
- Gros-Louis F, Dupre N, Dion P, Fox MA, Laurent S, Verreault S, Sanes JR, Bouchard JP, Rouleau GA (2007) Mutations in SYNE1 lead to a newly discovered form of autosomal recessive cerebellar ataxia. *Nat Genet* 39:80–85
- Lagier-Tourenne C, Tazir M, Lopez LC, Quinzii CM, Assoum M, Drouot N, Busso C, Makri S, Ali-Pacha L, Benhassine T, Anheim M, Lynch DR, Thibault C, Plewniak F, Bianchetti L, Tranchant C, Poch O, DiMauro S, Mandel JL, Barros MH, Hirano M, Koenig M (2008) ADCK3, an ancestral kinase, is mutated in a form of recessive ataxia associated with coenzyme Q10 deficiency. *Am J Hum Genet* 82:661–672
- Lagier-Tourenne C, Tranebaerg L, Chaigne D, Gribaa M, Dollfus H, Silvestri G, Betard C, Warter JM, Koenig M (2003) Homozygosity mapping of Marinesco-Sjogren syndrome to 5q31. *Eur J Hum Genet* 11:770–778
- Moreira MC, Klur S, Watanabe M, Nemeth AH, Le Ber I, Moniz JC, Tranchant C, Aubourg P, Tazir M, Schols L, Pandolfo M, Schulz JB, Pouget J, Calvas P, Shizuka-Ikeda M, Shoji M, Tanaka M, Izatt L, Shaw CE, M'Zahem A, Dunne E, Bomont P, Benhassine T, Bouslam N, Stevanin G, Brice A, Guimaraes J, Mendonca P, Barbot C, Coutinho P, Sequeiros J, Durr A, Warter JM, Koenig M (2004) Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2. *Nat Genet* 36:225–227
- Nikali K, Suomalainen A, Saharinen J, Kuokkanen M, Spelbrink JN, Lonqvist T, Peltonen L (2005) Infantile onset spinocerebellar ataxia is caused by recessive mutations in mitochondrial proteins Twinkle and Twinky. *Hum Mol Genet* 14:2981–2990
- Ouahchi K, Arita M, Kayden H, Hentati F, Ben Hamida M, Sokol R, Arai H, Inoue K, Mandel JL, Koenig M (1995) Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the alpha-tocopherol transfer protein. *Nat Genet* 9:141–145
- Ouyang Y, Takiyama Y, Sakoe K, Shimazaki H, Ogawa T, Nagano S, Yamamoto Y, Nakano I (2006) Sacsin-related ataxia (ARSACS): expanding the genotype upstream from the gigantic exon. *Neurology* 66:1103–1104
- Savitsky K, Sfez S, Tagle DA, Ziv Y, Sartiel A, Collins FS, Shiloh Y, Rotman G (1995) The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum Mol Genet* 4:2025–2032
- Stankovic T, Kidd AM, Sutcliffe A, McGuire GM, Robinson P, Weber P, Bedenham T, Bradwell AR, Easton DF, Lennox GG, Haites N, Byrd PJ, Taylor AM (1998) ATM mutations and phenotypes in ataxia-telangiectasia families in the British Isles: expression of mutant ATM and the risk of leukemia, lymphoma, and breast cancer. *Am J Hum Genet* 62:334–345
- Stewart GS, Maser RS, Stankovic T, Bressan DA, Kaplan MI, Jaspers NG, Raams A, Byrd PJ, Petrini JH, Taylor AM (1999) The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* 99:577–587
- Stoetzel C, Laurier V, Davis EE, Muller J, Rix S, Badano JL, Leitch CC, Salem N, Chouery E, Corbani S, Jalk N, Vicaire S, Sarda P, Hamel C, Lacombe D, Holder M, Odent S, Holder S, Brooks AS, Elcioglu NH, Silva ED, Rossillion B, Sigaudy S, de Ravel TJ, Lewis RA, Leheup B, Verloes A, Amati-Bonneau P,

- Megarbane A, Poch O, Bonneau D, Beales PL, Mandel JL, Katsanis N, Dollfus H (2006) BBS10 encodes a vertebrate-specific chaperonin-like protein and is a major BBS locus. *Nat Genet* 38:521–524
25. Stoetzel C, Muller J, Laurier V, Davis EE, Zaghoul NA, Vicaire S, Jacquelin C, Plewniak F, Leitch CC, Sarda P, Hamel C, de Ravel TJ, Lewis RA, Friederich E, Thibault C, Danse JM, Verloes A, Bonneau D, Katsanis N, Poch O, Mandel JL, Dollfus H (2007) Identification of a novel BBS gene (BBS12) highlights the major role of a vertebrate-specific branch of chaperonin-related proteins in Bardet-Biedl syndrome. *Am J Hum Genet* 80:1–11
26. Takashima H, Boerkoel CF, John J, Saifi GM, Salih MA, Armstrong D, Mao Y, Quijcho FA, Roa BB, Nakagawa M, Stockton DW, Lupski JR (2002) Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. *Nat Genet* 32:267–272
27. Taylor AM, Byrd PJ (2005) Molecular pathology of ataxia telangiectasia. *J Clin Pathol* 58:1009–1015
28. Van Goethem G, Martin JJ, Dermaut B, Lofgren A, Wibail A, Ververken D, Tack P, Dehaene I, Van Zandijcke M, Moonen M, Ceuterick C, De Jonghe P, Van Broeckhoven C (2003) Recessive POLG mutations presenting with sensory and ataxic neuropathy in compound heterozygote patients with progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscul Disord* 13:133–142

Chapitre 2 Résultats

Manuscript 2: ADCK3, an Ancestral Kinase, Is Mutated in a Form of Recessive Ataxia Associated with Coenzyme Q10 Deficiency

Manuscript 2: ADCK3, an Ancestral Kinase, Is Mutated in a Form of Recessive Ataxia Associated with Coenzyme Q10 Deficiency

Parmi les familles avec 4 enfants atteints, nous avons étudié une large famille consanguine au deuxième degré d'origine algérienne. L'analyse pangénome par puces de génotypage nous a permis d'identifier une région homozygote unique de 12,6 Mb en 1q41-q42 partagée entre les 4 atteints de cette famille. Cette région a été confirmée par l'analyse de marqueurs microsatellites du père et des frères et sœurs sains (Figure 1 A et B; Manuscrit 2). Nous avons procédé par la suite à l'analyse des gènes candidats positionnels qui s'est avérée très efficace, une mutation ayant été rapidement identifiée dans l'un des gènes codant pour une protéine mitochondriale (ADCK3 ou Aarf domain contain kinase 3). Cette mutation touche le site donneur d'épissage de l'intron 11 du gène *ADCK3* et est responsable d'un épissage aberrant de cet exon résultant en la présence de 3 transcrits anormaux sur RT-PCR (Figure 2; Manuscrit 2). La recherche de mutations a ensuite été entreprise dans les familles ou les cas isolés susceptibles d'être liés à ce locus. Nous avons identifié une délétion homozygote de 19 pb au niveau de l'exon 3 entraînant un décalage du cadre de lecture (c.500_521 del22insTTG) chez un patient algérien issu de parents consanguins (Patient 5, tableau 1). Une autre patiente d'origine algérienne présente une mutation faux-sens Gly549Ser à l'état hétérozygote dans l'exon 14 associée à un changement nucléotidique, également hétérozygote, dans l'exon 8 et ne modifiant pas l'acide aminé (993C>T) (patient 7, tableau 1). L'analyse par RT-PCR du transcrit extrait d'une lignée lymphoblastoïde de cette patiente montre que ce changement nucléotidique est responsable d'un épissage aberrant avec un saut de l'exon 8 et une délétion en phase de 47 acides aminés (p.Lys314_Gln360del) (Figure 2.E ; Manuscrit 2). Cette dernière mutation serait toutefois un polymorphisme rare. L'équipe du Pr. Michio Hirano a pu identifier à l'état hétérozygote composite une mutation faux-sens (Tyr514Cys) et une délétion d'un acide aminé (Thr584del) chez un de leurs patients atteints d'une ataxie avec un déficit en CoQ₁₀ (Patient 6, tableau 1). Les 3 mutations non tronquantes (p.Tyr514Cys; p.Gly549Ser; p.Thr584del) touchent des acides aminés très conservés et se sont avérées pathologiques dans un modèle de levure réalisé par M.H. Barrios (Figure 3 ; Manuscrit 2).

Dans ce syndrome, l'ataxie est une ataxie cérébelleuse pure, modérée, peu évolutive, débutant entre 3 et 11 ans avec une atrophie cérébelleuse à l'IRM (Figure 1.C; Manuscrit 2). L'ataxie peut être associée à des réflexes vifs, des pieds creux, un retard mental modéré et une

intolérance à l'exercice avec des lactates sanguins élevés (Tableau 1). Devant la prédominance des signes cérébelleux, nous avons appelé ce syndrome ARCA2 pour autosomal recessive cerebellar ataxia type 2.

ADCK3 est une protéine mitochondriale possédant des homologues chez *S.cerevisiae* (ABC1/COQ8) et *E.coli* (UbiB) connus pour être impliqués dans la biosynthèse du coenzyme Q₁₀ (CoQ). ADCK3 appartient aussi à une famille conservée de 5 paralogues chez l'homme (ADCK1 à 5). ADCK3 et ADCK4 sont très homologues entre eux et avec ABC1/COQ8. L'homologie avec COQ8 et UbiB explique le déficit de la biosynthèse du CoQ₁₀ dans le cas des mutations d'*ADCK3*. Un déficit modéré en CoQ₁₀ a été mis en évidence chez l'ensemble des patients testés (1 par famille) (Tableau 2; Manuscrit 2). Aucune augmentation compensatrice n'a été observée au niveau de l'expression du paralogue le plus proche d'*ADCK3*, *ADCK4*. Au contraire, l'expression d'*ADCK4* était diminuée et semble corrélée avec les taux de CoQ₁₀ chez les patients ARCA2 puisqu'elle est le plus fortement diminuée chez les patients 5 et 6 possédant les taux les plus bas de CoQ₁₀ (Figure 6).

Tous les membres de cette famille ADCK possèdent des motifs conservés qui correspondent aux motifs I, II, VIb et VII caractérisant le «noyau universel» des kinases (Figure 4.A ; Manuscrit 2). Par contre, les protéines ADCK ne possèdent pas les motifs C-terminaux VIII à XI habituellement retrouvés dans les protéines kinases classiques (Figure 4.B ; Manuscrit 2). L'analyse phylogénétique a confirmé le classement des membres de la famille ADCK parmi ceux de la superfamille des kinases atypiques (Figure S2 supplémentaire ; Manuscrit 2).

En conclusion, une nouvelle protéine mitochondriale ADCK3 s'ajoute à la liste des protéines responsables, quand elles sont mutées, d'ataxie récessive. Les mutations d'*ADCK3* sont responsables d'une forme d'ataxie associée à un déficit modéré en COQ₁₀. Le déficit modéré en CoQ₁₀ et la prédiction d'un domaine kinase atypique suggèrent un rôle indirect régulateur d'*ADCK3* plutôt qu'un rôle enzymatique direct dans la voie de biosynthèse du CoQ₁₀.

ADCK3, an Ancestral Kinase, Is Mutated in a Form of Recessive Ataxia Associated with Coenzyme Q₁₀ Deficiency

Clotilde Lagier-Tourenne,¹ Meriem Tazir,² Luis Carlos López,³ Catarina M. Quinzii,³ Mirna Assoum,¹ Nathalie Drouot,¹ Cleverson Busso,⁴ Samira Makri,⁵ Lamia Ali-Pacha,² Traki Benhassine,⁶ Mathieu Anheim,^{1,7} David R. Lynch,⁸ Christelle Thibault,¹ Frédéric Plewniak,¹ Laurent Bianchetti,¹ Christine Tranchant,⁷ Olivier Poch,¹ Salvatore DiMauro,³ Jean-Louis Mandel,¹ Mario H. Barros,⁴ Michio Hirano,³ and Michel Koenig^{1,*}

Muscle coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀ or ubiquinone) deficiency has been identified in more than 20 patients with presumed autosomal-recessive ataxia. However, mutations in genes required for CoQ₁₀ biosynthetic pathway have been identified only in patients with infantile-onset multisystemic diseases or isolated nephropathy. Our SNP-based genome-wide scan in a large consanguineous family revealed a locus for autosomal-recessive ataxia at chromosome 1q41. The causative mutation is a homozygous splice-site mutation in the *aarF*-domain-containing kinase 3 gene (*ADCK3*). Five additional mutations in *ADCK3* were found in three patients with sporadic ataxia, including one known to have CoQ₁₀ deficiency in muscle. All of the patients have childhood-onset cerebellar ataxia with slow progression, and three of six have mildly elevated lactate levels. *ADCK3* is a mitochondrial protein homologous to the yeast *COQ8* and the bacterial *UbiB* proteins, which are required for CoQ biosynthesis. Three out of four patients tested showed a low endogenous pool of CoQ₁₀ in their fibroblasts or lymphoblasts, and two out of three patients showed impaired ubiquinone synthesis, strongly suggesting that *ADCK3* is also involved in CoQ₁₀ biosynthesis. The deleterious nature of the three identified missense changes was confirmed by the introduction of them at the corresponding positions of the yeast *COQ8* gene. Finally, a phylogenetic analysis shows that *ADCK3* belongs to the family of atypical kinases, which includes phosphoinositide and choline kinases, suggesting that *ADCK3* plays an indirect regulatory role in ubiquinone biosynthesis possibly as part of a feedback loop that regulates ATP production.

Introduction

Recessive ataxias are a heterogeneous group of inherited neurodegenerative disorders that affect the cerebellum or the spinocerebellar and sensory tracts of the spinal cord. Several recessive ataxias, including Friedreich ataxia (FRDA [MIM 229300]), appear to be due to defective mitochondrial proteins. In FRDA and sideroblastic anemia/ataxia (ASAT [MIM 301310]), the defective proteins are involved in iron-sulfur cluster biogenesis, whereas in sensory ataxic neuropathy with dysarthria and ophthalmoparesis (SANDO [MIM 607459]) and in infantile-onset spinocerebellar ataxia (IOSCA [MIM 271245]), the defective proteins control mitochondrial DNA homeostasis.^{1–5} In addition, recently reported forms of recessive ataxia are associated with muscle coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) deficiency^{6,7} [MIM 607426] and might also involve genes encoding mitochondrial proteins because CoQ₁₀ is synthesized in mitochondria. CoQ₁₀ deficiency causes mitochondrial dysfunction because CoQ₁₀ carries electrons from complex I and complex II to complex III in the mitochondrial respiratory chain. Several forms of human coenzyme Q₁₀ deficiencies, all characterized by infantile encephalomyopathy, renal

failure, or both, have recently been attributed to mutations in specific CoQ₁₀ biosynthetic proteins (*COQ2*, *PDSS2*, and *PDSS1*).^{8–10} Given that these were not null mutations, they should allow the production of either partially functional proteins or reduced levels of normal proteins, supporting the view that complete block of CoQ₁₀ synthesis would not be viable.

The genes involved in CoQ (ubiquinone) synthesis were identified by analysis of yeast and bacterial complementation groups of ubiquinone-deficient strains designated *coq1-coq10* and *ubiA-ubiH*, respectively. Most of them (*COQ 1–3*, *COQ 5–7*, *Ubi A*, *COQ E–H*) correspond to specific enzymatic steps of ubiquinone synthesis.^{11,12} Here, we describe the first recessive ataxia due to mutations in a *COQ8-UbiB* homolog, which most likely has an ancestral regulatory, rather than enzymatic, function.

Material and Methods

Subjects

We obtained clinical evaluation, blood samples, and skin biopsies after written informed consent as defined by the local ethics committees of the University Hospital of Alger, Strasbourg, and the

¹Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/Université Louis Pasteur, et Collège de France, Chaire de génétique humaine, 67404 Illkirch, France; Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, F-67000 France; ²Service de Neurologie, Centre Hospitalo-Universitaire Mustapha, Alger 16000, Algeria; ³Department of Neurology, Columbia University Medical Center, New York, NY 10032 USA; ⁴Departamento de Microbiologia - ICB-II - Universidade de São Paulo, 05508-900, São Paulo, SP, Brasil; ⁵Service de Neurologie, Hôpital Ait Idir, Algiers, Algeria; ⁶Institut Pasteur d'Alger, El Hamma, Algiers, Algeria; ⁷Service de Neurologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67091 Strasbourg, France; ⁸Department of Neurology, University of Pennsylvania School of Medicine and Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, PA 19104, USA

*Correspondence: mkoenig@igbmc.u-strasbg.fr

DOI 10.1016/j.ajhg.2007.12.024. ©2008 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved.

Children's Hospital of Philadelphia. Affected individuals from family 1 were referred for autosomal recessive cerebellar ataxia, and DNA testing for Friedreich ataxia and AOA1 mutations was performed prior to linkage analysis. Primary fibroblasts from skin biopsies were obtained from patients 3, 5, and 6, and immortalized lymphoblastoid cell lines were obtained from patients 3, 5, and 7.

Linkage Analysis

Genome-wide homozygosity mapping was performed with the GeneChip Human Mapping 10K 2.0 Xba Array from Affymetrix (Affymetrix, Santa Clara, CA). Sample processing and labeling were performed according to the manufacturer's instructions (Affymetrix Mapping 10K 2.0 Assay Manual, Version 1.0, 2004). Hybridization was performed with a GeneChip Hybridization oven 640, washed with the GeneChip Fluidics Station 450, and scanned with a GeneChip Scanner 3000. Single-nucleotide polymorphism (SNP) allele calls were generated by the GeneChip DNA Analysis Software version 3.0.2 (GDAS). Regions of homozygosity were defined by the presence of more than 25 consecutive homozygous SNPs and analyzed on HomoSNP software developed to visualize shared homozygous regions in consanguineous families (software available on request from plewniak@igbmc.u-strasbg.fr). The region of homozygosity by descent segregating with the disease was further analyzed with highly polymorphic microsatellite markers as described elsewhere.¹³

Mutational Analysis

Mutational analysis was performed by PCR and direct sequencing of the 14 coding exons and the adjacent intronic junctions of human *ADCK3* gene (NM_020247; primers and conditions available on request). PCR products were purified on Montage PCR₉₆ Cleanup Plates (Millipore, Bedford, MA) and used in sequencing reactions with the ABI BigDye Terminator Kit (Applied Biosystems), which were subsequently run on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer. Computational analyses of mutations were carried out with Seqscape 2.5 software (Applied Biosystems). Parental segregation of the identified mutations was investigated in all available family members. *ADCK3* exon 8 and 11 splicing was analyzed by RT-PCR. Total RNA was extracted from primary fibroblasts or immortalized lymphoblastoid cells via Trizol according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). Total RNA was reverse transcribed with the Superscript II kit (Invitrogen). PCR amplification was performed with primers located in exon 10 and exon 15 (forward 5'-CACCTGATTGACGTGCTGAG-3', reverse 5'-ATCTTC TCGGTGGTGCTCTG-3') and in exon 7 and exon 12 (forward 5'-CAACCCACCTGGCTAAG-3', reverse 5'-GGGGTCATAGAA GAAGTTGGA-3'). PCR products were separated on a 2% agarose gel and eluted with the Nucleospin extract II kit (Macherey-Nagel) before sequencing with the PCR forward and reverse primers.

ADCK4 mRNA Expression Analyses

by Quantitative RT-PCR

Relative expression levels of *ADCK4* mRNA were determined by real-time PCR with the LightCycler 480 protocol (Roche Biosciences) and a set of primers located in exon 13 and exon 15 (forward 5'-CGGGAGTTTGGGACAGAGT-3', reverse 5'-CCGACCCAA AGTCGTAAGG-3'). *ADCK4* mRNA expression was normalized to *β-actin* or to *RPLP0* mRNA expression. Data were analyzed with the 2^{-ΔΔCt} method, and values are expressed as the mean of two separate experiments performed in duplicate.

CoQ₁₀ Determination and CoQ₁₀ Biosynthesis Assay

Coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) in both fibroblasts and lymphoblasts (2–3 × 10⁶ cells) was extracted in hexane and measured by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-EQ).^{8,9} An aliquot of the sample was used for protein determination with the BCA protein assay kit (Pierce). The results were expressed in ng of CoQ₁₀/mg-protein. CoQ₁₀ biosynthesis in fibroblasts was measured by incorporation of labeled parahydroxybenzoate (¹⁴C-PHB) (450 Ci/mol).^{8,9} After 48 hr of incubation with ¹⁴C-PHB (0.02 mCi/ml) in the culture medium, radiolabeled CoQ₁₀ was extracted by hexane, isolated by HPLC with a C18 reverse-phase column, and collected and quantified in a scintillation counter. An aliquot of the sample was used for protein determination with the BCA protein assay kit (Pierce). The results were expressed in DPM/mg-protein/day.

Respiratory-Chain Enzyme Activities

To measure the complex activities, fibroblasts were suspended in cold PBS (4–12 × 10⁶ cells) and sonicated for 10 s to disrupt the membranes. An aliquot of the sample was used for protein determination with the BCA protein assay kit (Pierce). Complexes I and III (CI+III) activity was measured by observation of the reduction of cytochrome *c* (cyt *c*) at 550 nm.¹⁴ In brief, 4–12 × 10⁴ cells were incubated at 30°C in a medium containing 10 mM KH₂PO₄ (pH 7.8), 2 mM EDTA, 1 mg/ml BSA, 500 mM KCN, and 100 mM cyt *c*. After 2 min of incubation, the reaction was started by addition of 200 mM NADH, and the increase of absorbance is observed for an additional 2 min. The residual activity in the presence of rotenone (10 mg/ml) was subtracted from total activity. The results were expressed in nmol of reduced cyt *c*/min/mg-protein. Complex IV (or COX) activity was measured by observation of the reduction of cyt *c* at 550 nm.¹⁴ In brief, 8–24 × 10⁴ cells were incubated at 30°C in a medium containing 10 mM KH₂PO₄ (pH 6.5), 0.25 M sucrose, 1 mg/ml BSA, and 0.1% reduced cyt *c*, and the reaction was observed for 3 min. For inhibition of the reaction, 500 mM KCN was used. The results were expressed in nmol of oxidized cyt *c*/min/mg-protein. Citrate synthase (CS) activity was measured after the reduction of 100 mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) at 412 nm (30°C) in the presence of 8–24 × 10⁴ cells, 300 mM acetyl CoA, 10 mM Tris-Cl (pH = 7.5), and 500 mM oxaloacetic acid.¹⁴ The results were expressed in nmol of TNB/min/mg-protein. The results of CI+III and COX activities were normalized to CS activity.

Complexes II and III activity was measured by observation of the reduction of cytochrome *c* at 550 nm.¹⁴ In brief, 4–12 × 10⁴ cells were incubated at 30°C in medium containing 50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH 7.5), 20 mM succinate, 1.5 mM KCN, and 2.5 μM rotenone KCN. After 10 min of incubation, the reaction was started by the addition of 50 μM cyt *c*, and increase of absorbance was observed for 2 min. The results were expressed in nmol of reduced cyt *c*/min/mg-protein and normalized to CS activity.

Complex III activity was measured by observation of the reduction of cytochrome *c* at 550 nm.¹⁴ In brief, 8–24 × 10⁴ cells were incubated at 30°C in a medium containing 25 mM KH₂PO₄ (pH 7.2), 5 mM MgCl₂, 2.5 mg/ml BSA, 50 mg/ml Rotenone, and 15 μM reduced cyt *c*. After 3 min of incubation, the reaction was started by the addition of 350 μM ubiquinol, and the reaction was followed for 2 min. The results were expressed in nmol of oxidized cyt *c*/min/mg-protein and normalized to CS activity.

Phylogenetic Tree and Multiple Alignment

The Uniprot protein-sequence database was searched with ADCK3_HUMAN (647 residues) as a query, and a multiple

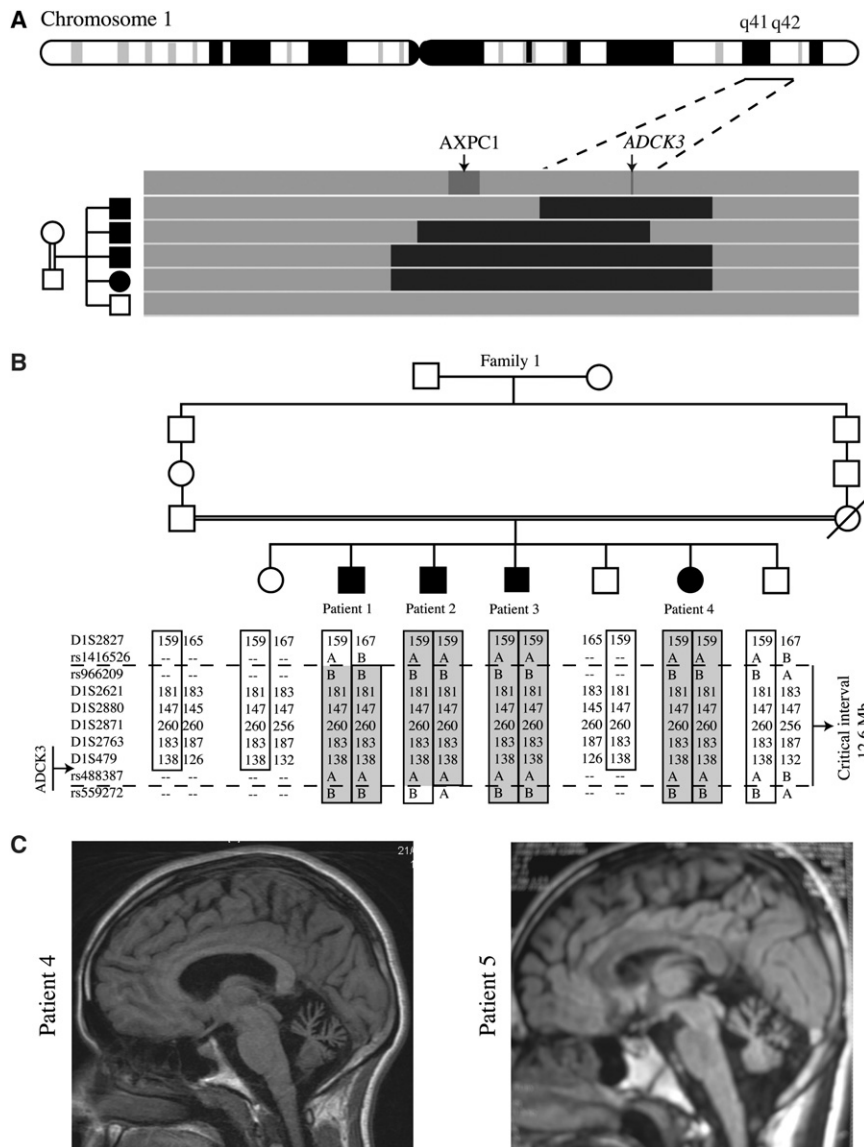


Figure 1. Genotyping and Imaging Results of ARCA2 Families

(A) SNP results of family 1 for the chromosome 1q41-q42 region. Graphic interface (HomoSNP software) for visualization of shared regions of homozygosity in consanguineous families. The top horizontal bar indicates the position of recessive-ataxia loci and genes. Subsequent bars indicate individual results of the children represented on the left. The regions with more than 25 consecutive homozygous SNP are in black. The regions of heterozygosity are in gray. The four affected siblings in family 1 share a region of homozygosity by descent on chromosome 1q41-q42. The AXPC1 locus is centromeric to this region of homozygosity.

(B) Microsatellite analysis at chromosome 1q41-q42 in all available family 1 members. Markers are indicated on the left and are organized from top to bottom in the centromeric to telomeric order. Results of the four critical SNPs that define the two recombination boundaries are also indicated. Parental haplotypes linked with the disease are boxed. The region of homozygosity by descent is shaded in gray. Haplotype segregation confirms linkage between the 1q41-q42 locus and the disease in this family and defines a 12.6 Mb critical interval.

(C) Sagittal T1-weighted brain magnetic resonance imaging of patient 4 (family 1) and patient 5 (family 2) showing cerebellar atrophy and mild cerebral atrophy.

alignment of the detected homologous sequences was constructed with the PipeAlign tool.¹⁵ A structural multiple alignment of the catalytic core domain of representative kinases has been previously proposed,¹⁶ in which six atypical kinases and 25 protein kinases were aligned. For each of the six structurally aligned atypical kinase sequences, we downloaded from the PFAM¹⁷ database seed alignments containing atypical kinase core domains, including 16 sequences of phosphatidylinositol phosphate kinase (PIPK) (PF01504), eight sequences of transient receptor potential (TRP) channel kinase domain (ChaK) (PF02816), 42 sequences of the phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit (PI3K-PI4K) (PF00454), seven sequences of the Actin-fragmin kinase (AFK) (PF09192), and 33 sequences of choline kinase (CKA-2) (PF01633). In addition, we downloaded a PFAM seed alignment of protein kinases (PF00069) containing 54 sequences. All collected seed alignments and the alignment obtained with ADCK3_HUMAN as a query were concatenated and aligned on the basis of known protein-kinase motifs. The resulting multiple alignment of 221 sequences was manually refined in the SeqLab editor (Wisconsin package, Accelrys).

A phylogenetic tree was constructed with the neighbor-joining algorithm implemented in the phylowin program¹⁸ from the

aligned sequences via the global gap-removal option and 500 bootstrap replicates. The iTOL tool¹⁹ was used to generate the phylogenetic tree.

Yeast Experiments

The *coq8* yeast point mutants were created by PCR with specific primers containing the related human mutations. These new yeast *coq8* alleles were then excised and cloned at the HindIII site of Yip352. These constructions were sequenced and the mutations confirmed. The recombinant plasmids were linearized with the internal NcoI site of *URA3*, and the linear fragment was used to transform the yeast strain W303DelCOQ8 by homologous recombination.²⁰ Purified individual transformants, the null mutant, and the wild-type W303-1A (Dr. R. Rothstein, Columbia University) were checked for growth on YPEG (1% yeast extract, 2% peptone, 2% ethanol, 3% glycerol, 2% agar) and YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, 2% agar). Oxygen consumption and peroxide production were measured in yeast spheroplasts, isolated from cells grown on 2% galactose-rich media as described elsewhere.²¹ Exogenous coenzyme Q₆ was added to a final concentration of 15 μ M in YPEG liquid media,²² and growth was monitored by

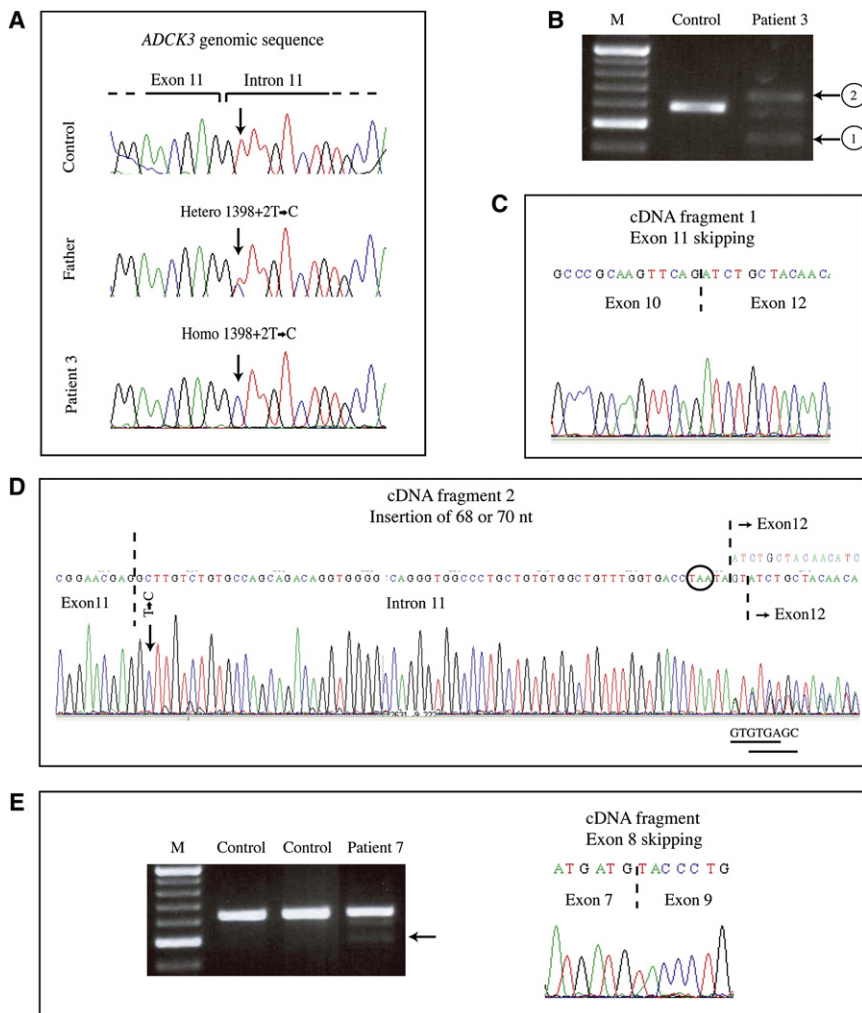


Figure 2. Altered Splicing of *ADCK3* Exon 11 in Family 1 and Exon 8 in Family 4
 (A) Genomic sequence of *ADCK3* exon-intron 11 boundary of a control individual and of the father and patient 3 of family 1. The patient is homozygous for the donor splice-site mutation 1398+2T→C. The healthy father is heterozygous for this mutation.

(B) Analysis of RT-PCR products of patient 3 fibroblasts. The 1398+2T→C mutation affects exon 11 splicing and results in the production of two major bands on agarose gel, of 442 and 654 bp, respectively, and the product obtained from a control individual has a size of 584 bp. A faint band migrating between products 1 and 2 was shown by sequencing to correspond to heteroduplexes of products 1 and 2 (data not shown).

(C) Sequence of product 1 after elution from agarose gel. Product 1 corresponds to skipping of exon 11 leading to a frame-shift with a predicted truncated protein (p.Asp420TrpfsX40).

(D) Sequence of product 2 after elution from agarose gel. Product 2 corresponds to the use of two cryptic splice sites in intron 11 leading to the insertion of 68 and 70 nucleotides (nt), respectively. The sequence of the two alternative products is indicated above the chromatogram. The respective position of the two cryptic donor splice sites is indicated below the chromatogram (underlined). In both cases, 21 amino acids are inserted before an in frame stop codon (circled) leading to a predicted truncated protein (Ile467AlafsX22).

(E) Analysis of RT-PCR products of patient 7 lymphoblastoid cells. The c.993C→T mutation partially affects exon 8 splicing and results in the production of an abnormal product of 487 bp on agarose gel whereas only a normal product of 628 bp is seen in control lymphoblastoid cells. The abnormal product corresponds to skipping of exon 8 leading to an in-frame deletion of 47 amino acids (p.Lys314_Gln360 del). The faint intermediate band was shown by sequencing to correspond to heteroduplexes (data not shown).

absorbance at 600 nm measurements for 10 days, at the end of which samples were taken and plated on YPD to check for possible contamination.

Results

ADCK3 Mutations in ARCA2, a Novel Ataxia Syndrome

We performed linkage studies on a large consanguineous Algerian family with four individuals affected with childhood-onset cerebellar ataxia (family 1). We analyzed the four patients and one healthy sibling with 10K Affymetrix SNP arrays and identified, with a novel display program (Figure 1A), a unique region of homozygosity shared by all affected whereas the healthy sibling was heterozygous. The smallest region of overlap spanned 12.6 Mb on chromosome 1q41-q42 and did not overlap with the posterior

column ataxia and retinitis pigmentosa locus (AXPC1 [MIM 609033]),²³ located immediately centromeric (Figure 1A). The study of a dense set of microsatellite markers from the region in all available members of the family, including the father and two additional healthy siblings, confirmed linkage to the 1q41-42 locus (Figure 1B) with LOD-score calculation yielding a maximum 2-point value of 3.9 (theta = 0). Because four genes encoding mitochondrial proteins are already known to cause recessive ataxia when defective,¹⁻⁴ we prioritized sequencing of genes on the basis of the mitochondrial localization of their encoded products. We found a homozygous donor splice-site mutation (c.1398+2T→C, Figure 2A) in intron 11 of *ADCK3* (NM_020247; aarF-domain-containing kinase 3; also known as *CABC1* [MIM 606980]) that was not present in 480 control chromosomes including 192 of North African origin. We carried out RT-PCR analysis

Table 1. ADCK3 Mutations and Clinical Features in ARCA2 Patients

	Family 1				Family 2	Family 3	Family 4
	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6 ^a	Patient 7
Sex	M	M	M	F	M	M	F
Origin	Algeria	Algeria	Algeria	Algeria	Algeria	USA	France/Algeria
Mutation	Homo c.1398+2T→C	Homo c.1398+2T→C	Homo c.1398+2T→C	Homo c.1398+2T→C	Homo c.500_521 delinsTTG	Hetero c.[1541A→G] + [1750_1752 delACC]	Hetero c.[993C→ T] + [1645G→A]
Location	Intron 11	Intron 11	Intron 11	Intron 11	Exon 3	Exons 13 and 15	Exons 8 and 14
Predicted amino acid change	p.[Asp420Trp fsX40,Ile467 AlafsX22]	p.[Asp420Trp fsX40,Ile467 AlafsX22]	p.[Asp420Trp fsX40,Ile467 AlafsX22]	p.[Asp420Trp fsX40,Ile467 AlafsX22]	p.Gln167 LeufsX36	p.[Tyr514Cys] +[Thr584 del]	p.[Lys314_Gln360 del] + [Gly549Ser]
Age of onset	11	4	7	8	4	5	3
Disease duration	31	34	29	21	14	12	27
Cerebellar ataxia	+	+	+	+	+	+	+
Cerebellar atrophy	+	+	+	+	+	+	NA
Disability stage	3	3	3	3	3	3	3
Exercise intolerance	–	+	+	+	–	NA	NA
Reflexes	Absent ankle jerks	Normal	Brisk	Brisk	Normal	Brisk	Brisk
Hoffmann's sign	–	–	–	+	–	+	–
Babinski sign	–	–	–	–	–	–	–
Pes cavus	+	+	–	+	+	–	+
Mental retardation	–	Mild	–	–	Mild	–	Moderate (IQ: 54)
Lactic acidosis in mmol/l	NA	3.3 (n = 0.5–2.2)	2.9 (n = 0.5–2.2)	1.8–7.8 (n = 0.5–2.2)	1.29 (n = 0.5–2.2)	0.7 (n = 0.5–2.2)	0.98 (n = 1–1.7)
EMG	Normal	Normal	Normal	Normal	Mild axonal neuropathy	NA	Normal
Muscle biopsy	NA	NA	NA	NA	NA	Mild non specific changes	NA
Miscellaneous						Gynecomastia; feet and thumbs in dystonic position	Mild hearing loss

The following abbreviations are used: M, male; F = female; NA, not available; and EMG, electromyography. Disability stage grade 3: moderate, unable to run, limited walking without aid, in a scale from 0 (no signs or symptoms handicap) to 7 (bedridden).

^a Patient 6 is individual 8 in reference ⁶.

of *ADCK3* from fibroblast RNA of patient 3 and found three splice variants expressed from the mutant allele (Figures 2B–2D). In the shorter variant, exon 10 was skipped resulting in a frameshift (p.Asp420TrpfsX40) (Figure 2C). In the other variants, two cryptic splice sites in intron 11 were used, resulting in insertions of 68 and 70 nucleotides, with a stop codon after 21 residues (p.Ile467AlafsX22) (Figure 2D).

Three hundred and fifty-three families with non-Friedreich ataxia were analyzed either by homozygosity mapping at 1q41-q42 or by direct sequencing of *ADCK3* coding exons and flanking sequences. We identified five additional mutations (one single-amino-acid deletion, one truncating mutation, two missense mutations, and a predicted disruption of an SRp55 exonic splice enhancer) in three sporadic cases (Table 1). The three single-amino-acid changes affect conserved residues of the *ADCK3* protein (Figure 3) and were absent from 480 control chromosomes. Their pathogenicity was subsequently confirmed (see below). The nucleotide change in the predicted exonic

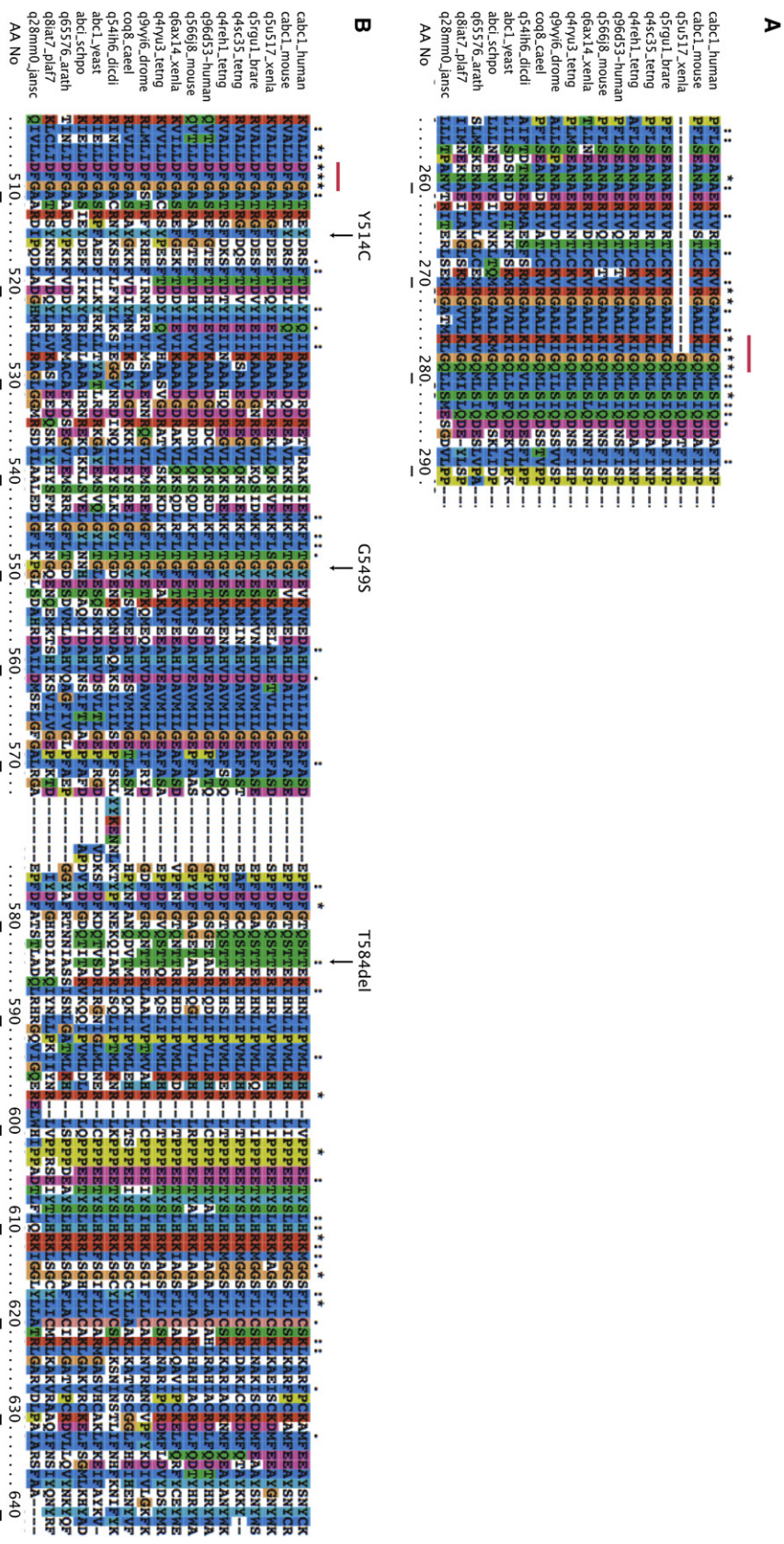
splice enhancer^{24,25} in exon 8 was also absent from 480 control chromosomes, and its consequence was analyzed by RT-PCR from the patient's lymphoblastoid cell line. *ADCK3* transcript analysis revealed an abnormal product corresponding to skipping of exon 8 (Figure 2E) and leading to an in-frame deletion of 47 amino acids (p.Lys314_Gln360 del).

All affected individuals with mutations in *ADCK3* had childhood-onset gait ataxia and cerebellar atrophy (Figure 1C), with slow progression and few associated features (Table 1). Some patients had brisk tendon reflexes and Hoffmann's sign. Three patients had mild psychomotor retardation, and one patient had mild axonal degeneration of the sural nerve. None had renal dysfunction. Exercise intolerance and elevated serum lactate was present in three patients. Because cerebellar ataxia dominates the clinical presentation, we propose to name this entity ARCA2 (autosomal-recessive cerebellar ataxia 2), following the recent identification of ARCA1 [MIM 610743].²⁶

Figure 3. Conservation of Amino Acids Mutated in ARCA2 Patients among ADCK3–ADCK4 Protein Sequences

SPTREMBL accession numbers are indicated on the left. *cabcl1_human* and *q96d53_human* correspond to ADCK3 and ADCK4, respectively. The following abbreviations are used: *Xenla*, *Xenopus laevis*; *brare*, *Brachydanio rerio*; *tetng*, *Tetraodon nigroviridis*; *drome*, *Drosophila melanogaster*; *caeel*, *Caenorhabditis elegans*; *dicdi*, *Dictyostelium discoideum*; *yeast*, *Saccharomyces cerevisiae*; *schpo*, *Schizosaccharomyces pombe*; *arath*, *Arabidopsis thaliana*; *plaf7*, *Plasmodium falciparum*; and *jansc*, *Jannaschia* sp. Amino acid numbering corresponds to human ADCK3. Dots and stars indicate variable degrees of phylogenetic conservation. Conserved amino acids are colored according to amino acid class (ClustalX). The N-terminal motif conserved in all members of the ADCK family (KxGK at positions 276–279) and the kinase motif VII (DFG at positions 507–509) are overlined in red. Nontruncating mutations identified in ARCA2 patients (p.Tyr514Cys, p.Gly549Ser, and p.Thr584 del) are indicated with arrows.

(A) ClustalX sequence alignments of ADCK-specific N-terminal domain.
 (B) ClustalX sequence alignments of ADCK3–ADCK4-specific C-terminal domain.



Coenzyme Q₁₀ Deficiency in ARCA2 Patients
 ADCK3 is a mitochondrial protein²⁷ that has yeast (ABC1/COQ8) and bacterial (UbiB) homologs known to be in-

involved in coenzyme Q (ubiquinone) synthesis on the basis of yeast and bacterial complementation groups of ubiquinone-deficient strains.^{11,22} Patient 6 was previously reported to have marked CoQ₁₀ deficiency in muscle (12.6 μg of CoQ₁₀/g of fresh tissue; normal values 27.6 μg/g ± 4.4);⁶ therefore, identification of ADCK3 mutations in this individual indicated that ADCK3 is also involved in CoQ synthesis in humans. To confirm this result in the absence of muscle biopsies from the other patients, we analyzed CoQ₁₀ levels and synthesis in cultured skin fibroblast or lymphoblastoid cell lines from patients 3, 5, 6, and 7 and found moderate but significant reduction in three (Table 2) and normal level in patient 3. In addition, because CoQ₁₀ is the electron carrier from respiratory complexes I and II to complex III, measuring of the combined activity of these enzymes assesses endogenous pools of CoQ₁₀ in mitochondria. These activities were significantly reduced in

Table 2. Coenzyme Q₁₀ and Respiratory-Chain Enzyme Activities in ARCA2 Patients

	Patient 3	Patient 5	Patient 6	Patient 7	Patient with <i>COQ2</i> Mutations ^a	Patient with <i>PDSS2</i> Mutations ^b	Controls
CoQ ₁₀ levels in fibroblasts (ng/mg-protein)	69.0	36.9 ± 6.5	29.7	NA	24.8 ± 1.0	13.0 ± 1.7	58.5 ± 4.1 n = 15
CoQ ₁₀ levels in lymphoblasts (ng/mg-protein)	68.2	57.9 ± 13.9	NA	48.5 ± 2.9	NA	NA	62.2 ± 2.8, n = 3
CoQ ₁₀ biosynthesis assay in fibroblasts ^c (CoQ ₁₀ DPM/mg-protein/day)	4108 ± 52	2825	2006 ± 15	NA	1349 ± 37	789 ± 22	3569 ± 255, n = 5
CI+CIII/COX	11.82	6.99	7.76	NA	NA	NA	13.86 ± 1.27, n = 3
CI+CIII/CS	6.36	3.70	4.13	NA	NA	NA	8.03 ± 0.67, n = 3
CI+CIII/CS fold increase after addition of CoQ ₂	1.88	2.15	2.47	NA	NA	NA	1.26 ± 0.07, n = 3
CII+CIII/CS	0.46	0.37	0.24	NA	NA	NA	0.46 ± 0.02, n = 2
CIII/CS	0.65	0.83	0.62	NA	NA	NA	0.81 ± 0.18, n = 2

Abnormal values are shown in bold. When experiments were done more than once, values are given as means ± standard error of the mean. The following abbreviations are used: CI, complex I (NADH ubiquinone oxidoreductase); CII, complex II (succinate ubiquinone oxidoreductase); CIII, complex III (ubiquinol cytochrome c oxidoreductase); COX, cytochrome c oxidase; CS, citrate synthase; CoQ₂, coenzyme Q₂ (strong rescue by CoQ₂ is indicative of CoQ deficiency); and DPM, decays per min.

^a This patient with *COQ2* mutations was previously described.⁸

^b This patient with *PDSS2* mutations was previously described.⁹

^c By incorporation of ¹⁴C-PHB (parahydroxybenzoate).

the fibroblasts of patients 5 and 6 and moderately reduced in those of patient 3. Moreover, addition of a short-chain quinone analog increased significantly complexes I+III activity in the fibroblasts of all patient tested, an indirect demonstration of CoQ₁₀ deficiency in these cells (Table 2). *ADCK3* mutations were therefore associated with CoQ₁₀ deficiency, although the defect was very mild in unaffected tissues of ARCA2 patients.

ADCK3 Belongs to a Superfamily of Ancestral Protein and Nonprotein Kinases

ADCK proteins possess the conserved protein-kinase motifs²⁸ corresponding to regions required for ATP binding and for phosphotransfer reaction (the “universal core” consisting of motifs I, II, VIb, and VII) but do not conserve all of the usual kinase motifs (Figure 4A). In order to gain insights on the origin of the ADCK proteins, we analyzed the sequence of 61 prokaryotic and eukaryotic ADCK homologs and compared them to the sequence of 54 protein kinases and 106 atypical kinases. On the basis of the phylogenetic analysis of the “universal core” of the ADCK kinases (Figure 4B, and Figure S2 available online) and of the absence of the classical C-terminal motifs (Figure 4A), we propose that ADCKs belong to the so-called “atypical kinases” of the protein-kinase-like superfamily described by Scheeff and Bourne.¹⁶ This superfamily comprises both nonprotein kinases, such as phosphoinositide and choline kinases, and atypical protein kinases, such as the actin and fragmin kinases (Figure 4B and Figure S2). The ADCK family comprises five paralogs in human (*ADCK1-5*). *ADCK3* and *ADCK4* are highly similar and appear to result from a gene duplication in vertebrates. In contrast, *ADCK1*, 2, and 5 have split from *ADCK3* and 4 very early during evolution because all eukaryotes and several, but not all, gram-negative bacteria possess at least one repre-

sentative of each subgroup (Figure S2). Yeast *ABC1/Coq8* is the ortholog of *ADCK3* and 4, whereas bacterial *UbiB* is more similar to the *ADCK1-ADCK5* subgroup. The “universal core” of ADCKs comprises a highly conserved lysine that binds the alpha phosphate and two highly conserved aspartates that bind the magnesium ions chelated by ATP. Interestingly, the p.Tyr514Cys mutation in patient 6 is located immediately after the second aspartate (DFG motif or motif VII, Figure 4A), strongly supporting a pathogenic effect of this amino acid change. The p.Gly549Ser is located outside the “universal core” but is highly conserved among members of the *ADCK3/ADCK4* subgroup (Figure 3), also supporting a pathogenic effect of the p.Gly549Ser change in patient 7. Gly549 is part of a C-terminal highly conserved segment, which is divergent not only from the classical protein-kinase domain, but also among the different subgroups of the ADCK family (Figure 4B and Figure S2), suggesting that proteins from each subgroup support a distinct function. On the other hand, all ADCK proteins share a common N-terminal domain (with invariable residues Lys276, Glu278, and Gln279; Figures 3 and 4A), which is absent from all other protein and nonprotein kinases and appears specifically related with ubiquinone metabolism.

Nontruncating Mutations Introduced in the Yeast *ADCK3* Homolog Result in Impaired Respiration

For assessment of their pathogenicity, the three mutations resulting in single-amino-acid change (p.Tyr514Cys; p.Gly549Ser; and p.Thr584 del) were introduced on the yeast *coq8* mutant background. Yeast *coq* mutants grow on glucose but display impaired growth on nonfermentable carbon source (ethanol and glycerol), indicating a defect in respiration that can be rescued by exogenous CoQ₆ supplementation.²² They produce high levels of H₂O₂

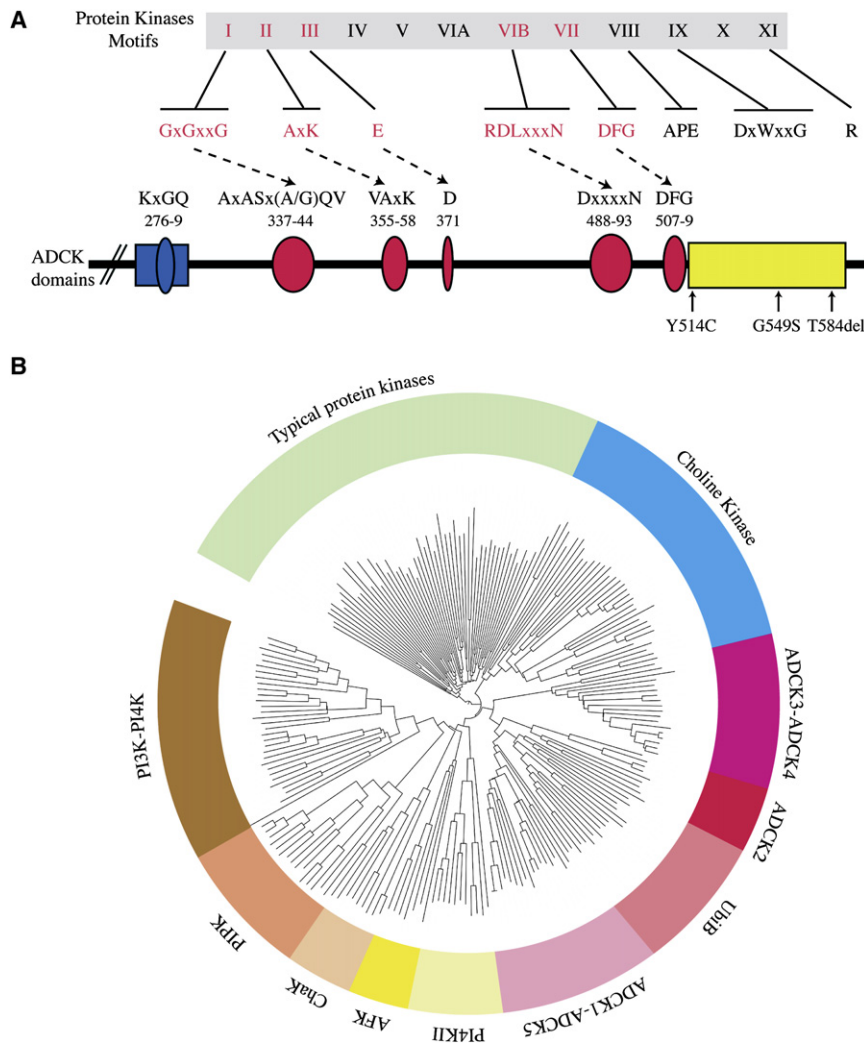


Figure 4. Domain Organization and Phylogeny of ADCK Proteins

(A) Motif conservation in typical protein kinases and in ADCK proteins. Consensus of the eight most conserved motifs of the typical protein kinases are indicated on top. Motifs that share homology with ADCKs motifs are indicated in red. Consensus of ADCK motifs are indicated below, with amino acid positions corresponding to human ADCK3. ADCK domains are depicted on the diagram as follows: blue rectangle, N-terminal domain conserved among all members of the ADCK family and containing the KxGQ motif; red ovals, the position of the conserved kinase motifs; yellow rectangle, C-terminal domain specific for each ADCK subgroups. The position of single-amino-acid changes found in ARCA2 patients is indicated at the bottom. (B) Phylogenetic tree of typical and atypical protein kinases. Typical protein kinases are clustered in a single group. ADCK proteins are clustered in four groups. The UbiB group corresponds to the bacterial ADCKs and to the chloroplastic bacterial-like ADCKs. The following abbreviations are used: PI4KII, phosphatidylinositol 4 kinase type 2; AFK, actin-fragmin kinase; ChaK, TRP channel kinase; PIPK, Phosphatidylinositol Phosphate Kinase; and PI3K-PI4K, phosphatidylinositol 3 and 4 kinases and related protein kinases.

and display impaired oxygen consumption. The corresponding missense changes and single-amino-acid deletion (Phe372Cys, Gly407Ser, and Ser444del) were introduced into a yeast *COQ8* expression plasmid by site-directed mutagenesis. Transformation of yeast *Delcoq8* by mutant plasmids failed to restore growth on selective respiratory medium, whereas the wild-type sequence did, confirming the deleterious nature of the mutations (Figure 5A). Interestingly, replacement of Phe372 by the homologous human amino acid Tyr (corresponding to Tyr514) in the expression plasmid resulted in rescue when transfected in the *Delcoq8* mutant (Figure 5A), indicating that these two aromatic residues are interchangeable, a view also supported by their equal occurrence during evolution at this position (Figure 3). Moreover, oxygen consumption, H₂O₂ production, and rescue by exogenous CoQ₆ were similar in *Delcoq8* mutants and *Delcoq8* yeast transformed with plasmids carrying the deleterious missense mutations (Figures 5B–5D). However, rescue by exogenous CoQ₆ was not as efficient in *coq8* mutants as in *coq7* or *coq2* mutants (Figure 5D), which are directly impaired in ubiquinone synthesis.

Reduced Expression of the ADCK4 Paralog Correlates with CoQ₁₀ Deficiency in Fibroblasts

In order to test whether compensatory mechanisms regulate *ADCK4* expression in the case of *ADCK3* deficiency, we compared *ADCK4* mRNA expression by quantitative RT-PCR in three patient fibroblasts and in four control fibroblasts. *ADCK4* mRNA level was normal in patient 3 but, paradoxically, was mildly decreased in patients 5 and 6 (Figure 6). Because patient 3 fibroblasts had normal CoQ₁₀ levels and only moderately reduced complexes I+III activity compared to fibroblasts of patients 5 and 6 (Table 2), it appears that transcriptional downregulation of *ADCK4* parallels CoQ₁₀ levels in patient fibroblasts. The results suggest that *ADCK4*, the closest paralog of *ADCK3*, might also be involved in regulation of CoQ₁₀ synthesis. Further studies are needed to validate this observation and assess its relevance in affected tissues.

Discussion

Familial cerebellar ataxia associated with muscle CoQ₁₀ deficiency was first reported in 2001.²⁹ Genes coding for

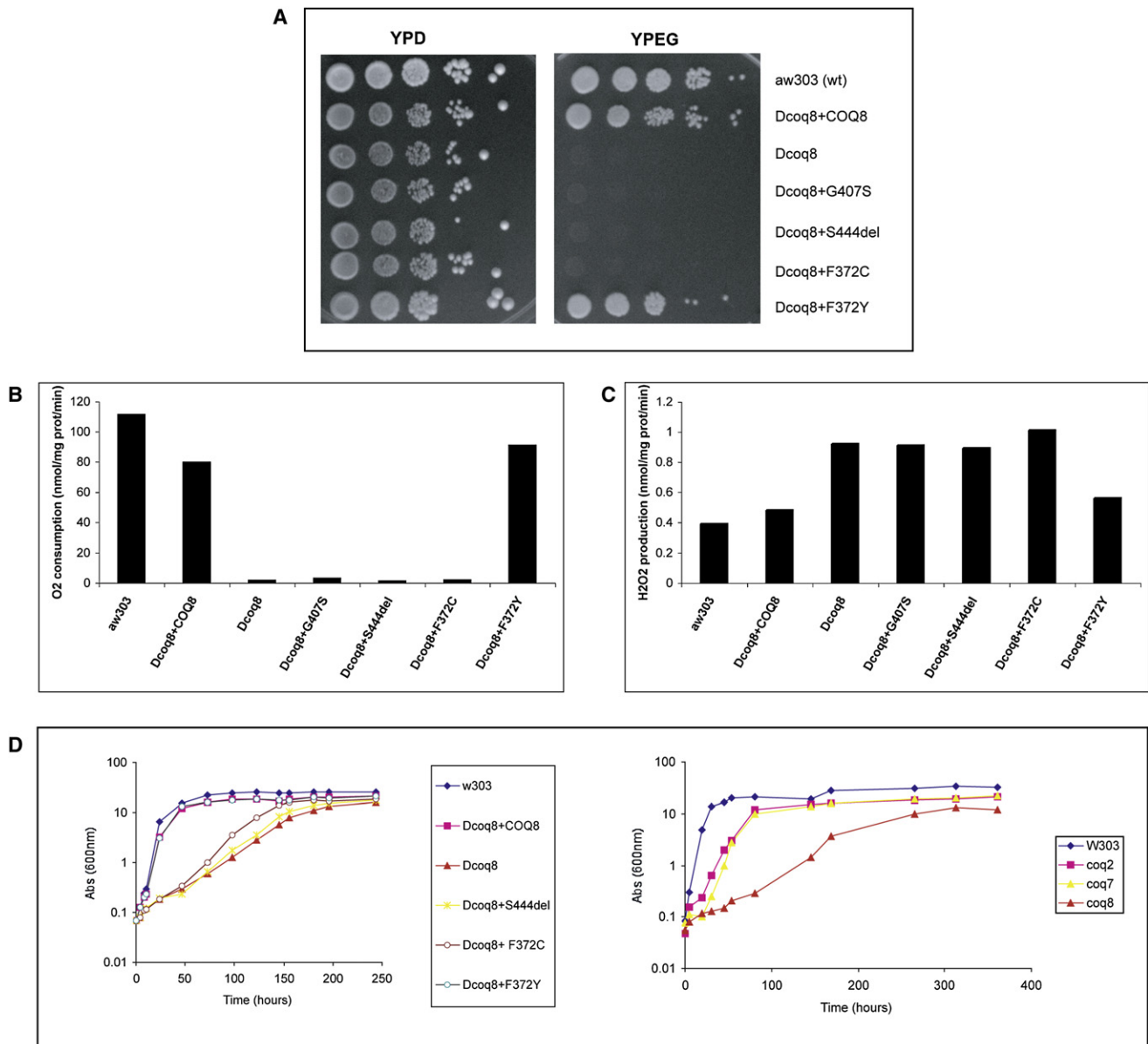


Figure 5. *Coq8* Null Yeast Phenotype Was Not Rescued by Transfection with Plasmids Carrying the Nontruncating Mutations Identified in ARCA2 Patients

(A) Serial dilutions of the wild-type AW303, the *coq8* null mutant (*Dcoq8* = *Delcoq8*), and the mutant transformed with yeast wild-type *COQ8* or with yeast *coq8* nontruncating mutations were spotted on rich glucose (YPD) and rich ethanol/glycerol (YPEG) plates. Growth on nonfermentable carbon source (YPEG) was not restored by mutant *coq8* but was rescued by the wild-type sequence and by the F372Y construct corresponding to the replacement of F372 by the homologous human amino acid (Y at the human position 514).

(B) Oxygen consumption is impaired in *coq8* null mutant (*Dcoq8*) and in *Dcoq8* yeast transformed with plasmids carrying the deleterious mutations.

(C) H₂O₂ production is elevated in *coq8*-deficient strains. Impaired oxygen consumption and increased H₂O₂ production are indicative of respiratory-chain dysfunction.

(D) Exogenous coenzyme Q (CoQ₆) respiratory-growth rescue. Rescue was similar in *Dcoq8* strain and in *Dcoq8* yeast transformed with mutated plasmids and was less efficient than rescue of *coq7* and *coq2* yeast mutants.

enzymes involved in CoQ synthesis were candidates for this new form of ataxia. These genes have been identified by analysis of yeast and bacterial complementation groups of ubiquinone-deficient strains designated *coq1-coq10* and *ubiA-ubiH*, respectively; all have at least one homolog in humans, supporting the concept that CoQ

synthesis is a conserved pathway in all species. However, the first human mutations reported in genes encoding CoQ biosynthetic enzymes (PDSS1 and PDSS2 corresponding to COQ1 and COQ2, catalyzing the first two specific steps of CoQ synthesis) were identified in patients with severe infantile-onset encephalomyopathy,

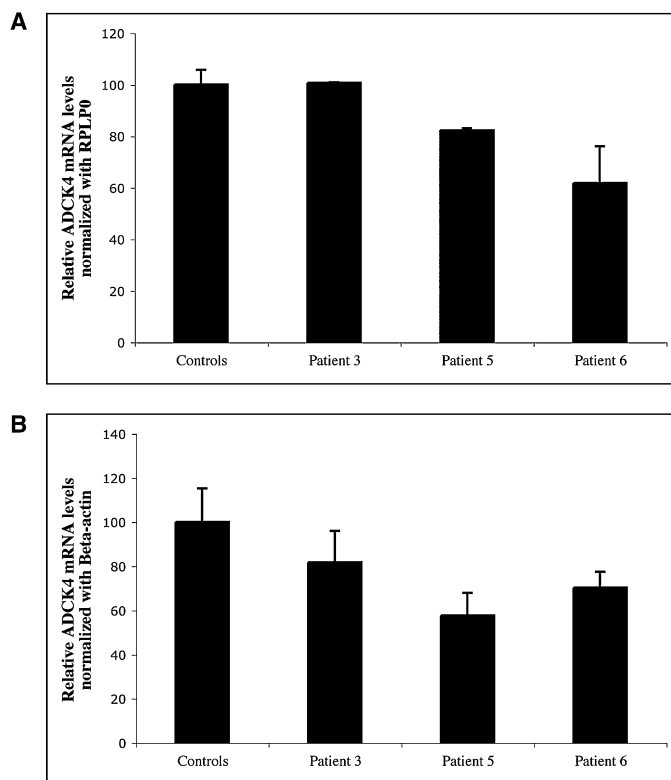


Figure 6. Absence of ADCK4 Induction in ADCK3-Deficient Fibroblasts

ADCK4 mRNA levels in control fibroblasts (n = 4) and in patients 3, 5, and 6 fibroblasts were measured by quantitative real-time PCR. Expression levels of ADCK4 in patients 5 and 6 were slightly reduced. This slight reduction was not dependent on the type of housekeeping reference RNA used: (A) RPLP0 (ribosomal protein P0); (B) β -actin. Graphs represent means \pm standard deviation (SD) of two independent experiments performed in duplicates.

renal failure, or both,^{8–10} suggesting that direct impairment of CoQ₁₀ synthesis might not be associated with the milder forms of cerebellar ataxia. In fact, muscle CoQ₁₀ deficiency was found in some patients with ataxia with ocular apraxia type 1³⁰ (AOA1 [MIM 208920]), which thus became the first form of genetically defined ataxia to be associated with partial ubiquinone deficiency.³¹ The relationship between aprataxin, the nuclear protein defective in AOA1, and muscle CoQ₁₀ deficiency is not known. To our knowledge, our identification of mutations in ADCK3, homologous to yeast COQ8 and to bacterial UbiB, documents for the first time that the defect of a mitochondrial protein involved in CoQ₁₀ synthesis can cause an almost pure form of autosomal-recessive cerebellar ataxia, which we named ARCA2. ARCA2 patients may be distinguished from other recessive ataxias by the presence of cerebellar atrophy with history of exercise intolerance in childhood and elevated serum lactate at rest or after moderate exercise. After excluding the index family, ARCA2 appears to be a rare cause of ataxia among European, U.S., and North African patients. The fact that we found ADCK3 mutations in a patient with previously reported muscle CoQ₁₀ deficiency⁶ and the fact that other ARCA2 patients had moderate CoQ₁₀ deficiency in their fibroblast or lymphoblastoid cell lines suggest that ADCK3 is involved in CoQ synthesis, supporting the view that ADCK3, COQ8, and UbiB are functional homologs. CoQ₁₀ deficiency in ARCA2 patients raises the possibility of supplementation therapy. So far, only one patient (patient 6)⁶ has been treated with

doses of CoQ₁₀ from 60 to 700 mg/day over 8 yr. The patient reported mild subjective improvement, and stabilization of the cerebellar ataxia was observed on examination. In three families, the identification of ADCK3 mutations was made solely on the basis of the ataxic phenotype and without knowledge of muscle CoQ₁₀ level, indicating that ARCA2 corresponds to a homogeneous syndrome, distinct from syndromes due to direct enzymatic block of CoQ₁₀ synthesis. The milder presentation of ARCA2 patients compared to patients with enzymatic block of CoQ₁₀ synthesis might be explained both by the redundancy of ADCK members in the human genome and by an indirect role of ADCK3 in CoQ₁₀ synthesis.

An indirect, regulatory role is supported by the similarity of the ADCKs with members of the superfamily of the atypical kinases. This finding leaves open the possibility that ADCK substrates might be protein or nonprotein molecules, making their identification an even more difficult task. The indirect role of ADCKs in CoQ synthesis is also supported by the delayed rescue by exogenous CoQ₆ of the yeast mutant strain *abc1/coq8*, compared to rescue of the *coq2* or *coq7* mutants, which are defective in *para*-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase and 5-demethoxyubiquinol hydroxylase, respectively.^{32,33} The delayed rescue of the *abc1/coq8* mutants compared to *coq2* or *coq7* mutants suggests that ABC1/COQ8 may also act downstream of CoQ production and may regulate additional pathways. Given the central role of CoQ in ATP synthesis, it is tempting to speculate that ADCKs regulate CoQ synthesis by phosphorylating substrates as part of a feedback loop that controls the level of ATP produced. In support of this hypothesis, it was observed that overexpression of ABC1/COQ8 has the ability to rescue other *coq* mutants. Indeed, overexpression of ABC1/COQ8 rescued the growth of *coq10* mutant by doubling the amount of mitochondrial coenzyme Q,³⁴ and it also suppressed a missense mutant of *coq9*.³⁵ Furthermore, in *coq* mutants there is global depletion of COQ3, COQ4, COQ6, COQ7, and COQ9, which appear to be part of a protein complex,^{20,36} but not of COQ8, indicating that it is not part of the complex but affects its stability.³⁶ Despite the independent identification of aarF-domain-containing kinases (ADCKs) in 1998,^{28,37} their substrates have remained elusive. The identification of

mutations in one ADCK member in cerebellar ataxia patients will certainly stimulate research on this family of ancestral kinases, in order to decipher the corresponding regulatory network and its relation with CoQ biosynthesis.

Supplemental Data

Two figures can be found with this article online at <http://www.ajhg.org/>.

Acknowledgments

We are indebted to H. Puccio, S. Schmucker, L. Reutenauer, C. Grussenmeyer, S. Didaoui, and Adolfo T. Barbosa for advice and technical help. We wish to thank D. H'mida for support and fruitful discussions, A. Mota and E.G. Nobrega (Genomas UNIVAP laboratory) for technical help, S. Vicaire and I. Colas for DNA sequencing, B. Heller (IGBMC) and I. Bezier (Genethon, Evry) for cell-culture assistance, and Catherine Clarke (University of California) for yeast strains. This study was supported by funds from the Agence Nationale pour la Recherche-Maladies Rares (ANR-MRAR) to M.K; the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Centre National de la Recherche Scientifique, and the College de France (J-L.M.); the FAPESP (M.H.B); National Institutes of Health grants NS11766 and HD32062 (M.H); the Ministerio de Education y Ciencia from Spain (L.C.L); and the Muscle Dystrophy Association (C.M.Q).

Received: October 19, 2007

Revised: December 15, 2007

Accepted: December 28, 2007

Published online: March 6, 2008

Web Resources

The URLs for data presented herein are as follows:

Ensembl Genome Browser, <http://www.ensembl.org/index.html>
Exonic splicing enhancers Finder (ESEFinder), <http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/efinder.cgi?process=home>
Genebank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>
Interactive Tree of Life (ITOL), <http://itol.embl.de/index.shtml>
Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>
UCSC Genome Browser, <http://www.genome.ucsc.edu>

References

1. Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M.D., Pianese, L., Cossee, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., et al. (1996). Friedreich's ataxia: Autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 271, 1423–1427.
2. Allikmets, R., Raskind, W.H., Hutchinson, A., Schueck, N.D., Dean, M., and Koeller, D.M. (1999). Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A). *Hum. Mol. Genet.* 8, 743–749.
3. Nikali, K., Suomalainen, A., Saharinen, J., Kuokkanen, M., Spelbrink, J.N., Lonnqvist, T., and Peltonen, L. (2005). Infantile onset spinocerebellar ataxia is caused by recessive muta-

- tions in mitochondrial proteins Twinkle and Twinky. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2981–2990.
4. Van Goethem, G., Martin, J.J., Dermaut, B., Lofgren, A., Wibail, A., Ververken, D., Tack, P., Dehaene, I., Van Zandijcke, M., Moonen, M., et al. (2003). Recessive POLG mutations presenting with sensory and ataxic neuropathy in compound heterozygote patients with progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscul. Disord.* 13, 133–142.
5. Winterthun, S., Ferrari, G., He, L., Taylor, R.W., Zeviani, M., Turnbull, D.M., Engelsens, B.A., Moen, G., and Bindoff, L.A. (2005). Autosomal recessive mitochondrial ataxic syndrome due to mitochondrial polymerase gamma mutations. *Neurology* 64, 1204–1208.
6. Lamperti, C., Naini, A., Hirano, M., De Vivo, D.C., Bertini, E., Servidei, S., Valeriani, M., Lynch, D., Banwell, B., Berg, M., et al. (2003). Cerebellar ataxia and coenzyme Q10 deficiency. *Neurology* 60, 1206–1208.
7. Aure, K., Benoist, J.F., Ogier de Baulny, H., Romero, N.B., Rigal, O., and Lomès, A. (2004). Progression despite replacement of a myopathic form of coenzyme Q10 defect. *Neurology* 63, 727–729.
8. Quinzii, C., Naini, A., Salviati, L., Trevisson, E., Navas, P., Dimauro, S., and Hirano, M. (2006). A mutation in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2) causes primary coenzyme Q10 deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 78, 345–349.
9. Lopez, L.C., Schuelke, M., Quinzii, C.M., Kanki, T., Rodenburg, R.J., Naini, A., Dimauro, S., and Hirano, M. (2006). Leigh syndrome with nephropathy and CoQ10 deficiency due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) mutations. *Am. J. Hum. Genet.* 79, 1125–1129.
10. Mollet, J., Giurgea, I., Schlemmer, D., Dallner, G., Chretien, D., Delahodde, A., Bacq, D., de Lonlay, P., Munnich, A., and Rotig, A. (2007). Prenyldiphosphate synthase, subunit 1 (PDSS1) and OH-benzoate polyprenyltransferase (COQ2) mutations in ubiquinone deficiency and oxidative phosphorylation disorders. *J. Clin. Invest.* 117, 765–772.
11. Poon, W.W., Davis, D.E., Ha, H.T., Jonassen, T., Rather, P.N., and Clarke, C.F. (2000). Identification of Escherichia coli ubiB, a gene required for the first monooxygenase step in ubiquinone biosynthesis. *J. Bacteriol.* 182, 5139–5146.
12. Tran, U.C., and Clarke, C.F. (2007). Endogenous synthesis of coenzyme Q in eukaryotes. *Mitochondrion Suppl.* 7, S62–S71.
13. Lagier-Tourenne, C., Tranebaerg, L., Chaigne, D., Gribaa, M., Dollfus, H., Silvestri, G., Betard, C., Warter, J.M., and Koenig, M. (2003). Homozygosity mapping of Marinesco-Sjogren syndrome to 5q31. *Eur. J. Hum. Genet.* 11, 770–778.
14. Barrientos, A. (2002). In vivo and in organello assessment of OXPHOS activities. *Methods* 26, 307–316.
15. Plewniak, F., Bianchetti, L., Breliet, Y., Carles, A., Chalmel, F., Lecompte, O., Mochel, T., Moulinier, L., Muller, A., Muller, J., et al. (2003). PipeAlign: A new toolkit for protein family analysis. *Nucleic Acids Res.* 31, 3829–3832.
16. Scheeff, E.D., and Bourne, P.E. (2005). Structural evolution of the protein kinase-like superfamily. *PLoS Comput Biol* 1, e49.
17. Finn, R.D., Mistry, J., Schuster-Bockler, B., Griffiths-Jones, S., Hollich, V., Lassmann, T., Moxon, S., Marshall, M., Khanna, A., Durbin, R., et al. (2006). Pfam: Clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res.* 34, D247–D251.
18. Galtier, N., Gouy, M., and Gautier, C. (1996). SEAVIEW and PHYLO_WIN: Two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Appl. Biosci.* 12, 543–548.

19. Letunic, I., and Bork, P. (2007). Interactive Tree Of Life (iTOL): An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* 23, 127–128.
20. Hsu, A.Y., Do, T.Q., Lee, P.T., and Clarke, C.F. (2000). Genetic evidence for a multi-subunit complex in the O-methyltransferase steps of coenzyme Q biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1484, 287–297.
21. Tahara, E.B., Barros, M.H., Oliveira, G.A., Netto, L.E., and Kowaltowski, A.J. (2007). Dihydrolipoyl dehydrogenase as a source of reactive oxygen species inhibited by caloric restriction and involved in *Saccharomyces cerevisiae* aging. *FASEB J.* 21, 274–283.
22. Do, T.Q., Hsu, A.Y., Jonassen, T., Lee, P.T., and Clarke, C.F. (2001). A defect in coenzyme Q biosynthesis is responsible for the respiratory deficiency in *Saccharomyces cerevisiae* abc1 mutants. *J. Biol. Chem.* 276, 18161–18168.
23. Higgins, J.J., Morton, D.H., and Loveless, J.M. (1999). Posterior column ataxia with retinitis pigmentosa (AXPC1) maps to chromosome 1q31-q32. *Neurology* 52, 146–150.
24. Cartegni, L., Wang, J., Zhu, Z., Zhang, M.Q., and Krainer, A.R. (2003). ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res.* 31, 3568–3571.
25. Smith, P.J., Zhang, C., Wang, J., Chew, S.L., Zhang, M.Q., and Krainer, A.R. (2006). An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. *Hum. Mol. Genet.* 15, 2490–2508.
26. Gros-Louis, F., Dupre, N., Dion, P., Fox, M.A., Laurent, S., Verreault, S., Sanes, J.R., Bouchard, J.P., and Rouleau, G.A. (2007). Mutations in SYNE1 lead to a newly discovered form of autosomal recessive cerebellar ataxia. *Nat. Genet.* 39, 80–85.
27. Iizumi, M., Arakawa, H., Mori, T., Ando, A., and Nakamura, Y. (2002). Isolation of a novel gene, CAB1, encoding a mitochondrial protein that is highly homologous to yeast activity of bc1 complex. *Cancer Res.* 62, 1246–1250.
28. Leonard, C.J., Aravind, L., and Koonin, E.V. (1998). Novel families of putative protein kinases in bacteria and archaea: Evolution of the “eukaryotic” protein kinase superfamily. *Genome Res.* 8, 1038–1047.
29. Musumeci, O., Naini, A., Slonim, A.E., Skavin, N., Hadjigeorgiou, G.L., Krawiecki, N., Weissman, B.M., Tsao, C.Y., Mendell, J.R., Shanske, S., et al. (2001). Familial cerebellar ataxia with muscle coenzyme Q10 deficiency. *Neurology* 56, 849–855.
30. Le Ber, I., Dubourg, O., Benoist, J.F., Jardel, C., Mochel, F., Koenig, M., Brice, A., Lombes, A., and Durr, A. (2007). Muscle coenzyme Q10 deficiencies in ataxia with oculomotor apraxia 1. *Neurology* 68, 295–297.
31. Quinzii, C.M., Kattah, A.G., Naini, A., Akman, H.O., Mootha, V.K., DiMauro, S., and Hirano, M. (2005). Coenzyme Q deficiency and cerebellar ataxia associated with an aprataxin mutation. *Neurology* 64, 539–541.
32. Ashby, M.N., Kutsunai, S.Y., Ackerman, S., Tzagoloff, A., and Edwards, P.A. (1992). COQ2 is a candidate for the structural gene encoding para-hydroxybenzoate:polyprenyltransferase. *J. Biol. Chem.* 267, 4128–4136.
33. Marbois, B.N., and Clarke, C.F. (1996). The COQ7 gene encodes a protein in *saccharomyces cerevisiae* necessary for ubiquinone biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 271, 2995–3004.
34. Barros, M.H., Johnson, A., Gin, P., Marbois, B.N., Clarke, C.F., and Tzagoloff, A. (2005). The *Saccharomyces cerevisiae* COQ10 gene encodes a START domain protein required for function of coenzyme Q in respiration. *J. Biol. Chem.* 280, 42627–42635.
35. Johnson, A., Gin, P., Marbois, B.N., Hsieh, E.J., Wu, M., Barros, M.H., Clarke, C.F., and Tzagoloff, A. (2005). COQ9, a new gene required for the biosynthesis of coenzyme Q in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 280, 31397–31404.
36. Hsieh, E.J., Gin, P., Gulmezian, M., Tran, U.C., Saiki, R., Marbois, B.N., and Clarke, C.F. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* Coq9 polypeptide is a subunit of the mitochondrial coenzyme Q biosynthetic complex. *Arch. Biochem. Biophys.* 463, 19–26.
37. Macinga, D.R., Cook, G.M., Poole, R.K., and Rather, P.N. (1998). Identification and characterization of aarF, a locus required for production of ubiquinone in *Providencia stuartii* and *Escherichia coli* and for expression of 2'-N-acetyltransferase in *P. stuartii*. *J. Bacteriol.* 180, 128–135.

Supplemental Data

ADCK3, an Ancestral Kinase, Is Mutated in a Form of Recessive Ataxia Associated with Coenzyme Q₁₀ Deficiency

Clotilde Lagier-Tourenne, Meriem Tazir, Luis Carlos López, Catarina M. Quinzii, Mirna Assoum, Nathalie Drouot, Cleverson Busso, Samira Makri, Lamia Ali-Pacha, Traki Benhassine, Mathieu Anheim, David R. Lynch, Christelle Thibault, Frédéric Plewniak, Laurent Bianchetti, Christine Tranchant, Olivier Poch, Salvatore DiMauro, Jean-Louis Mandel, Mario H. Barros, Michio Hirano, and Michel Koenig

Figure S1. Genotyping Results of the Genome-wide Scan in Family 1



Figure S1. Genotyping Results of the Genome-wide Scan in Family 1

The graphic interface (HomoSNP software) reveals shared regions of homozygosity in this consanguineous family. Each panel represents the result of one chromosome indicated on the left of the top bar. Chromosome pter to qter orientation is represented from left to right. Position of known recessive-ataxia genes is indicated by vertical lines on the top bar of each panel. The following bars indicate individual results of the children represented on the left. The regions with more than 25 consecutive homozygous SNPs are in dark blue. The four affected siblings share a region of homozygosity by descent on chromosome 1q41-q42. We have verified that the shared region of homozygosity on 3p is due to homozygosity of the mother who has transmitted one haplotype to patients 1 and 3 and another haplotype to patients 2 and 4.

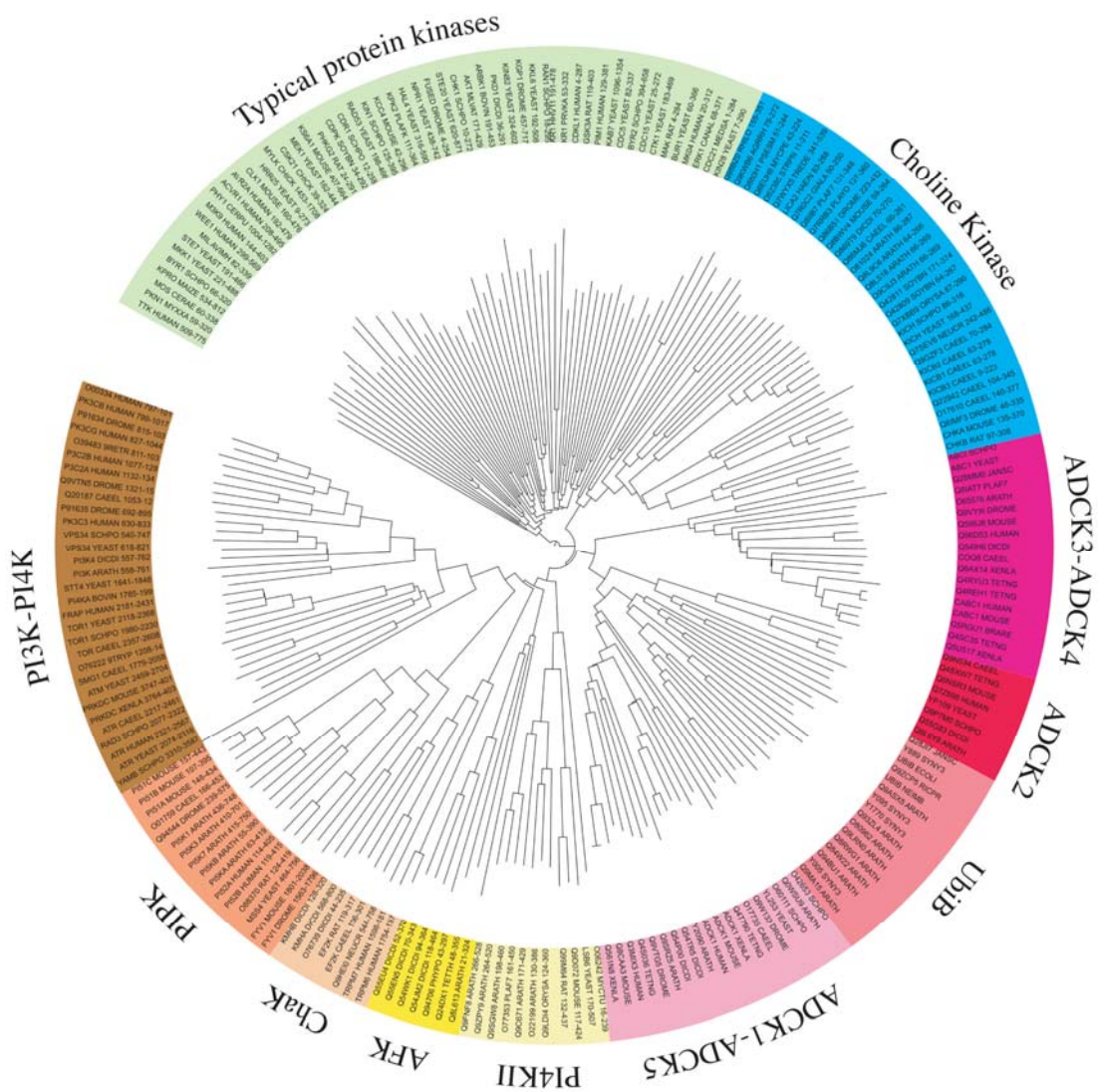


Figure S2. Phylogenetic Tree of Typical and Atypical Protein Kinases

Enlargement of Figure 3B showing SPTREMBL accession numbers. For the non-ADCK proteins, the amino acid position of the kinase “core domain” used for sequence alignment is also indicated. The human ADCKs are as follows: ADCK1 = ADCK1, ADCK2 = Q7Z695, ADCK3 = CAB31, ADCK4 = Q96D53, ADCK5 = Q3MIX3. The *S. cerevisiae* (yeast) ADCKs are as follows: ADCK1-5-like = YL253, ADCK2-like = YP109, ADCK3-4-like = ABC1. The *Jannaschia* sp. (gram-negative bacteria) ADCKs are as follows: ADCK1-5 like = Q28J17, ADCK3-4-like = Q28MM0. Several other alpha-, beta-, and gamma-proteobacteria (gram-negative bacteria) also had one representative of each subgroup (ADCK1-5 and ADCK3-4; not shown).

Chapitre 3 Résultats

A- Manuscript 3: Mutations in ABHD12 Cause the Neurodegenerative Disease PHARC: An Inborn Error of Endocannabinoid Metabolism

B- Manuscript 4: Targeted next generation sequencing of a 12.5 Mb homozygous region reveals mutations in the ANO10 gene in patients with autosomal recessive cerebellar ataxia

A. Manuscript 3: Mutations in ABHD12 Cause the Neurodegenerative Disease PHARC: An Inborn Error of Endocannabinoid Metabolism

5 familles d'origine algérienne analysées par puces affymetrix étaient liées au locus SCAR6 décrit par Tranebjaerg en 2003 par l'analyse d'une seule grande famille consanguine norvégienne avec 7 patients (Tranebjaerg et al., 2003). La présentation clinique de ces patients a été décrite par Kavistad en 1985. La maladie se manifeste par un début précoce autour de la première année de la vie avec un retard de la marche. Plus tard, une maladresse et une hypotonie musculaire s'installent. La maladie reste très peu progressive et aucune déficience mentale ou signes neurologiques additionnels ont été observés au cours de son évolution. L'IRM montre une atrophie cérébelleuse essentiellement vermienne. Le locus SCAR6 chevauche avec le locus PHARC (pour Polyneuropathy, Hearing loss, Ataxia, Retinitis pigmentosa and Cataract) localisé en 20p11.21-q12 et qui a été décrit plus récemment (Fiskerstrand et al., 2009). Nous avons également identifié une famille émiratie liée au même locus (Figure supplémentaire S3 ; Manuscrit 3). Cette famille consanguine au premier degré est composée de 10 membres: 3 atteints, 5 sains et les 2 parents. L'analyse des marqueurs microsatellites sur l'ensemble des membres de la famille montrait une ségrégation parfaite avec l'intervalle de 5,5 Mb identifié dans les familles Algériennes (LOD score de cette famille est de 3.02 en faveur de la liaison), confirmant ainsi les résultats de liaison obtenus par analyse de l'effet fondateur dans les familles Algériennes.

Nous avons séquencé 12 des 29 gènes de cet intervalle et avons trouvé une délétion de 14Kb incluant la région promotrice et la totalité de l'exon 1 du gène *ABHD12* chez la famille émiratie (Figure supplémentaire S4 ; Manuscrit 3). Chez 4 des 5 familles algériennes liées à ce locus, nous avons identifié une insertion de 7pb (c.846_852dupTAAGAGC ; p.His285Xfs1X) dans l'exon 9 (Figure supplémentaire S2; Manuscrit 3). En parallèle, une mutation homozygote dans l'exon 3 du gène *ABHD12* (c.337_338 delGAinsTTT; (p.Asp113PhefsX15) (Figure S2) a été identifiée par Fiskerstrand chez 8 patients norvégiens dont 3 appartenaient à la famille PHARC de départ. Une mutation homozygote (c.1054C>T ; p.Arg352X) a été aussi identifiée chez un patient d'origine franco-canadienne (Figure supplémentaire S2 ; Manuscrit 3).

La présentation clinique des patients de ces 4 familles algériennes et de la famille émiratie est similaire à celle du syndrome Refsum-like ou locus PHARC décrit par Fiskerstrand et collègues en 2009 malgré une variabilité d'âge de début et de sévérité très importante (Tableau 1; Manuscrit 3). L'absence de mutation chez la 5^{ème} famille algérienne suggère

qu'elle pourrait correspondre au syndrome SCAR6. En effet, les 3 patients de cette famille, clairement liée au chromosome 20q, ne présentent pas de neuropathie périphérique ni de signe de Babinski qui sont des signes constants du syndrome PHARC.

Le gène *ABHD12* code pour une α/β hydrolase dont l'un des substrats pourrait être le 2AG (2-arachidonyleglycérol). *ABHD12* est hautement exprimé dans le cerveau (Figure 2; Manuscrit 3). *ABHD12* comporte un site catalytique sérine-histidine-aspartate responsable de son activité. Le 2AG est synthétisé à partir du diacylglycérol membranaire (Figure 1.G; Manuscrit 3). Il constitue un des deux principaux endocannabinoïdes du système nerveux qui agissent sur les récepteurs des cannabinoïdes CB1 et CB2 et jouent un rôle important dans la plasticité synaptique et la neuro-inflammation.

En conclusion, 4 mutations délétères dans le gène *ABHD12* ont été identifiées chez 19 patients présentant le syndrome PHARC avec dysfonctionnement des systèmes nerveux central et périphérique et, de façon facultative, une altération des fonctions visuelle et auditive. Ce tableau clinique est appelé Refsum-like en absence d'élévation du taux d'acide phytanique et d'atteinte cutanée. Un taux normal d'acide phytanique pourra être alors un marqueur d'orientation biologique vers une mutation du gène *ABHD12*.

Mutations in *ABHD12* Cause the Neurodegenerative Disease PHARC: An Inborn Error of Endocannabinoid Metabolism

Torunn Fiskerstrand,^{1,12,*} Dorra H'mida-Ben Brahim,^{2,11,12} Stefan Johansson,¹ Abderrahim M'zahem,³ Bjørn Ivar Haukanes,¹ Nathalie Drouot,² Julian Zimmermann,⁴ Andrew J. Cole,⁵ Christian Vedeler,^{6,7} Cecilie Bredrup,⁸ Mirna Assoum,² Meriem Tazir,⁹ Thomas Klockgether,^{4,10} Abdelmadjid Hamri,³ Vidar M. Steen,^{1,7} Helge Boman,¹ Laurence A. Bindoff,^{6,7} Michel Koenig,^{2,*} and Per M. Knappskog^{1,7}

Polyneuropathy, hearing loss, ataxia, retinitis pigmentosa, and cataract (PHARC) is a neurodegenerative disease marked by early-onset cataract and hearing loss, retinitis pigmentosa, and involvement of both the central and peripheral nervous systems, including demyelinating sensorimotor polyneuropathy and cerebellar ataxia. Previously, we mapped this Refsum-like disorder to a 16 Mb region on chromosome 20. Here we report that mutations in the *ABHD12* gene cause PHARC disease and we describe the clinical manifestations in a total of 19 patients from four different countries. The *ABHD12* enzyme was recently shown to hydrolyze 2-arachidonoyl glycerol (2-AG), the main endocannabinoid lipid transmitter that acts on cannabinoid receptors CB1 and CB2. Our data therefore represent an example of an inherited disorder related to endocannabinoid metabolism. The endocannabinoid system is involved in a wide range of physiological processes including neurotransmission, mood, appetite, pain appreciation, addiction behavior, and inflammation, and several potential drugs targeting these pathways are in development for clinical applications. Our findings show that *ABHD12* performs essential functions in both the central and peripheral nervous systems and the eye. Any future drug-mediated interference with this enzyme should consider the potential risk of long-term adverse effects.

Inherited neurodegenerative diseases affecting both the peripheral and central nervous systems and the eye can be caused by a variety of metabolic disturbances. Mitochondrial dysfunction is a potent cause,^{1,2} arising either from mutation in the mitochondrial genome—e.g., neuropathy, ataxia, retinitis pigmentosa (NARP, MIM 551500) and Kearns-Sayre syndrome (ophthalmoplegia, retinal pigmentation, ataxia, and frequently peripheral neuropathy, MIM 530000)—or from a mutated nuclear gene. Friedreich ataxia (MIM 229300) and *POLG*-related diseases (MIM 174763) are examples of the latter. Defects involving peroxisomal metabolism, such as Refsum disease (MIM 266500) and alpha-methylacyl-CoA racemase (AMACR; MIM 604489) deficiency, also give rise to similar phenotypes.³

Recently, in a Norwegian family we described a progressive, autosomal-recessive, neurodegenerative disease that we ascertained initially as a phenocopy for Refsum disease (Figures 1A–1E). We named the disorder polyneuropathy, hearing loss, ataxia, retinitis pigmentosa, and cataract, or PHARC⁴ (MIM 612674). The disease is slowly progressive, with recognition of the first symptoms typically in the late teens. Although the condition has similarities to Refsum disease, patients do not have anosmia and both phy-tanic acid levels and peroxisomal function are normal. We

mapped the disease to a 16 Mb region on chromosome 20.⁴ Subsequently, additional affected individuals in four countries were identified, and we used homozygosity mapping to identify candidate regions for the mutated gene, followed by sequencing of candidate genes.

For the present study, DNA was obtained from 19 persons affected with PHARC disease and from healthy siblings and parents. The patients (10 females and 9 males) had a mean age of 32.5 years (range 6–62 years) and originated from Norway (n = 8), Algeria (n = 7), the United Arab Emirates (n = 3), and the USA (n = 1) (Table 1). In the previously published Norwegian family, individuals 1.1 and 1.2 are siblings and 1.3 is their third cousin. There are two affected siblings in families 2, 8, 9, and 10, and three affected in family 6. The adults gave informed consent to the investigation and publication of the results. The healthy individuals were not subject to clinical investigation, whereas the affected individuals have all been examined by neurologists, ophthalmologists, and otologists (Table 1). The study was approved of by the Regional Ethics Committee of Western Norway and by the local ethics committees of the University Hospitals of Bonn, Constantine, and Algiers.

From the same region as the original Norwegian family (family 1, Table 1),⁴ we ascertained a further five,

¹Center for Medical Genetics and Molecular Medicine, Haukeland University Hospital, N-5021 Bergen, Norway; ²Institut de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire (IGBMC), CNRS-INSERM-Universite de Strasbourg, F-67000 Illkirch, France; ³Centre Hospitalo-Universitaire Ben Badis, 25000 Constantine, Algeria; ⁴Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universitätsklinikum, D-53105 Bonn, Germany; ⁵The MGH Epilepsy Service, Massachusetts General Hospital, and Harvard Medical School, Boston, MA 02114, USA; ⁶Department of Neurology, Haukeland University Hospital, N-5021 Bergen, Norway; ⁷Department of Clinical Medicine, University of Bergen, N-5020 Bergen, Norway; ⁸Department of Ophthalmology, Haukeland University Hospital, N-5021 Bergen, Norway; ⁹Service de Neurologie, Centre Hospitalo-Universitaire Mustapha, 16000 Algiers, Algeria; ¹⁰Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE), D-53105 Bonn, Germany; ¹¹Service de Cytogénétique de Génétique Moléculaire et de Biologie de la Reproduction, CHU Farhat Hached, 4000 Sousse, Tunisia

¹²These authors contributed equally to this work

*Correspondence: torunn.fiskerstrand@helse-bergen.no (T.F.), mkoenig@igbmc.fr (M.K.)

DOI 10.1016/j.ajhg.2010.08.002. ©2010 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved.

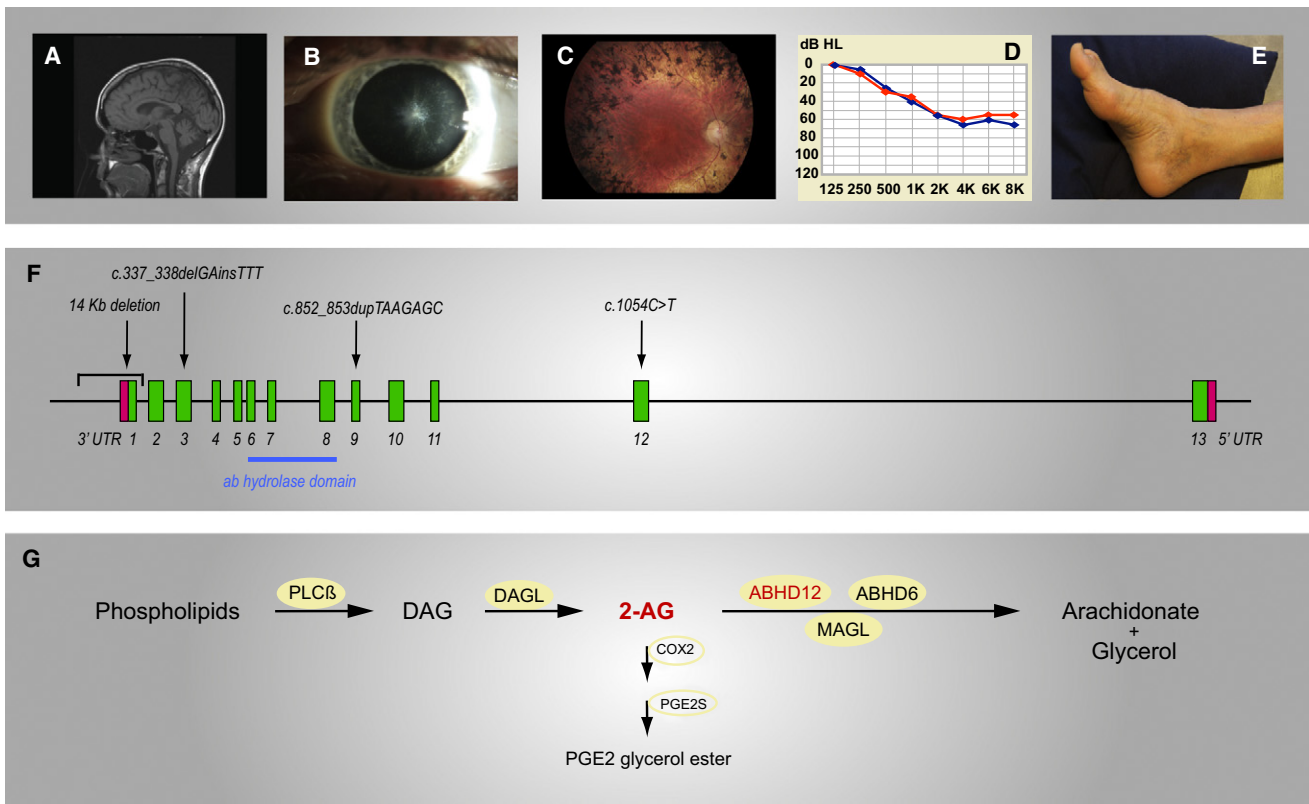


Figure 1. Phenotype and Genotype of PHARC Patients with Genetic Disruption of the 2-AG-Hydrolyzing Enzyme ABHD12

(A–E) Main symptoms in PHARC patients are shown. A summary of the symptoms and findings in each case is given in Table 1.

(A) MRI scan of an American female aged 50 (case 7.1) showing cerebellar atrophy.

(B) Star-shaped cataract of the posterior pole of the lens in a Norwegian male aged 24 (case 4.1).

(C) Fundus of a Norwegian male aged 56 (case 1.2) showing bone-spicule-shaped pigment deposits in the mid-periphery, pallor of the optic disc, attenuation of retinal vessels, and maculopathy.

(D) Audiogram of a Norwegian male aged 16 (case 5.1) showing sensorineural hearing loss of both right (red curve) and left (blue curve) ear, around 60 dB in the higher frequencies.

(E) Signs of peripheral neuropathy with pes cavus and hammertoes in a Norwegian male aged 56 (case 1.2).

(F) The *ABHD12* gene is located 25,223,379–25,319,477 bp from pter on the reverse strand of chromosome 20 (NCBI build 36.3). Two isoforms containing the α/β -hydrolase domain have been identified, differing only in the last exon. The positions of the homozygous mutations found in the families from the Emirates (14 Kb deletion), Norway (*c.337_338 delGainsTTT*), Algeria (*c.846_852 dupTAA GAGC*), and USA (*c.1054C>T*) are indicated.

(G) 2-AG is formed nearly exclusively by the hydrolysis of diacylglycerol (DAG), catalyzed by DAG lipases (α or β). The main pathway for formation of DAG from phospholipids is catalyzed by phospholipase C β (*PLCβ*). Several enzymes are responsible for the breakdown of 2-AG to arachidonate and glycerol. Although *MAGL* is responsible for 85% of the 2-AG hydrolysis in the mouse brain, *ABHD12* and *ABHD6* may be important for hydrolysis in specific cell types and/or cellular compartments. 2-AG is also a substrate for the inducible enzyme cyclooxygenase-2 (*COX2*), which is involved in neuroinflammation. *COX2* converts 2-AG to the corresponding hydroperoxy derivative, which is further metabolized to prostaglandin E2 glycerol ester by prostaglandin E2 glycerol ester synthase (*PGE2S*).

apparently unrelated, patients (including a brother and sister, family 2) with suspected PHARC disease (family 2-5, Table 1). Homozygosity mapping was performed with GeneChip 250K NspI arrays (GEO accession number GSE23151). The data were exported and treated for further analysis by the programs GTYPE and Progeny Lab. Regions of homozygosity were identified with the PLINK program⁵. All eight Norwegian patients from five families were homozygous for overlapping parts of the previously published 16 Mb region on chromosome 20 (Figure S1, available online), indicating distant relationship. The inclusion of these five additional patients enabled us to refine the candidate region to approximately 6.4 Mb (23,553,833–29,936,849 bp from pter, NCBI build 36.3). Twenty-three

of approximately 60 genes in this region were sequenced, and a homozygous indel mutation in exon 3 in the *ABHD12* gene (*c.337_338 delGainsTTT*; Figure 1F, Figure S2) was identified in all eight patients. The reference sequence for *ABHD12* was NM_001042472.1. This frameshift mutation predicts the replacement of an asparagine at codon 113 with phenylalanine leading to a downstream premature stop codon (p.Asp113PhefsX15). The mutation segregated fully with the disease in these families. We screened 190 local healthy blood donors and found two heterozygous carriers of this mutation, corresponding to a disease incidence of approximately 1/36,000 in this population. This indicates that the frequency of PHARC in Western Norway is comparable to, or may be even higher

than, relevant differential diagnoses like Friedreich ataxia and Refsum disease.

Concurrent mapping studies in one family from the United Arab Emirates and four families from Algeria were performed with Genechip 10K XbaI arrays followed by analysis on selected individuals with the GeneChip 6.0 array (Affymetrix, Santa Clara, USA). Regions of homozygosity were identified with the HomoSNP software (Figure S3). These patients, initially diagnosed with recessive ataxia, defined a 5.5 Mb linkage interval in the 20p11.21-q12 region on chromosome 20 (24,393,550–29,940,293, NCBI build 36.3, Figure S1). Twelve of the 29 genes of this region were sequenced, and a 14 Kb deletion (g.25,312,257_25,326,263 del14007insGG, NCBI Ref.Seq: NC_000020.10) in *ABHD12*, encompassing the promoter region and exon 1 of the gene (Figure 1F, Figures S4A–S4C), was identified in the family from the Emirates. No copy-number variations in this region have been reported to the Database of Genomic Variants. The seven patients in the four Algerian families were homozygous for a 7 bp duplication in exon 9 (c.846_852 dupTAA GAGC) in *ABHD12* (Figure S2), which directly replaces the histidine residue at codon 285 with a stop codon (p.His285fsX1). Also in these families the mutation segregated fully with the disease. Finally, a patient from the USA of French-Canadian heritage with suspected PHARC disease was found to be homozygous for a nonsense mutation (c.1054C>T) in exon 12 in *ABHD12* (Figure 1F, Figures S1 and S2), leading to a predicted stop codon in position 352 in the protein (p.Arg352X). The finding of four different deleterious *ABHD12* mutations in a total of 19 patients with PHARC disease from four countries clearly supports a causal genotype-phenotype relationship.

The addition of several new families requires refinement of our earlier clinical description.⁴ The essential clinical features are summarized in Figures 1A–1E and Table 1. PHARC in the Norwegian patients, and in the single American patient, appears to be a slowly progressive disease with recognition of the first symptoms typically in the teens. Cataracts, hearing loss, and a predominantly demyelinating peripheral neuropathy are present in all adult patients (Table 1), whereas the presence and extent of ataxia is variable. Retinitis pigmentosa typically presents in young adult life (twenties or thirties), and electroretinograms in most patients show a rod-cone dysfunction. The disorder in families from Algeria and the Emirates shows an earlier onset of ataxia that has both central and peripheral characteristics (Table 1). No evidence of behavioral disturbances or abnormalities related to appetite was detected in our adult patients. Cerebral cortical function appears to be spared, with only one patient having mental retardation (case 9.1) and another epilepsy (case 7.1, myoclonic seizures). Adult heterozygous carriers of *ABHD12* mutations do not have an obvious phenotype, implying that their residual enzyme activity is sufficient to avoid clinical symptoms.

Each of the four different *ABHD12* mutations is interpreted as a null mutation that would either abolish or severely reduce the activity of the encoding enzyme, α/β -hydrolase 12 (ABHD12). PHARC may, therefore, be considered a human *ABHD12* knockout model. The question also arises whether less detrimental mutations may cause various incomplete phenotypes. The serious and progressive disease seen in our patients suggests that ABHD12 performs an essential function in the peripheral and central nervous systems and in the eye. This is supported by the high expression of *ABHD12* in the brain, with a striking enrichment in microglia (Figure 2), as shown by our replotting of data from GNF Mouse Gene Atlas V3. Expression is also high in macrophages. Currently, the only known substrate for ABHD12 is the main endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) (Figure 1G). This compound has important functions in synaptic plasticity^{6,7} and neuroinflammation.^{8,9} In acute ischemia and/or excitotoxicity, 2-AG appears to have neuroprotective properties,^{9–11} but the effects of long-term increased levels of this metabolite have not been investigated.

The endocannabinoid signaling system is the focus of increasing scientific interest, in part because of the potential for developing novel therapeutic agents.^{11–13} The system is tightly regulated and appears to be important for many physiological processes including neurotransmission, pain appreciation, appetite, mood, addiction behavior, body temperature, and inflammation.¹¹ Key players in these pathways are the G protein-coupled cannabinoid receptors CB1 and CB2 and their endogenous ligands, endocannabinoids, as well as enzymes that synthesize or hydrolyze these ligands.¹⁴ The most abundant endocannabinoid, 2-AG, (Figure 1G) is formed on demand from the membrane lipid diacylglycerol (by diacylglycerol lipase α or β).¹⁴ Endocannabinoids act locally as lipid transmitters and are rapidly cleared by hydrolysis. Interestingly, our patients did not show overt cannabinomimetic effects.

Several enzymes are involved in 2-AG hydrolysis^{15,16} (Figure 1G), and there is evidence that these enzymes are differentially expressed in various cell types¹⁷ and cellular compartments.^{7,16,17} In the mouse brain, monoacylglycerol lipase (MAGL) accounts for 85% of the hydrolase activity,^{11,17} with additional contributions from ABHD12 and α/β -hydrolase 6 (ABHD6).¹⁶ The apparent paradox of a purported minor role of ABHD12 in 2-AG hydrolysis versus the serious PHARC phenotype in the brain and eye suggests either that ABHD12 is of crucial importance only in certain cell types¹² or that it is also acting on a hitherto unknown substrate other than 2-AG. The finding that microglial cells have a particularly high expression of *ABHD12*, but very low levels of *MGLL* (encoding MAGL) and *ABHD6* (Figure 2), indicates that the former alternative of differential cellular expression exists. Moreover, microglia dysfunction is known to be involved in neurodegenerative diseases¹⁸ as well as in retinal dystrophies.¹⁹ Whether ABHD12 acts on more than one substrate is currently

Table 1. Clinical Findings and Results of Investigations in the 19 Patients with PHARC Disease

Family/ Case	Age (yr) and Sex	Sensory and Motor Neuropathy	Neurography and EMG	Sensorineural Hearing Loss	Ataxia	MR/CT of Brain	Pyramidal Tract Signs	Retinitis Pigmentosa	ERG	Cataract
Norway Mutation: c.337_338delGinsTTT [p.Asp113PhefsX15]										
1.1	62 F	38 years; pes cavus; sensory loss; absent ankle reflexes	Demyelinating polyneuropathy	Twenties	No	Normal	No	38 years	Rod-cone dystrophy	28 years
1.2	56 M	37 years; pes cavus from childhood	Demyelinating polyneuropathy	Thirties	37 years; gait ataxia	Normal	Extensor plantar response at lower limbs; spasticity; hyperreflexia	37 years	Rod-cone dystrophy	37 years
1.3	46 M	38 years; no pes cavus; sensory loss distally	Demyelinating polyneuropathy	From childhood	43 years; gait ataxia; upper limb intention tremor	Cerebellar atrophy	Extensor plantar response at lower limbs; spasticity; hyperreflexia	46 years	Rod-cone dystrophy	25 years
2.1	58 M	51 years; pes cavus; sensory loss; reduced tendon reflexes	Demyelinating/axonal polyneuropathy	Twenties	No?	Cerebellar atrophy	Extensor plantar response at lower limbs	35 years	Rod-cone dystrophy	26 years
2.2	54 F	53 years; pes cavus; normal sensibility; reduced tendon reflexes	ND	Twenties	No	ND	No	25 years	Flat	25 years
3.1	36 F	Pes cavus; normal sensibility; reduced tendon reflexes in lower limbs	Demyelinating polyneuropathy	Deaf by the age of 10	Yes	Atrophy of vermis and medulla oblongata	Extensor plantar response at right side; spasticity	36 years	Rod-cone dystrophy	32 years
4.1	24 M	Pes cavus; hammertoes; reduced tendon reflexes in upper and lower limbs	Demyelinating polyneuropathy	Late in teens	No	Slight ventricular asymmetry. No cerebellar atrophy	Indifferent plantar response	No	Normal	15 years
5.1	16 M	Pes cavus; reduced sensibility; reduced tendon reflexes in upper limbs, absent in lower limbs	Demyelinating polyneuropathy	13 years	No	Normal	No	No	Normal	16 years (slight)
The Emirates Mutation: 14 Kb deletion removing exon 1										
6.1	24 M	Pes cavus from childhood; absent tendon reflexes	Abnormal	Deaf by the age of 14	Mild	Normal	Indifferent plantar response	Twenties	ND	15 years
6.2	20 M	Pes cavus from age 4; absent tendon reflexes	Demyelinating polyneuropathy	6 years	2 years; gait, limb, and speech ataxia; wheelchair-bound from age 10	Cerebellar atrophy (age 3)	Extensor plantar response	Yes	ND	Yes
6.3	6 F	Absent tendon reflexes	ND	Yes	Speech and limb	Cerebellar atrophy	Indifferent plantar response	No	ND	Yes
USA Mutation: c.1054C>T [p.Arg352X]										
7.1	50 F	34 years; pes cavus; hammertoes; sensibility slightly reduced	Abnormal	17 years	18 years; dysarthria; gait ataxia; jerky eye movements; tremor in hands	Cerebellar atrophy Increased signal in periventricular white matter.	Flexor plantar response; spasticity; preserved reflexes	Twenties	ND	22 years

Table 1. Continued

Family/ Case	Age (yr) and Sex	Sensory and Motor Neuropathy	Neurography and EMG	Sensorineural Hearing Loss	Ataxia	MR/CT of Brain	Pyramidal Tract Signs	Retinitis Pigmentosa	ERG	Cataract
Algeria Mutation: c.846_852dupTAAGAGC [p.His285Xfs1X]										
8.1	11 M	Absent tendon reflexes and moderate muscle weakness of lower limbs; normal sensibility	ND	No	3-4 years; limb and gait ataxia; horizontal nystagmus; dysarthria; dysmetria upper and lower limbs; delayed walking at 15 month; action and intention tremor	Cerebellar atrophy	Extensor plantar response at lower limbs	No	ND	No
8.2	10 F	Absent tendon reflexes of lower limbs; normal sensibility	ND	No	4-5 years; gait ataxia	Vermian atrophy	Extensor plantar response at lower limbs	No	ND	No
9.1	44 M	Pes cavus; sensory loss; absent tendon reflexes at lower limbs; scoliosis	Demyelinating polyneuropathy	Yes	7-10 years; gait and limb ataxia; cerebellar dysarthria; dysmetria at upper limbs with adiadocokinesia; head titubation	Vermian atrophy	Extensor plantar response at lower limbs; macroglossia	amblyopia	ND	
9.2	26 F	Pes cavus; sensory loss; reduced tendon reflexes at upper limbs, and absent at lower limbs	Severe demyelinating polyneuropathy	Deaf	4-9 years; gait and limb ataxia; horizontal nystagmus; moderate dysarthria; dysmetria at upper and lower limbs	Vermian atrophy	Extensor plantar response at lower limbs; tongue fasciculations	Yes	ND	Yes
10.1	26 F	Pes cavus; sensory loss Absent tendon reflexes	Severe demyelinating polyneuropathy on nerve biopsy	6 years	6-12 years; gait and limb ataxia	Normal	Indifferent plantar response	No	ND	No
10.2	19 F	12 years; pes cavus; sensory loss; absent tendon reflexes at upper and lower limbs	ND		No	ND			ND	
11.1	32 F	Pes cavus; sensory loss and absent tendon reflexes at lower limbs	Axonal polyneuropathy	Yes	16-20 years; gait ataxia; dysarthria; dysmetria at upper limbs	Cerebellar atrophy	Extensor plantar response at lower limbs	Decreased visual acuity and amblyopia	ND	No

Data on patients from four different countries (11 families) are shown. All individuals in one family are siblings, except for 1.3, who is the third cousin of 1.1 and 1.2. All patients have polyneuropathy of demyelinating type and sensorineural hearing loss (three patients are deaf), and nearly all adult patients have developed cataracts. Retinitis pigmentosa is typically recognized in the twenties or thirties. Ataxia is present in about half of the patients, with cerebellar atrophy and pyramidal tract signs like spasticity and extensor plantar response. The onset of ataxia is highly variable, starting particularly early in the families from the Emirates and Algeria.

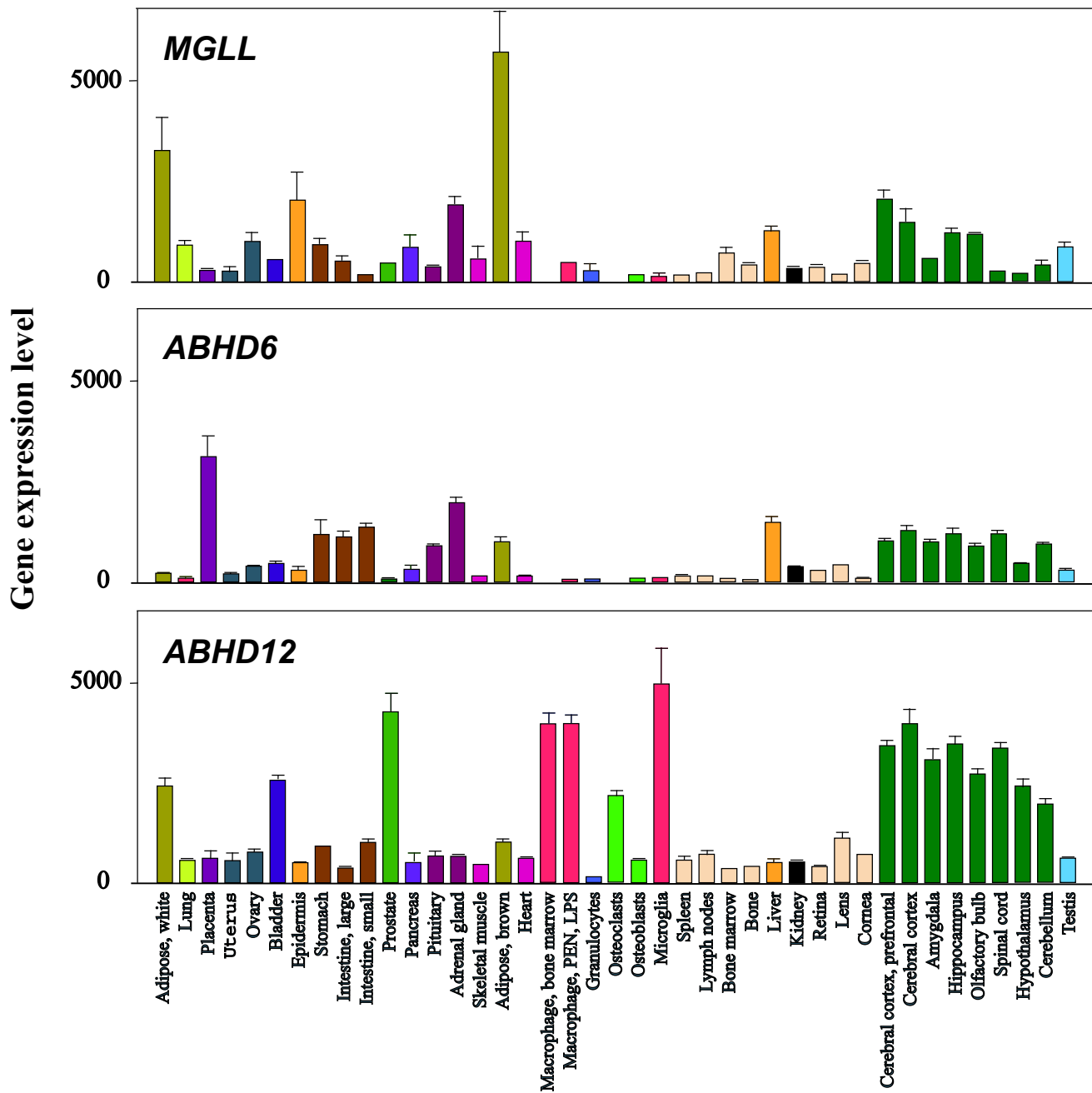


Figure 2. Gene Expression of *ABHD12*, *ABHD6*, and *MGLL* in Mouse Tissues

This is a replot of a subset of the GNF Mouse GeneAtlas V3 data, provided by Lattin et al.²³ The data are published online in the BioGPS database under the alias GeneAtlas MOE430, and the NCBI GEO accession number is GSE10246. There is high expression of *ABHD12*, *ABHD6*, and *MGLL* (encoding MAGL) in different brain tissues (dark green bars). The highest level of *ABHD12* is found in microglia (red bar, lower panel), and the expression is also high in the related cell types macrophages (red bars) and osteoclasts (light green bar). There is scarce expression of both *ABHD6* (mid panel) and *MGLL* (upper panel) in microglia, macrophages, and osteoclasts.

unknown, but many hydrolases have overlapping functions, including MAGL, which is involved in lipolysis²⁰ as well as in hydrolyzing 2-AG.

Despite great interest in manipulating 2-AG hydrolysis in vivo,^{8,21} knockout animal models have not yet been developed, and only recently a blocker of MAGL with substantial effect in vivo was reported.²² Notwithstanding this, inhibition of endocannabinoid hydrolases, including

ABHD12, has been suggested as a potential therapy for neurodegenerative diseases such as multiple sclerosis.²¹ However, the consequences of irreversible loss of *ABHD12* function, as seen in our patients with PHARC, may serve as a cautionary reminder that any potential drug inhibiting this enzyme be thoroughly evaluated with respect to the potential risk of severe long-term adverse effects.

In conclusion, mutations in the *ABHD12*-gene causes PHARC, a disease with serious dysfunction of the central and peripheral nervous systems, as well as hearing loss and impaired vision. Our findings have implications for clinicians working with both children and adults and suggest disrupted endocannabinoid metabolism as a cause of neurodegenerative disease.

Supplemental Data

Supplemental Data include four figures and can be found with this article online at <http://www.cell.com/AJHG/>.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Helse Vest (Western Norway Regional Health Authority, 911308, to P.K., T.F., H.B., V.M.S, and B.I.H.) and from the Agence Nationale pour la Recherche-Maladies Rares (ANR-05-MRAR-013-01, France, to M.K.). D.H.-B.B. was supported by the French association Connaître les Syndromes Cérébelleux. M.A. was supported by a BDI fellowship from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). We thank John Walker and Andrew Su for the kind permission to replot (Figure 2) gene expression data from GNF Mouse Gene Atlas V3. The technical assistance of Jorunn Skeie Bringsli, Guri Matre, Hilde Rusaas, Sigrid Erdal, Paal Borge, Christine Stansberg, Bård Kjersem, Christelle Thibault, Serge Vicaire, and Ingrid Bauer was highly appreciated.

Received: May 22, 2010

Revised: July 8, 2010

Accepted: August 4, 2010

Published online: August 26, 2010

Web Resources

The URLs for data presented herein are as follows:

BioGPS database, <http://biogps.gnf.org>

Database of Genomic Variants, <http://projects.tcag.ca/variation/?source=hg18>

NCBI Build 36.3, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>

NCBI Gene Expression Omnibus, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>

Accession Numbers

Microarray data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO) and are accessible through GEO Series accession number GSE23151.

References

1. Tucker, E.J., Compton, A.G., and Thorburn, D.R. (2010). Recent advances in the genetics of mitochondrial encephalopathies. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* *10*, 277–285.
2. Finsterer, J. (2009). Mitochondrial ataxias. *Can. J. Neurol. Sci.* *36*, 543–553.
3. Wanders, R.J., and Komen, J.C. (2007). Peroxisomes, Refsum's disease and the alpha- and omega-oxidation of phytanic acid. *Biochem. Soc. Trans.* *35*, 865–869.
4. Fiskerstrand, T., Knappskog, P., Majewski, J., Wanders, R.J., Boman, H., and Bindoff, L.A. (2009). A novel Refsum-like disorder that maps to chromosome 20. *Neurology* *72*, 20–27.
5. Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P.L., Daly, M.J., and Sham, P.C. (2007). PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* *81*, 559–575.
6. Makara, J.K., Mor, M., Fegley, D., Szabó, S.I., Kathuria, S., Astarita, G., Duranti, A., Tontini, A., Tarzia, G., Rivara, S., et al. (2005). Selective inhibition of 2-AG hydrolysis enhances endocannabinoid signaling in hippocampus. *Nat. Neurosci.* *8*, 1139–1141.
7. Straiker, A., Hu, S.S., Long, J.Z., Arnold, A., Wager-Miller, J., Cravatt, B.F., and Mackie, K. (2009). Monoacylglycerol lipase limits the duration of endocannabinoid-mediated depolarization-induced suppression of excitation in autaptic hippocampal neurons. *Mol. Pharmacol.* *76*, 1220–1227.
8. Zhang, J., and Chen, C. (2008). Endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol protects neurons by limiting COX-2 elevation. *J. Biol. Chem.* *283*, 22601–22611.
9. Kreuz, S., Koch, M., Böttger, C., Ghadban, C., Korf, H.W., and Dehghani, F. (2009). 2-Arachidonoylglycerol elicits neuroprotective effects on excitotoxically lesioned dentate gyrus granule cells via abnormal-cannabidiol-sensitive receptors on microglial cells. *Glia* *57*, 286–294.
10. Panikashvili, D., Simeonidou, C., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Breuer, A., Mechoulam, R., and Shohami, E. (2001). An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature* *413*, 527–531.
11. Di Marzo, V. (2008). Targeting the endocannabinoid system: To enhance or reduce? *Nat. Rev. Drug Discov.* *7*, 438–455.
12. Marris, W., and Stella, N. (2007). 2-AG + 2 new players = forecast for therapeutic advances. *Chem. Biol.* *14*, 1309–1311.
13. Kinsey, S.G., Long, J.Z., O'Neal, S.T., Abdullah, R.A., Poklis, J.L., Boger, D.L., Cravatt, B.F., and Lichtman, A.H. (2009). Blockade of endocannabinoid-degrading enzymes attenuates neuropathic pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *330*, 902–910.
14. Wang, J., and Ueda, N. (2009). Biology of endocannabinoid synthesis system. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* *89*, 112–119.
15. Marris, W., and Stella, N. (2009). Measuring endocannabinoid hydrolysis: Refining our tools and understanding. *AAPS J.* *11*, 307–311.
16. Blankman, J.L., Simon, G.M., and Cravatt, B.F. (2007). A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem. Biol.* *14*, 1347–1356.
17. Muccioli, G.G., Xu, C., Odah, E., Cudaback, E., Cisneros, J.A., Lambert, D.M., López Rodríguez, M.L., Bajjalieh, S., and Stella, N. (2007). Identification of a novel endocannabinoid-hydrolyzing enzyme expressed by microglial cells. *J. Neurosci.* *27*, 2883–2889.
18. Landreth, G.E. (2009). Microglia in central nervous system diseases. *J. Neuroimmune Pharmacol.* *4*, 369–370.
19. Ebert, S., Weigelt, K., Walczak, Y., Drobnik, W., Mauerer, R., Hume, D.A., Weber, B.H., and Langmann, T. (2009). Docosahexaenoic acid attenuates microglial activation and delays early retinal degeneration. *J. Neurochem.* *110*, 1863–1875.

20. Guzmán, M. (2010). A new age for MAGL. *Chem. Biol.* 17, 4–6.
21. Stella, N. (2009). Endocannabinoid signaling in microglial cells. *Neuropharmacology* 56 (Suppl 1), 244–253.
22. Long, J.Z., Li, W., Booker, L., Burston, J.J., Kinsey, S.G., Schlosburg, J.E., Pavón, F.J., Serrano, A.M., Selley, D.E., Parsons, L.H., et al. (2009). Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat. Chem. Biol.* 5, 37–44.
23. Lattin, J.E., Schroder, K., Su, A.I., Walker, J.R., Zhang, J., Wiltshire, T., Saijo, K., Glass, C.K., Hume, D.A., Kellie, S., and Sweet, M.J. (2008). Expression analysis of G Protein-Coupled Receptors in mouse macrophages. *Immunome Res.* 4, 5.

**The American Journal of Human Genetics, Volume 87
Supplemental Data**

Mutations in *ABHD12* Cause

the Neurodegenerative Disease PHARC:

An Inborn Error of Endocannabinoid Metabolism

Torunn Fiskerstrand, Dorra H'mida-Ben Brahim, Stefan Johansson, Abderrahim M'zahem, Bjørn Ivar Haukanes, Nathalie Drouot, Julian Zimmermann, Andrew J. Cole, Christian Vedeler, Cecilie Bredrup, Mirna Assoum, Meriem Tazir, Thomas Klockgether, Abdelmadjid Hamri, Vidar M. Steen, Helge Boman, Laurence A. Bindoff, Michel Koenig, and Per M. Knappskog

Figure S1.

Areas of homozygosity/haplotype sharing on chromosome 20 in individuals with PHARC disease from 11 families

Panel showing regions of homozygosity pericentric on chromosome 20 in one individual from each of the 11 families with PHARC disease from four countries. One exception is family 1, where haplotypes for the third cousins 1.2 and 1.3 are shown. In families with more than one affected sib (1, 2, 6, 8, 9 and 10), only one affected is shown, as they shared identical haplotypes beyond the region of interest. Family 1 has been described earlier (Fiskerstrand T, et al. *Neurology*. 2009 Jan 6;72(1):20-7.). The *ABHD12* gene is found 25.2-25.3 Mb from pter (dashed line). The haplotype regions presented are created on the basis of information generated also from other family members (not shown). Unique haplotypes have been given the same colour. All the individuals in the Norwegian families are homozygous for parts of the same ancestral haplotype (red), and this is also found in the Algerian families (ancestral haplotype in yellow). The minimal common region of homozygosity (6.4 Mb) in the Norwegian families is delineated by the affected persons in family 2 (on 20p, 23,553,833 bp from pter) and in family 5 (on 20q, 29,936,849 bp from pter). This represents a genetic interval of 1.4cM sex-averaged (52.3 - 53.7 cM, Rutgers Map Interpolator v.2). The number of generations from present to the most recent common Norwegian ancestor may be estimated to around 70 (Génin E et al. *Ann Hum Genet*. 1998 Sep;62:419-29), thus this indel mutation is more than 1500 years old. In the Algerian families, the minimal common region of homozygosity (6.1 Mb) is delineated by the affected persons in family 8 (24,393,550 to 30,538,033 Mb from pter). In the Emirati family, the minimal linkage region ranged from 23,295,553 to 29,940,293 Mb from pter. One

healthy sister was homozygous for the region ranging from 29,940,293 -37,449,930 Mb from pter (shown in lighter blue colour) , thus limiting the linkage region in this family. All positions are given according to NCBI Build 36.3.

Figure S1



Figure S2.

Three deleterious mutations in the *ABHD12* gene.

The mutations found in the *ABHD12* gene in the Norwegian (exon 3), Algerian (exon 9) and American (exon 12) PHARC patients are shown in the lower panels, with respective wildtype sequences in upper panels. In the Norwegian family (left panels), a homozygous indel mutation in exon 3 in the *ABHD12* gene (c.337_338delGAinsTTT) was identified in all eight patients (GATTT is marked on the wildtype sequence). This frameshift mutation predicts the replacement of an asparagine (D) at codon 113 with phenylalanine (F) leading to a downstream premature stop codon (p.Asp113PhefsX15). The Algerian patients (middle panels) were homozygous for a 7 bp duplication in exon 9 (c.846_852dupTAAGAGC), which directly replaces the histidine (H) residue at codon 285 with a stop codon (p.His285fsX1). A patient of French-Canadian heritage from USA (right panels) was found to be homozygous for a nonsense mutation (c.1054C>T, marked by arrow) in exon 12, leading to a predicted stop codon in position 352 in the protein (p.Arg352X).

Figure S2

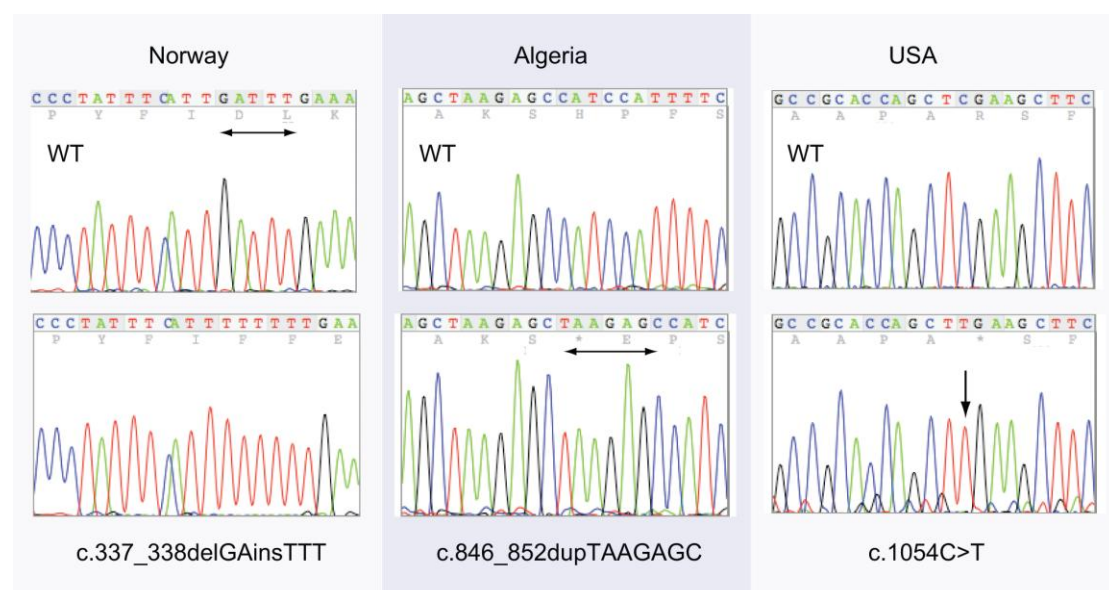


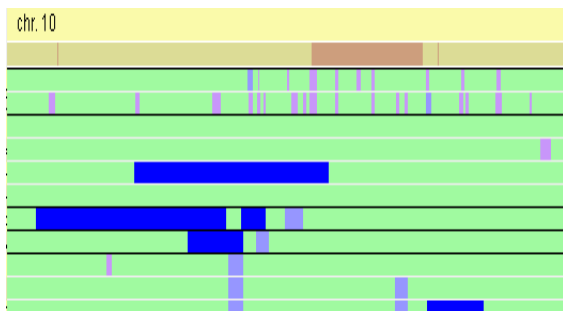
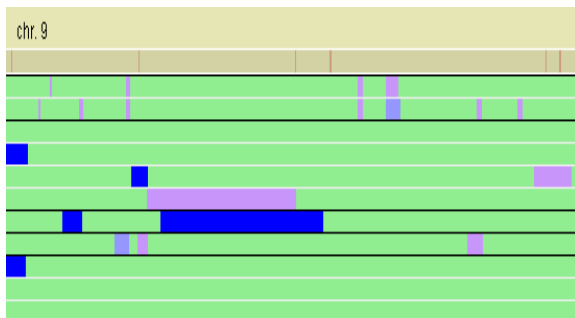
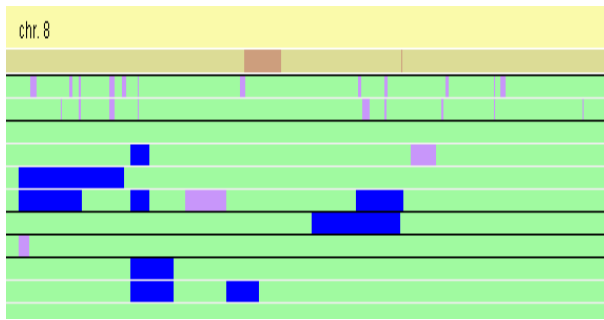
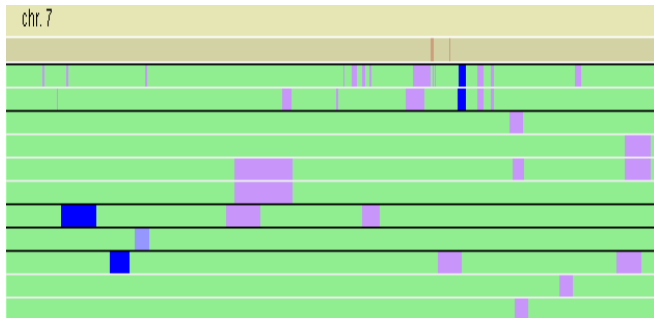
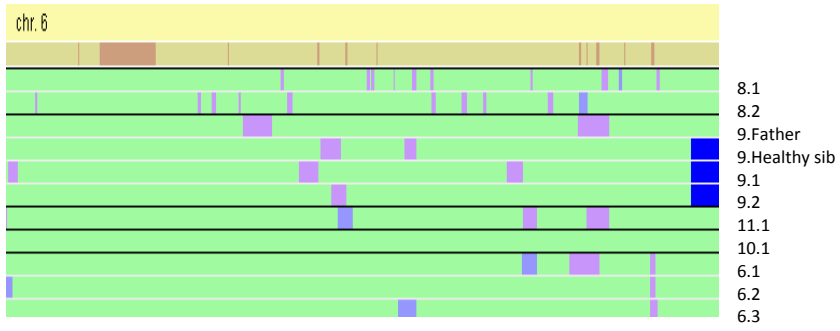
Figure S3.

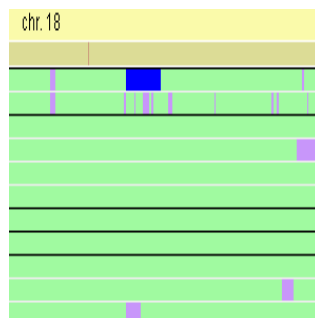
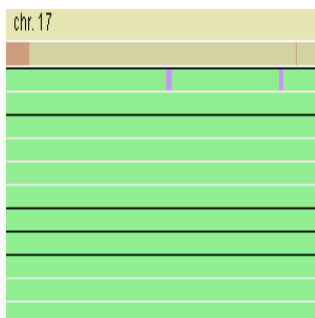
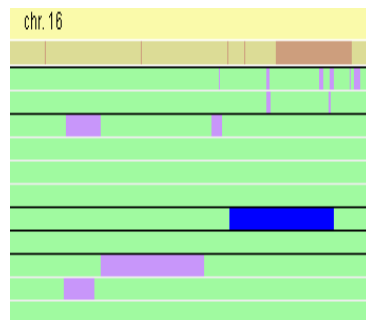
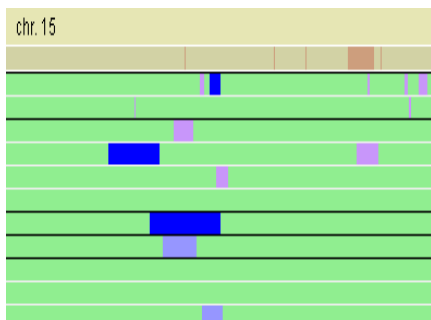
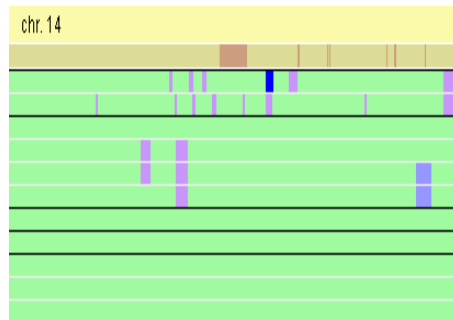
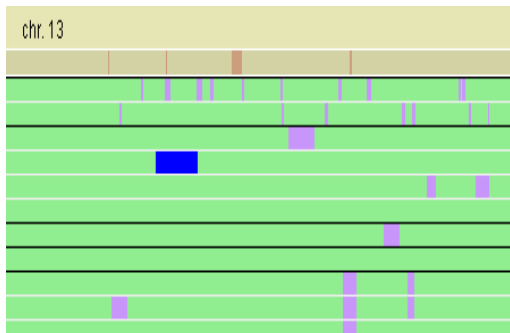
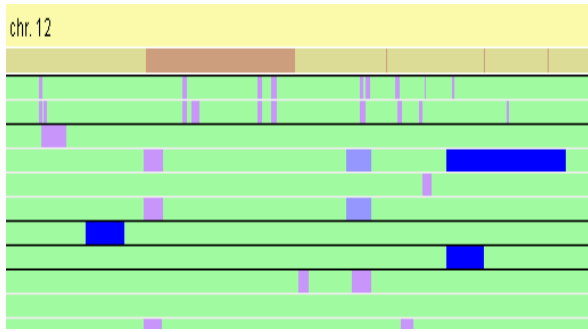
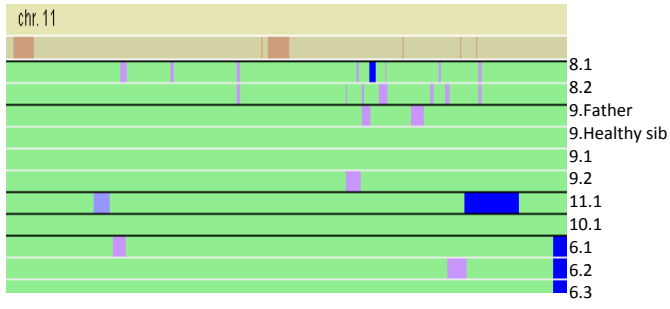
Genotyping Results of the Genome-wide Scan in Families 6 and 8-11.

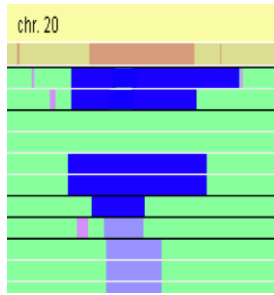
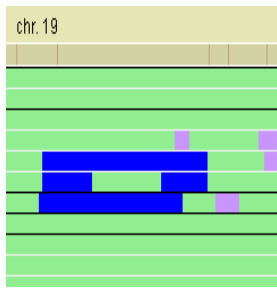
The graphic interface (HomoSNP software) reveals shared regions of homozygosity in the consanguineous families. Each panel represents the result of one chromosome indicated on the left of the top bar. Chromosome pter to qter orientation is represented from left to right. The green bars show individual results of the following patients (from the top): 8.1, 8.2, father in family 9, healthy brother in family 9, 9.1, 9.2, 11.1, 10.1, 6.1, 6.2, 6.3 , as indicated on the right in some panels. A white line separates two bars from individuals of the same family. A black line separates two bars from individuals of different families. The regions with more than 30 consecutive homozygous SNPs for family 8 (Genechip 50K), and with more than 25 consecutive homozygous SNPs for all other families (Genechip 10K), are in dark blue. Regions with 20 to 24 consecutive homozygous SNPs are represented in purple (Genechip 10K). All affected individuals share a region of homozygosity by descent on chromosome 20cen.

Figure S3









- 8.1
- 8.2
- 9.Father
- 9.Healthy sib
- 9.1
- 9.2
- 11.1
- 10.1
- 6.1
- 6.2
- 6.3

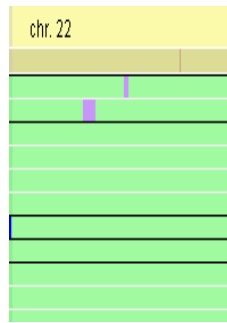
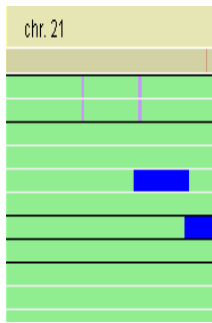


Figure S4.

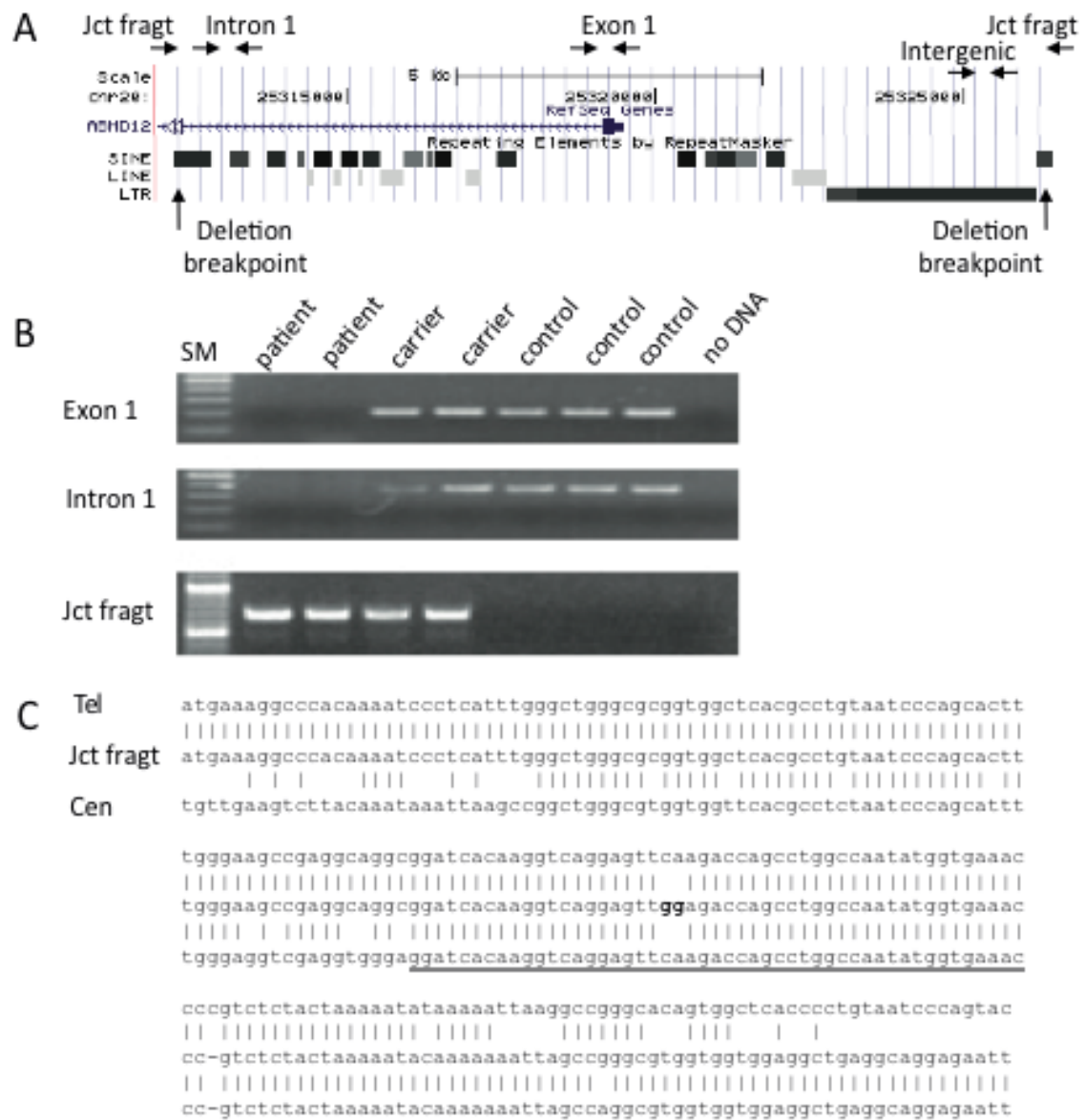
The 14 kb deletion in family 6.

A) Genomic organisation of the region deleted in family 6. The position of the primers used to identify and delineate the deletion by PCR are indicated at the top. The position of *ABHD12* exon 1 and of the surrounding repeated elements are shown in the middle (obtained from <http://genome.ucsc.edu/>). The position of the deletion breakpoints are indicated by vertical arrows at the bottom. They fall within Alu repeated elements (SINE).

B) Identification and delineation of the deletion involving exon 1 of *ABHD12* in family 6. Fragments containing exon 1 and portions of intron 1 of *ABHD12* failed to amplify from genomic DNA of patients 1 and 2, while they amplified from DNA of the healthy brother and sister (carriers) and from unrelated individuals (controls); similar results were obtained with *ABHD12-GINS1* intergenic sequences (not shown). The junction fragment (jct fragt, 700 bp, overlapping the deletion) amplified from genomic DNA of patients 6.1 and 6.2, and of the healthy carriers, but failed to amplify from the controls, as the normal fragment would be 15 kb in size. SM: size marker (size of exon 1 fragment : 200 bp, size of intron 1 fragment : 380 bp).

C) Sequence of the junction fragment overlapping the deletion and alignment with the non-deleted telomeric (tel) and centromeric (cen) sequences. The sequences highly similar between the tel and cen sequences correspond to Alu elements. The sequence that is identical between the telomeric and centromeric Alu elements is underlined. The breakpoints likely occurred at the two mismatching guanines (gg, in bold) which were probably inserted during the non-homologous recombination.

Figure S4



B- Manuscript 4: Targeted next generation sequencing of a 12.5 Mb homozygous region reveals mutations in the ANO10 gene in patients with autosomal recessive cerebellar ataxia.

Parmi les patients analysés par puce Affymetrix SNP, 3 patients d'une famille tzigane consanguine présentaient une ataxie cérébelleuse débutant dans la 2^{ème} décennie, un léger retard mental et des télangectasies sans augmentation du risque de cancer ni du taux d' α -foetoprotéine. Le gène *ATM* était exclu en absence de la mutation fréquente chez les tziganes (9010_9037del28). La région d'homozygotie partagée la plus importante détectée par l'analyse des puces SNP était sur le chromosome 3p23-p14.2. Les ADNs de la mère, de la sœur saine, d'un demi-frère et d'une demi-sœur étaient disponibles. J'ai confirmé l'homozygotie liée à la maladie au niveau du chromosome 3 par le génotypage des marqueurs microsatellites sur les membres de cette famille mais ceci n'a pas permis de réduire l'intervalle critique de 27,8 Mb (Figure 13).

En parallèle, S. Vermeer et al. ont identifiés par une approche similaire, une famille d'ataxie cérébelleuse localisée dans un intervalle de liaison inclus dans l'intervalle de liaison de notre famille. Les 3 patients de cette famille hollandaise (Famille A, Manuscrit 4) ont une ataxie avec un âge de début entre 20 et 35 ans et l'IRM montre une atrophie cérébelleuse marquée (Figure supplémentaire S1. A et B; Manuscrit 4).

Vermeer et al. ont procédé à la capture d'exons de toute la région de 10,5 Mb partagée par les 3 patients au locus 3p22.3-21.32 ainsi que 9 autres petites régions sur les chromosomes 1, 2, 3, 4 et 14 qui étaient identifiées par cartographie par homozygotie à l'aide des puces Affymetrix 900K. Une mutation homozygote (c.1529 T>G; p.L510R) a été trouvée au niveau du domaine DUF590 du gène *ANO10* (Figure 1 ; Manuscrit 4). Une délétion de 2 paires de bases au niveau de l'exon 6 (c.1150-1151del) a été trouvée chez les patients de notre famille B (Figure 2; Manuscrit 4) entraînant un décalage du cadre de lecture (p.Leu384fsX474) (Tableau 2; Manuscrit 4). Deux mutations hétérozygotes composites ont été identifiées chez les 2 patients d'une famille française (c.1476+1G>T) et (c.1604del; p.L535X). *ANO10* est hautement exprimé dans le cerveau adulte en particulier au niveau des lobes frontal et occipital et du cervelet (Figure 3; Manuscrit 4). *ANO10* ou TMEM16K est un membre de la famille des anoctamines qui comprend au moins 9 protéines possédant 8 domaines

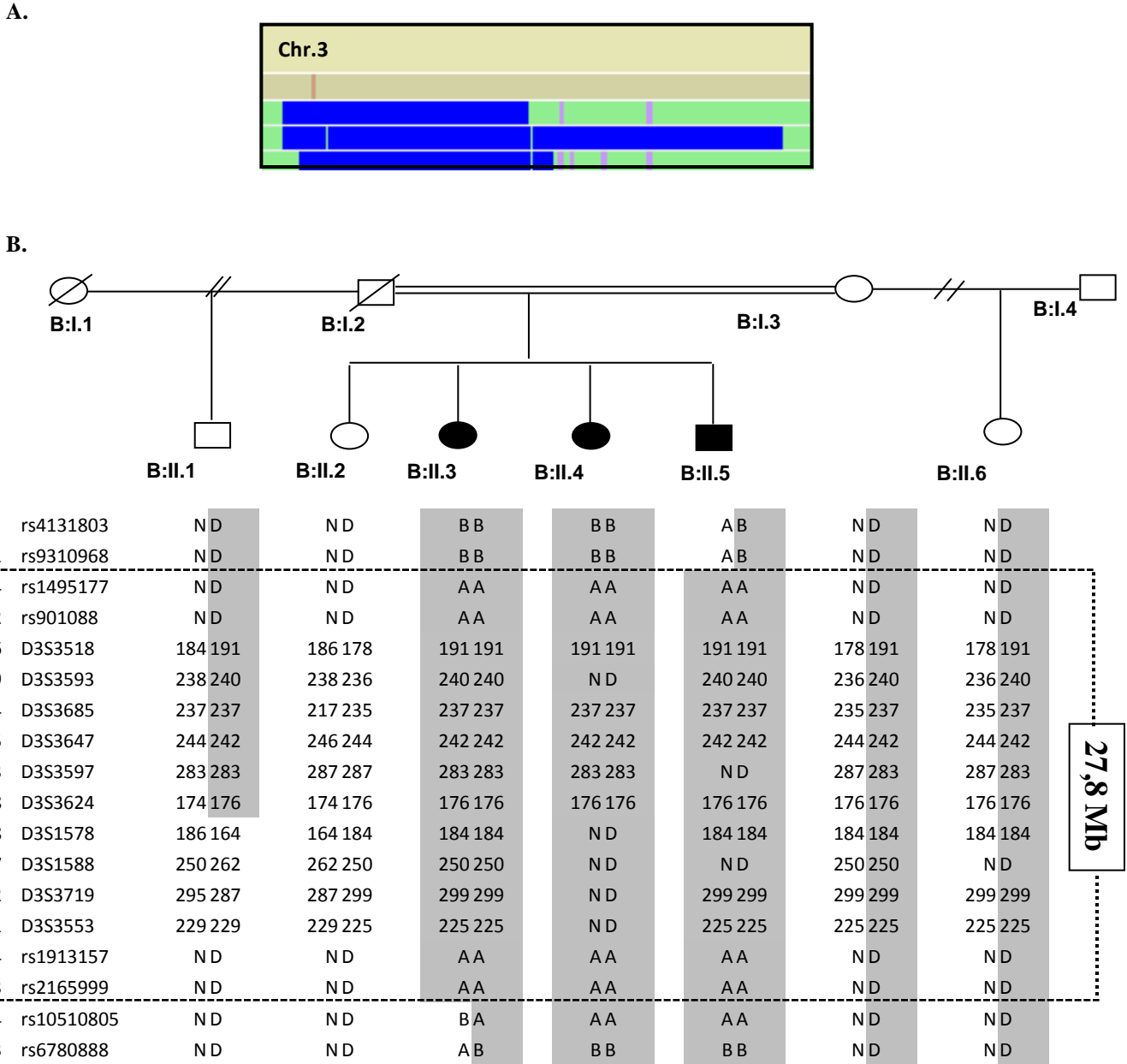


Figure 13: Analyse de liaison en 3p23-p14.2 de la famille B par puces Affymetrix et marqueurs microsatellites

A. Région d'homozygotie partagée sur le chromosome 3p23-p14.2 entre les 3 patients de la famille B détectée par l'analyse des puces Affymetrix 50K. La région homozygote est représentée en bleu. Chaque ligne correspond à un individu

B. Analyse de marqueurs microsatellites confirmant la liaison de la maladie à ce locus. Les marqueurs microsatellites génotypés ainsi que leurs positions génomiques sont indiqués sur la gauche et sont organisés du centromère vers le télomère. Les haplotypes parentaux homozygotes chez les 3 enfants atteints et présent chez la mère et 2 des enfants sains sont représentés en gris. La région de liaison définie est de 27,8 Mb.

transmembranaires et un domaine DUF590 de fonction inconnue. Ce gène code potentiellement pour un canal chlore activé par le calcium.

En conclusion, l'identification d'un nouveau gène d'ataxie récessive codant pour un canal ionique souligne l'hétérogénéité physiopathologique des ataxies. Le tableau clinique chez les différents patients semble être homogène, avec atrophie cérébelleuse sévère, âge de début entre 13 et 45 ans (moyenne 24 ans) et réflexes ostéo-tendineux vifs sans signe de Babinski et sans spasticité (Tableau 1; Manuscrit 4).

Targeted Next-Generation Sequencing of a 12.5 Mb Homozygous Region Reveals *ANO10* Mutations in Patients with Autosomal-Recessive Cerebellar Ataxia

Sascha Vermeer,^{1,*} Alexander Hoischen,¹ Rowdy P.P. Meijer,¹ Christian Gilissen,¹ Kornelia Neveling,¹ Nienke Wieskamp,¹ Arjan de Brouwer,¹ Michel Koenig,^{5,6} Mathieu Anheim,^{7,8,9,10} Mirna Assoum,⁵ Nathalie Drouot,⁵ Slobodanka Todorovic,¹¹ Vedrana Milic-Rasic,¹¹ Hanns Lochmüller,¹² Giovanni Stevanin,^{8,9,10,13} Cyril Goizet,¹⁴ Albert David,¹⁵ Alexandra Durr,^{7,8,9,10,13} Alexis Brice,^{7,8,9,10,13} Berry Kremer,⁴ Bart P.C. van de Warrenburg,³ Mascha M.V.A.P. Schijvenaars,¹ Angelien Heister,¹ Michael Kwint,¹ Peer Arts,¹ Jenny van der Wijst,² Joris Veltman,¹ Erik-Jan Kamsteeg,¹ Hans Scheffer,^{1,16} and Nine Knoers^{1,16,*}

Autosomal-recessive cerebellar ataxias comprise a clinically and genetically heterogeneous group of neurodegenerative disorders. In contrast to their dominant counterparts, unraveling the molecular background of these ataxias has proven to be more complicated and the currently known mutations provide incomplete coverage for genotyping of patients. By combining SNP array-based linkage analysis and targeted resequencing of relevant sequences in the linkage interval with the use of next-generation sequencing technology, we identified a mutation in a gene and have shown its association with autosomal-recessive cerebellar ataxia. In a Dutch consanguineous family with three affected siblings a homozygous 12.5 Mb region on chromosome 3 was targeted by array-based sequence capture. Prioritization of all detected sequence variants led to four candidate genes, one of which contained a variant with a high base pair conservation score (phyloP score: 5.26). This variant was a leucine-to-arginine substitution in the DUF 590 domain of a 16K transmembrane protein, a putative calcium-activated chloride channel encoded by *anoctamin 10* (*ANO10*). The analysis of *ANO10* by Sanger sequencing revealed three additional mutations: a homozygous mutation (c.1150_1151del [p.Leu384fs]) in a Serbian family and a compound-heterozygous splice-site mutation (c.1476+1G>T) and a frameshift mutation (c.1604del [p.Leu535X]) in a French family. This illustrates the power of using initial homozygosity mapping with next-generation sequencing technology to identify genes involved in autosomal-recessive diseases. Moreover, identifying a putative calcium-dependent chloride channel involved in cerebellar ataxia adds another pathway to the list of pathophysiological mechanisms that may cause cerebellar ataxia.

Autosomal-recessive cerebellar ataxias are a heterogeneous group of rare neurodegenerative disorders in which progressive spinocerebellar ataxia, due to involvement of the cerebellum, brainstem, and/or spinocerebellar long tracts, is the key feature. Clinically, patients are characterized by gait and balance impairment, upper limb coordination problems, and impairment of speech, swallowing, and eye movements. The overall prevalence is estimated to be around five to six per 100,000.¹ Autosomal-recessive cerebellar ataxias are often associated with other neurological (e.g., polyneuropathy, spasticity) or nonneurological (e.g., cardiomyopathy, cataract) symptoms and can thus lead to complex phenotypes. Most autosomal-recessive ataxias have an early onset age, formerly defined as < 20 years of age,² but some have been shown to begin much later. In contrast to the rapidly increasing number of genes involved

in the autosomal-dominant cerebellar ataxias, the molecular background of the recessive cerebellar ataxias has been only partly elucidated. Many patients with a recessive ataxia are therefore still left without a molecular diagnosis.

Here, we describe the identification of a gene involved in autosomal-recessive cerebellar ataxia, with downbeat nystagmus and involvement of lower motor neurons as additional clinical features. The gene was identified in a Dutch remotely consanguineous family (Figure 1A). The current study was approved by the Medical Ethics Committee of the Radboud University Nijmegen Medical Centre. Written informed consent to participate in the study was obtained from the patients and their participating relatives (and all other patients described in this paper). All three affected siblings from this family displayed impaired coordination of limbs and gait with an

¹Department of Human Genetics, Radboud University Nijmegen Medical Centre, 6500 HB Nijmegen, The Netherlands; ²Department of Physiology, Radboud University Nijmegen Medical Centre, 6500 HB Nijmegen, The Netherlands; ³Department of Neurology, Radboud University Nijmegen Medical Centre, 6500 HB Nijmegen, The Netherlands; ⁴Department of Neurology, University Medical Center Groningen, 9713 GZ Groningen, The Netherlands; ⁵Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), INSERM-U964/CNRS-UMR7104/Université de Strasbourg, 67404 Illkirch, France; ⁶Laboratoire de Diagnostic Génétique, Nouvel Hôpital Civil, 67091 Strasbourg, France; ⁷Centre de Référence des Maladies Neurogénétiques de l'Enfant et de l'Adulte, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, 75013 Paris, France; ⁸Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle Épinière, UMR-S975,75005 Paris, France; ⁹INSERM, U975, 75013 Paris, France; ¹⁰AP-HP, Hôpital de la Salpêtrière, Département de Génétique et Cytogénétique, 75013, Paris, France; ¹¹Clinic for Pediatric and Adolescent Neurology and Psychiatry, Medical Faculty, University of Belgrade, Dr Subotica 6a, 11000 Belgrade, Serbia; ¹²Institute of Human Genetics, Newcastle University, International Centre for Life, Central Parkway, Newcastle-upon-Tyne NE1 3BZ, UK; ¹³CNRS, UMR 7225, 75013 Paris, France; ¹⁴Laboratoire de Génétique Humaine, Université Victor Segalen Bordeaux 2 et Service de Génétique Médicale, CHU Pellegrin, 33076 Bordeaux cedex, France; ¹⁵Service de Génétique Médicale Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, 44093 Nantes, France

¹⁶These authors contributed equally to this work

*Correspondence: s.vermeer@antrg.umcn.nl (S.V.), n.knoers@antrg.umcn.nl (N.K.)

DOI 10.1016/j.ajhg.2010.10.015. ©2010 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved.

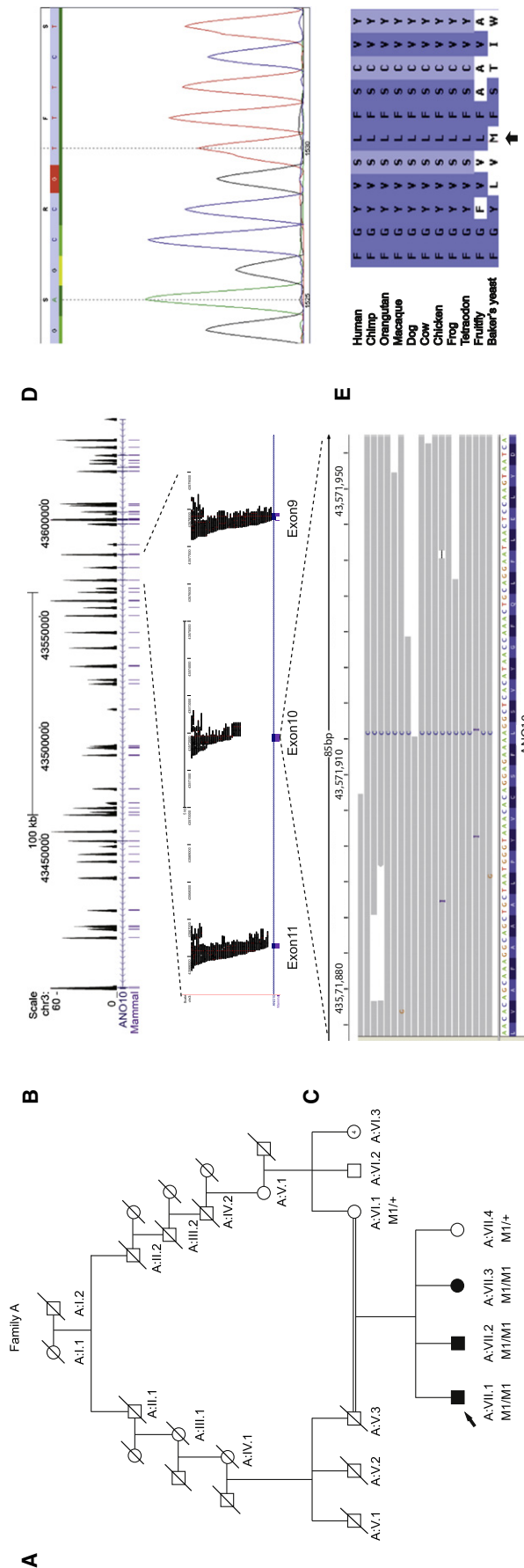


Figure 1. Identification of *ANO10* Mutation in the Dutch Family A with Autosomal-Recessive Cerebellar Ataxia

(A) Pedigree for the Dutch family A together with the segregation of the mutation identified in this family. M1/M1 indicates homozygous carriers of the p.Leu510Arg mutation, and M1/+ indicates heterozygous carriers. The proband is indicated by an arrow. Unfortunately, DNA was not available for individual A:V.3.

(B) Coverage histogram of *ANO10*. Upper part: Sequence-read histograms uploaded to the UCSC Genome Browser display the sequencing depth of all exons of *ANO10*. Tracks displayed: scale, chromosomal position, read depth histogram per bp (between 0 and 60-fold coverage; higher than 60-fold coverage is not displayed), RefSeq gene track, highly conserved elements (Phast-Cons Placental Mammal Conserved Elements, 28-way Multiz Alignment). Lower part: Next-generation sequencing-read coverage of *ANO10* exons 8–10. Tracks displayed: scale, chromosomal position, individual 454 sequencing reads, RefSeq gene track.

(C) Mutation visualization in the IGV browser. Individual reads overlapping with the mutation are displayed. Seventeen of eighteen reads show the homozygous mutation at genomic position chr3:43571913 (the reads are mapped and displayed on the + strand).

(D) Verification by Sanger sequencing of missense mutation c.1529T>G (p.Leu510Arg) in *ANO10* (accession number NM_018075.3).

(E) Sequence comparison of *ANO10* in different species. The amino acid that is mutated in the Dutch family is depicted, indicated by an arrow. The amino acid is highly conserved throughout different species, including the fruit fly.

onset between 20 and 35 years. Neurological investigation revealed a gaze-evoked downbeat nystagmus with hypermetric saccades, dysarthric speech, and brisk knee reflexes. Mild atrophy of the upper part of the lower limbs with fasciculations was observed in two of the three affected siblings. These two also had evidence of lower motor neuron involvement on electromyography (Table 1). In all three affected siblings, brain imaging displayed marked cerebellar atrophy with normal supratentorial structures (Figure S1, available online).

Homozygosity mapping using a 10K SNP array identified five homozygous regions on chromosomes 3, 6, 10, 12, and 16. Only the region on chromosome 3 was confirmed by further fine mapping with short tandem repeat markers, which showed a locus of approximately 10.5 Mb on chromosome 3p21.32-p22.3 with a LOD score of 3.6 in this Dutch family. This locus could be further confirmed and fine mapped with the use of a 6.0 SNP array (Affymetrix) interrogating over 900,000 SNPs. The multipoint LOD score calculations and haplotype analysis were performed with GeneHunter (version 2.1, release 5.05) in the easy-LINKAGE software package and HaploPainter software. Within the major locus more than 80 genes are located, of which 15 candidate genes were sequenced by traditional Sanger sequencing, selected on the basis of their known function and cerebellar expression. No mutations could be identified in these genes. Subsequently, we targeted the entire 12.5 Mb region on chromosome 3, as well as nine smaller homozygous regions on chromosomes 1, 2, 3, 4, and 14, for array-based sequence capture followed by next-generation sequencing (Table S1a). The array

Table 1. Clinical Features of Patients with Recessive Cerebellar Ataxia and Mutations in *ANO10*

Patient	A:VII.1	A:VII.2	A:VII.3	B:II.3	B:II.4	B:II.5	C:II.1	C:II.3
Age	50	48	47	42	39	35	60	55
Sex	M	M	F	F	F	M	F	F
Age at onset (yrs)	25	20	32	15	15	13	45	25
Age at assessment	50	48	47	42	39	35	57	49
Mental retardation	no	no	no	yes (mild)	yes (moderate)	no	no	no
Ocular pursuit	downbeat nystagmus	downbeat nystagmus	downbeat nystagmus	horizontal and vertical nystagmus	horizontal and vertical nystagmus	horizontal nystagmus	saccadic pursuit, nystagmus	multidirectional nystagmus
Saccades	hypermetric	hypermetric, slow (vertical)	hypermetric	hypermetric, mild	no	hypermetric, mild	no	slow saccades
Cerebellar dysarthria	moderate	moderate	mild	moderate	mild	moderate	moderate	moderate
Gait ataxia	moderate	moderate	mild	moderate	moderate	moderate	severe	moderate
Appendicular ataxia	moderate	moderate	mild	mild	mild	mild	moderate	moderate
Tendon reflexes: UL	increased	increased	increased	increased	increased	increased triceps	increased	increased
Tendon reflexes: LL (knee)	increased	increased	increased	increased	increased	increased	increased	increased
Tendon reflexes: LL (ankle)	increased	normal	increased	increased	normal	normal	increased	increased
Plantar responses	extensor	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal/ Babinski
Other features	cold and blue toes	wasting and fasciculations proximal leg muscles, cold and blue fingers and toes	cold and blue fingers and toes	inspiratory stridor	pes cavus	fasciculations leg muscles, inspiratory stridor and vocal cord paresis	mild lower limb spasticity, slight rest tremor, pes cavus	episodic diplopia, pes cavus
EMG	motor neuron involvement	motor neuron involvement	not done	not done	not done	motor neuron involvement	not done	normal
Cerebellar atrophy seen on MRI or CT	severe	severe	severe	severe	severe	severe	not done	severe
Tortuosity of conjunctival vessels	absent	absent	absent	present	present	present	absent	absent

design included all known exons, untranslated regions (UTRs), microRNAs, and highly conserved regions (Phast-Cons Conserved Elements, 28-way MostCons Plac Mammal Multiz Alignment, LOD score ≥ 100) for all homozygous regions.^{3,4} An additional 30 base pair (bp) sequences flanking all exons were added to the regions that were captured on the array so as to enable the detection of splice-site mutations. Targets smaller than 250 bp, which is, based upon our experience, the minimum size for the DNA capture protocol used, were enlarged by ex-

tending both ends of the region. The targeted sequences comprise 1,905,376 bp in total (Table S1b), and include 1245 exons from 117 RefSeq genes and 187 UCSC genes, as well as seven microRNAs and noncoding RNAs. After stringent probe selection by NimbleGen (Roche NimbleGen, Madison, WI, USA) (uniqueness tested by Sequence Search and Alignment by Hashing Algorithm [SSAHA]), a total of 2,178,492 bases (Table S1c) were represented on an array, with 385,000 oligonucleotide probes targeting the regions of interest. Sequence capture was performed

Table 2. Overview of the Mutations Identified in *ANO10*

Family	Proband	No. of Affected Siblings with the Mutation	Mutation (cDNA Level)	Mutation (Protein Level)	Frequency in Control Alleles
A	VII.1	3	c.1529T>G/c.1529T>G	p.Leu510Arg (homo)	0/300
B	II.5	3	c.1150_1151del/ c.1150_1151del	p.Leu384fs (homo)	0/300
C	II.3	2	c.1476+1G>T/c.1604del	^a /p.Leu535X (hetero)	0/300

^a The effect of the splice-site mutation at the protein level has not been studied

in accordance with the manufacturer's instructions (Roche NimbleGen), with the use of the Titanium optimized protocol. In brief, 5 µg of genomic DNA of the proband (Figure 1A) was used in the preparation of the DNA library for sequence-capture hybridization. A final amount of 3 µg prehybridization ligation-mediated-PCR-amplified DNA was hybridized to the customized array, eluted after 72 hr of hybridization, and amplified by posthybridization LM-PCR. The amplified captured sample was then used as input for emulsion PCR amplification and subsequent sequencing with the use of a Roche 454 GS FLX sequencer with Titanium series reagents.

The sample was sequenced by using one-quarter plate of a Roche sequencing run, yielding 83.7 Mb of sequence data. Approximately 95.0% of the sequence data mapped back to unique regions of the human genome (hg18, NCBI build 36.1), with the use of the Roche Newbler software (version 2.3). Of all mapped reads, 93.5% were located on or near the targeted regions (i.e., within 500 bp proximity) (Table S2). This was sufficient to reach an average of 32-fold coverage for all target regions. For the region of interest, less than 1% of all targeted sequences were not covered, and only 4.2% of the target sequence was covered fewer than ten times (11% was covered less than 15-fold).

The Roche software detected a total of 3917 high-confidence variants, identifying the variant in at least three reads. We used a custom-made data analysis pipeline as described by Hoischen et al.⁵ to annotate detected variants with various types of information, including known SNPs, amino acid substitutions, genomic location, and evolutionary conservation. A total of 3352 variants were found to correspond to known SNPs, and 169 variants overlapped with a known polymorphic region (dbSNP130) and were therefore considered not likely to be disease-causing variants. Of all remaining 396 variants, there were three potential splice-site variants, two synonymous coding variants, and five nonsynonymous coding variants; of these ten variants, only four were called as homozygous variants (i.e., > 80% variant reads) (Tables S2 and S3). Of the four remaining candidates, only two variants were conserved during evolution,⁶ one of which had previously been reported in our internal variant database in a patient with a different disorder. The remaining single candidate was a homozygous T>G change in *ANO10* that was highly conserved (phyloP score: 5.26) and also scored high on the Grantham scale (145) (Table S3).

ANO10 consists of 13 exons, 12 of which are coding, spanning 2734 bp and 660 amino acids (NM_018075.3). All exons of *ANO10* were covered by sequence reads from the targeted next-generation sequencing experiment (Figure 1B). The homozygous T>G change at position 1529 that was detected by next-generation sequencing occurred in exon 10 and is predicted to result in an amino acid substitution of leucine by arginine at codon 510 (p.Leu510Arg). The mutated nucleotide (at position g.43,571,913; hg18, NCBI build 36.1) was covered by 18 unique sequence reads. In 17 reads, the mutant allele was detected, indicating that the mutation is present in a homozygous state (Figure 1C). The c.1529T>G (p.Leu510Arg) mutation was confirmed by conventional Sanger sequencing and cosegregated with the disease in this family (Figures 1A and 1D). The mutation was not present in over 300 control alleles (Table 2). This residue is conserved across multiple vertebrate species (Figure 1E) and is located in the DUF590 domain, a domain of unknown function.

Next, we analyzed this gene by conventional Sanger sequencing in a consanguineous family (family B) with three affected siblings of Romani ethnic origin from Serbia (primer sequences are listed in Table S4). In family B an independent linkage analysis was performed, and the candidate region overlapped with the whole region in the Dutch family initially studied (data not shown). A homozygous 2 bp deletion (TT) at position 1150 (c.1150_1151del) was identified, leading to a frameshift (p.Leu384fs) in exon 6 (Table 2). This frameshift mutation cosegregated with the disease in this family (Figure 2) and introduces a stop codon at position 474. The mutation was not present in the dbSNP130 database and was not detected in over 300 control alleles. The affected siblings in this second cerebellar ataxia family also manifested tortuosity of conjunctival vessels and intellectual disability in two siblings (Table 1). Furthermore, *ANO10* mutation analysis was performed in a large cohort of 282 index patients with cerebellar ataxia with presumable autosomal-recessive inheritance. In most patients of this cohort, Friedreich ataxia (FA [MIM 22930]) had already been excluded by mutation analysis of *FRDA*. Two compound-heterozygous mutations, a splice-site mutation in exon 9 (c.1476+1G>T) and a nonsense mutation in exon 10 (c.1604del [p.Leu535X]), were identified in a single family (family C) with two affected siblings of French descent (Figure 2). The phenotype of these patients is

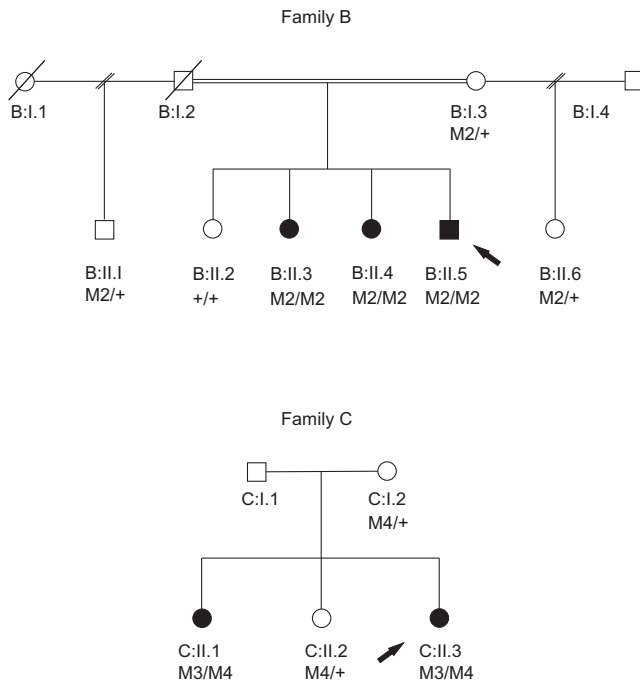


Figure 2. Pedigree Structure of Two Additional Families, B and C Pedigrees for family B, from Serbia, and family C, from France, together with the segregation of the mutations identified in these families. M2/M2 indicates homozygous carriers of the p.Leu384fs mutation, and M2/+ indicates heterozygous carriers, whereas +/+ indicates individuals with two wild-type alleles. M3/M4 indicates compound-heterozygous carriers for the c.1476+1G>T and the p.Leu535X mutations, and M4/+ indicates heterozygous carriers for the p.Leu535X mutation.

For family B, the degree of consanguinity is not known. Unfortunately, DNA was not available for individual C:I.1.

almost identical to the phenotype of the Dutch family (Table 1). An overview of the mutations identified in *ANO10* is presented in Table 2. So far, we have identified 29 different SNPs in this gene.

In adult tissues, *ANO10* has the highest expression in the brain, as shown by quantitative PCR (qPCR) (Figure 3A). Medium expression levels were found in the retina and heart, and low expression levels were found in other tissues tested. Comparing the *ANO10* expression levels between several adult brain areas showed the highest expression levels in the frontal and occipital cortices and in the cerebellum (Figure 3B). In addition, we found that the expression of *ANO10* in the fetal brain is lower than in the adult whole brain, indicating a specific function for *ANO10* in the adult mature brain and especially in the cerebral cortex and the cerebellum, rather than in brain development, although a role of this gene in brain development cannot be excluded. The expression profile is consistent with the relatively late onset of ataxia. However, *ANO10*, as well as *ANO2* (MIM 610109) and *ANO8* (MIM 610216), were detected with similar distributions in the mantle layer of the neural tube and in the dorsal root ganglia at embryonic day 14.5 in murine embryos.⁷ Furthermore, expression studies during cephalic development in the mouse seems to show embryonic expression of *ANO10* during brain development.⁸

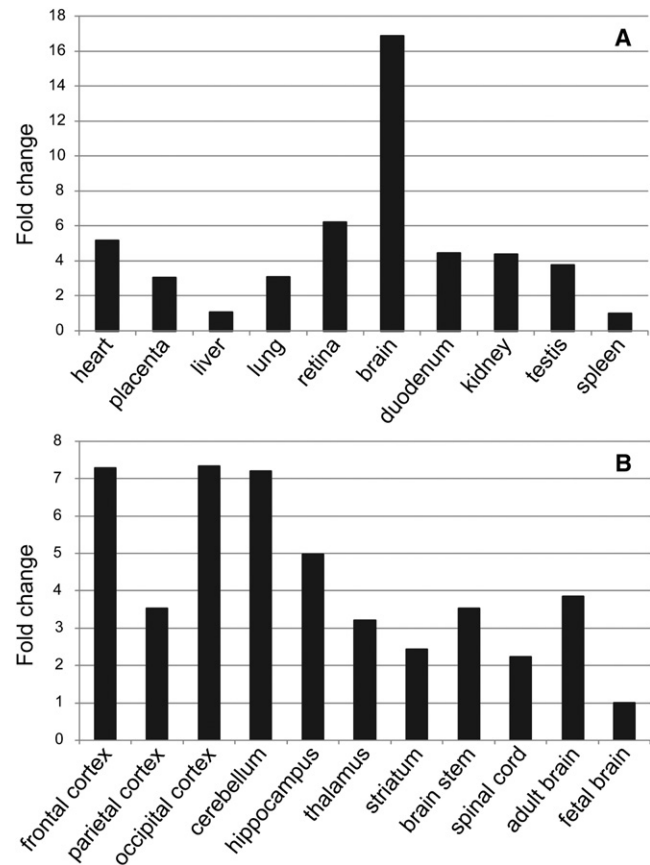


Figure 3. Expression of ANO10 in Different Human Tissues, Seen by qPCR

(A) Expression of *ANO10* in different adult tissues, with the highest expression seen in the brain.

(B) Expression of *ANO10* in different brain tissues, with the highest expression seen in the adult cerebellum and frontal and occipital cortices.

ANO10, also known as TMEM16K (transmembrane 16K), is a member of the human anoctamin (ANO) family, which comprises at least nine other proteins, all exhibiting eight transmembrane domains and a DUF590 domain of unknown function.^{9,10} Only very recently, it was proposed that some or all of the anoctamin genes code for cell- and tissue-specific calcium-activated chloride channels.^{11–13} In murine tissues, *ANO10* is predominantly expressed in epithelial cells next to *ANO1* (MIM 610108), *ANO6* (MIM 608663), *ANO7* (MIM 605096), *ANO8*, and *ANO9*, whereas *ANO2*, *ANO3* (MIM 610110), *ANO4* (MIM 610111), and *ANO5* (MIM 608662) expression seem common in neuronal and muscle tissues. On the basis of results of the functional studies done by Schreiber et al., it appears likely that different anoctamins interact with each other.¹¹

It is known that calcium-activated chloride channels have important physiological functions, including, among others, regulation of neuronal excitability.¹⁴ Whether *ANO10* really codes for a calcium-regulated chloride channel remains to be confirmed. In the phylogenetic tree of anoctamin genes, *ANO1* is the member most distant

from *ANO10*. A total of ~25 amino acids are missing from the region coding for the reentrant loop between TM5 and TM6 in *ANO10*, compared to *ANO1*,¹⁰ possibly blocking the proper formation of a channel. It is also possible that the *ANO10* product can function only in combination with other anoctamins to form heteromeric channels. Notwithstanding this, it is tempting to speculate that *ANO10* indeed encodes a (subunit of a) calcium-regulated chloride channel. Deranged calcium signaling in Purkinje cells is one of the major mechanisms causing cerebellar ataxia.^{15,16} Several products of known ataxia-associated genes, such as calcium pumps and voltage-gated sodium or potassium channels, may increase or dampen calcium-signaling pathways in Purkinje cells.^{17–20} It could well be that the *ANO10* product, which is postulated to be a calcium-dependent chloride channel, is also a player influencing calcium signaling in Purkinje cells, and a dysfunctional or absent *ANO10* product may cause cerebellar ataxia via this mechanism. The identification of a putative chloride channel involved in a relatively pure, nonepisodic cerebellar ataxia may thus shed new light on the pathological mechanisms leading to cerebellar degeneration. Different molecular pathways, such as mitochondrial- and DNA-repair dysfunction, are already known to be involved. As mentioned, in autosomal-dominant cerebellar ataxias, involvement of calcium, sodium, and potassium channels has been demonstrated.^{19,21,22} However, to our knowledge, the involvement of a (calcium-activated) chloride channel in a cerebellar neurodegenerative disease has not yet been reported. Chloride channels are known to be involved in other diseases, such as myotonia congenita (MIM 160800 and MIM 255700), Dent disease (MIM 300009), cystic fibrosis (MIM 219700), and Bartter syndrome (MIM 602522).^{23–26} At present, however, the basic function of *ANO10* is poorly understood, and so far most functional studies of anoctamins have been performed with *ANO1*.

Dominant mutations in *ANOS* (also known as *GDD1*) have been associated with a rare skeletal disorder called gnathodiaphyseal dysplasia (GDD [MIM 166260]).²⁷ Recently, recessive mutations in *ANOS* have been identified in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2L (LGMD2L [MIM 611307]) and distal nondysferlin Miyoshi myopathy (MMD3 [MIM 613319]).²⁸ So far, no other members of the anoctamin gene family have been associated with genetic diseases in human.

In conclusion, we have identified mutations in *ANO10* associated with autosomal-recessive cerebellar ataxia. This report illustrates that the combination of homozygosity mapping together with targeted array-based sequencing is a powerful tool for identifying causative genes for autosomal-recessive diseases. Mutations in *ANO10* have so far been identified in three different families, with a total of eight patients, originating from the Netherlands, Serbia, and France. The phenotype of the patients is fairly similar (Table 1). Additional functional studies are to be awaited in order to understand how

dysfunction of the *ANO10*-encoded putative chloride channel results in cerebellar ataxia.

Supplemental Data

Supplemental data include one figure and four tables and can be found with this article online at <http://www.cell.com/AJHG/>.

Acknowledgments

We are grateful to the patients for their participation, to the referring clinicians, and especially to C. Haaxma, E. Kamping, E. Mundwiller, and the DNA and Cell Bank of the CR-ICM for their clinical and technical support. This work was supported by a grant from the Netherlands Organization of Health Research and Development (ZonMW RM000085 to N.K.). The next-generation sequencing platforms have been funded in part by the Netherlands Organization for Health Research and Development (ZonMW grants 917-66-36 and 911-08-025 to J.V.). Targeted sequence-capture experiments were performed in part by funding to H.S. from the European Community's Seventh Framework Programme FP7/2007-2013 under grant agreement number 223143 (project acronym: TECHGENE). Furthermore, we would like to thank the Verum Foundation (support to A.B.), the French National Agency for Research (support to A.D., M.K., and G.S.), and Agence Nationale pour la Recherche-Maladies Neurologiques et Psychiatriques (ANR-09-MNPS-001-01; support to M.K., A.D., and A.B.).

Received: August 9, 2010

Revised: October 6, 2010

Accepted: October 14, 2010

Published online: November 18, 2010

Web Resources

The URLs for data presented herein are as follows:

dbSNP, build 130, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_summary.cgi?build_id=130
easyLINKAGE, <http://compbio.charite.de/genetik/hoffmann/easyLINKAGE/>
HaploPainter, <http://haplopainter.sourceforge.net/>
Integrative Genomics Viewer, <http://www.broadinstitute.org/igv>
Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>
RefSeq, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>
University of California-Santa Cruz (UCSC) Genome Bioinformatics, <http://www.genome.ucsc.edu>

References

1. Anheim, M., Fleury, M., Monga, B., Laugel, V., Chaigne, D., Rodier, G., Ginglinger, E., Boulay, C., Courtois, S., Drouot, N., et al. (2010). Epidemiological, clinical, paraclinical and molecular study of a cohort of 102 patients affected with autosomal recessive progressive cerebellar ataxia from Alsace, Eastern France: implications for clinical management. *Neurogenetics* 11, 1–12.
2. Harding, A.E. (1983). Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet* 1, 1151–1155.

- Siepel, A., Bejerano, G., Pedersen, J.S., Hinrichs, A.S., Hou, M., Rosenbloom, K., Clawson, H., Spieth, J., Hillier, L.W., Richards, S., et al. (2005). Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res.* 15, 1034–1050.
- Blanchette, M., Kent, W.J., Riemer, C., Elnitski, L., Smit, A.F., Roskin, K.M., Baertsch, R., Rosenbloom, K., Clawson, H., Green, E.D., et al. (2004). Aligning multiple genomic sequences with the threaded blockset aligner. *Genome Res.* 14, 708–715.
- Hoischen, A., van Bon, B.W., Gilissen, C., Arts, P., van Lier, B., Steehouwer, M., de Vries, P., de Reuver, R., Wieskamp, N., Mortier, G., et al. (2010). De novo mutations of SETBP1 cause Schinzel-Giedion syndrome. *Nat. Genet.* 42, 483–485.
- Pollard, K.S., Hubisz, M.J., Rosenbloom, K.R., and Siepel, A. (2010). Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies. *Genome Res.* 20, 110–121.
- Rock, J.R., Futtner, C.R., and Harfe, B.D. (2008). The transmembrane protein TMEM16A is required for normal development of the murine trachea. *Dev. Biol.* 321, 141–149.
- Gritli-Linde, A., Vaziri Sani, F., Rock, J.R., Hallberg, K., Iribarne, D., Harfe, B.D., and Linde, A. (2009). Expression patterns of the Tmem16 gene family during cephalic development in the mouse. *Gene Expr. Patterns* 9, 178–191.
- Galindo, B.E., and Vacquier, V.D. (2005). Phylogeny of the TMEM16 protein family: some members are overexpressed in cancer. *Int. J. Mol. Med.* 16, 919–924.
- Hartzell, H.C., Yu, K., Xiao, Q., Chien, L.T., and Qu, Z. (2009). Anoctamin/TMEM16 family members are Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *J. Physiol.* 587, 2127–2139.
- Schreiber, R., Uliyakina, I., Kongsuphol, P., Warth, R., Mirza, M., Martins, J.R., and Kunzelmann, K. (2010). Expression and function of epithelial anoctamins. *J. Biol. Chem.* 285, 7838–7845.
- Yang, Y.D., Cho, H., Koo, J.Y., Tak, M.H., Cho, Y., Shim, W.S., Park, S.P., Lee, J., Lee, B., Kim, B.M., et al. (2008). TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* 455, 1210–1215.
- Caputo, A., Caci, E., Ferrera, L., Pedemonte, N., Barsanti, C., Sondo, E., Pfeiffer, U., Ravazzolo, R., Zegarra-Moran, O., and Galiotta, L.J. (2008). TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science* 322, 590–594.
- Hartzell, C., Putzier, I., and Arreola, J. (2005). Calcium-activated chloride channels. *Annu. Rev. Physiol.* 67, 719–758.
- Carlson, K.M., Andresen, J.M., and Orr, H.T. (2009). Emerging pathogenic pathways in the spinocerebellar ataxias. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19, 247–253.
- Kasumu, A., and Bezprozvanny, I. (2010). Deranged Calcium Signaling in Purkinje Cells and Pathogenesis in Spinocerebellar Ataxia 2 (SCA2) and Other Ataxias. *The Cerebellum*. Published online May 18, 2010. 10.1007/s12311-010-0182-9.
- Saegusa, H., Wakamori, M., Matsuda, Y., Wang, J., Mori, Y., Zong, S., and Tanabe, T. (2007). Properties of human Cav2.1 channel with a spinocerebellar ataxia type 6 mutation expressed in Purkinje cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 34, 261–270.
- van de Leemput, J., Chandran, J., Knight, M.A., Holtzclaw, L.A., Scholz, S., Cookson, M.R., Houlden, H., Gwinn-Hardy, K., Fung, H.C., Lin, X., et al. (2007). Deletion at ITPR1 underlies ataxia in mice and spinocerebellar ataxia 15 in humans. *PLoS Genet.* 3, e108.
- Waters, M.F., Minassian, N.A., Stevanin, G., Figueroa, K.P., Bannister, J.P., Nolte, D., Mock, A.F., Evidente, V.G., Fee, D.B., Müller, U., et al. (2006). Mutations in voltage-gated potassium channel KCNC3 cause degenerative and developmental central nervous system phenotypes. *Nat. Genet.* 38, 447–451.
- Trudeau, M.M., Dalton, J.C., Day, J.W., Ranum, L.P., and Meisler, M.H. (2006). Heterozygosity for a protein truncation mutation of sodium channel SCN8A in a patient with cerebellar atrophy, ataxia, and mental retardation. *J. Med. Genet.* 43, 527–530.
- Zhuchenko, O., Bailey, J., Bonnen, P., Ashizawa, T., Stockton, D.W., Amos, C., Dobyns, W.B., Subramony, S.H., Zoghbi, H.Y., and Lee, C.C. (1997). Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nat. Genet.* 15, 62–69.
- Brusse, E., de Koning, I., Maat-Kievit, A., Oostra, B.A., Heutink, P., and van Swieten, J.C. (2006). Spinocerebellar ataxia associated with a mutation in the fibroblast growth factor 14 gene (SCA27): A new phenotype. *Mov. Disord.* 21, 396–401.
- Lloyd, S.E., Pearce, S.H., Fisher, S.E., Steinmeyer, K., Schwapach, B., Scheinman, S.J., Harding, B., Bolino, A., Devoto, M., Goodyer, P., et al. (1996). A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature* 379, 445–449.
- Koch, M.C., Steinmeyer, K., Lorenz, C., Ricker, K., Wolf, F., Otto, M., Zoll, B., Lehmann-Horn, F., Grzeschik, K.H., and Jentsch, T.J. (1992). The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* 257, 797–800.
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L., et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245, 1066–1073.
- Birkenhäger, R., Otto, E., Schürmann, M.J., Vollmer, M., Ruf, E.M., Maier-Lutz, I., Beekmann, F., Fekete, A., Omran, H., Feldmann, D., et al. (2001). Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nat. Genet.* 29, 310–314.
- Tsutsumi, S., Kamata, N., Vokes, T.J., Maruoka, Y., Nakakuki, K., Enomoto, S., Omura, K., Amagasa, T., Nagayama, M., Saito-Ohara, F., et al. (2004). The novel gene encoding a putative transmembrane protein is mutated in gnathodiaphyseal dysplasia (GDD). *Am. J. Hum. Genet.* 74, 1255–1261.
- Bolduc, V., Marlow, G., Boycott, K.M., Saleki, K., Inoue, H., Kroon, J., Itakura, M., Robitaille, Y., Parent, L., Baas, F., et al. (2010). Recessive mutations in the putative calcium-activated chloride channel Anoctamin 5 cause proximal LGMD2L and distal MMD3 muscular dystrophies. *Am. J. Hum. Genet.* 86, 213–221.

Figure S1A

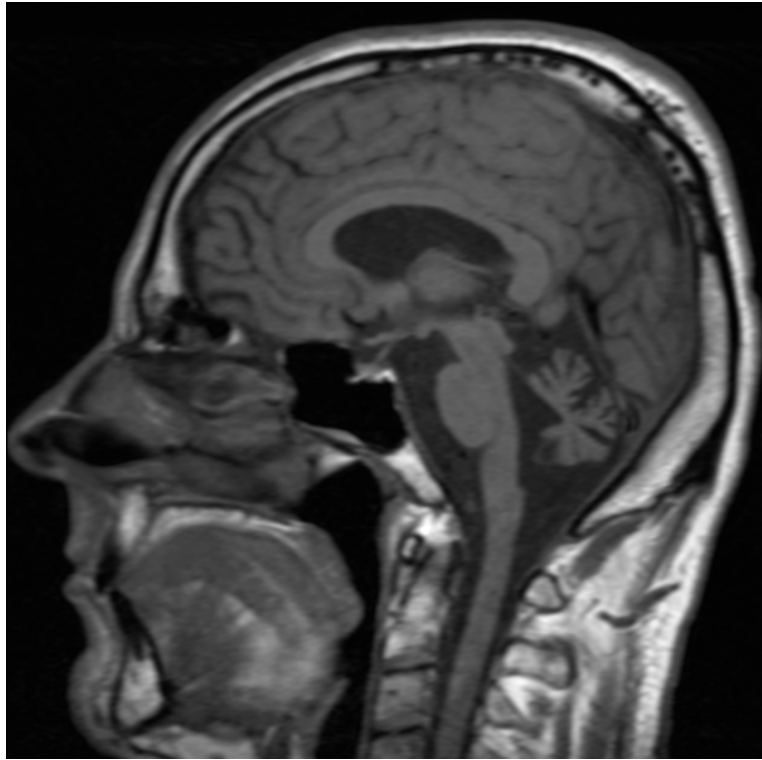
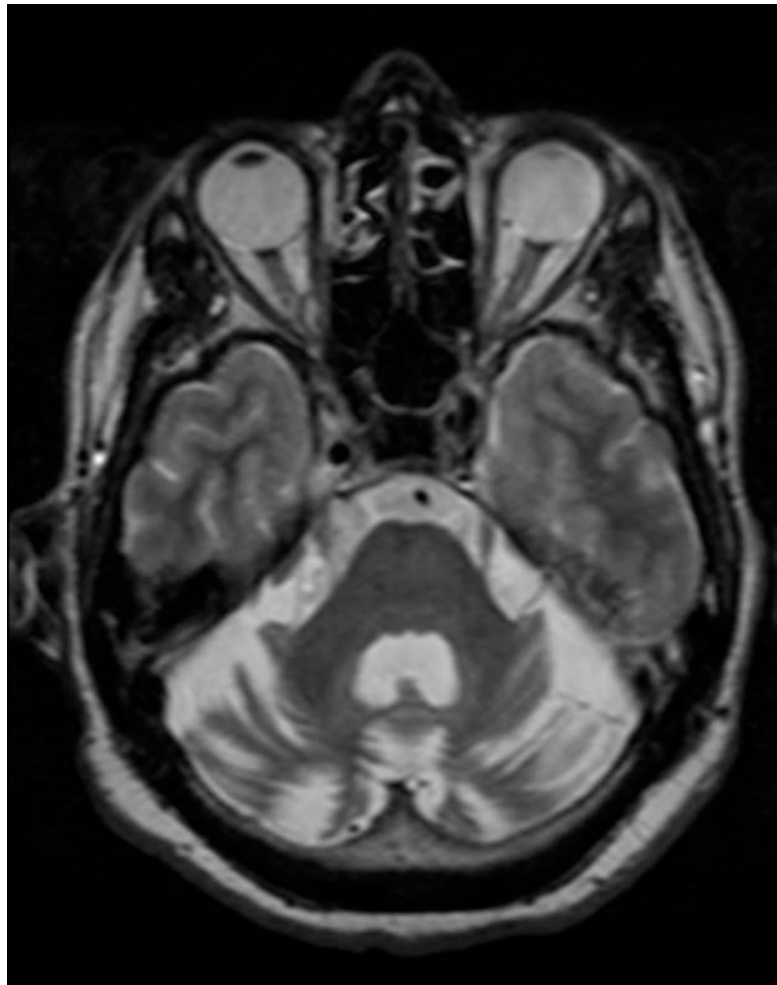


Figure S1B



Supplementary

Supplementary Table 1:

Table S1a

Chromosome	start	end	size
Chr.1	77,105,773	78,116,669	1,010,896
Chr.1	91,918,489	93,199,672	1,281,183
Chr.2	140,705,465	142,605,740	1,900,275
Chr.3	17,173,658	17,869,885	696,227
Chr.3	32,123,105	33,009,854	886,749
Chr.3	34,355,326	44,599,977	10,244,651
Chr.3	78,729,077	80,456,380	1,727,303
Chr.3	126,284,169	127,489,262	1,205,093
Chr.3	131,245,012	131,313,041	68,029
Chr.4	147,394,586	147,692,007	297,421
Chr.14	59,132,446	59,624,078	491,632
Sum			19,809,459

Table S1b

Chromosome	start	end	size
Chr.3	33013104	34350380	1337277

Table S1c

Total bp targeted
1905376

Table S1d

Total bp tiled
2178492

Table S2

Coverage statistics		Variant statistics	
Total number of mapped bases	109,790,683	Number of variants detected	3917
% bases mapped to or near (500bp) targets	93.50%	Known SNPs (dbSNP130)	3521
Average coverage of the targets	32.28x	Novel variants of those:	396
% targets covered at least 1x	99.01%	Splice site (SS) or coding variants	10
% targets covered at least 5x	98.48%	Non synonymous (NS) or SS	8
% targets covered at least 10x	95.80%	Homozygous SS or NS	4
% targets covered at least 15x	89.77%		
% targets covered at least 20x	79.66%		

Table S3

Chr	Position	Ref	Var	% Var	Gene	Gene Id	Ref AA	Mut AA	PhyloP	Grantham
chr2	1.41E+08	A	-	89	LRP1B	NM_018557	SS		0.40	0
chr3	36754018	C	G	98	DCLK3	NM_033403	R	S	0.24	0
chr3	43571913	A	C	94	ANO10	NM_018075	L	R	5.26	145
chr3	43718918	G	T	100	ABHD5	NM_016006	R	L	2.65	102

Table S4

Exon	Forward (5' > 3')	Reverse (5' > 3')	Amplicon Length (bp)
1	TACGATCGCCCAGTGAGG	GCTCTGTGGCTGCAAGG	340
2	TGCTTTTATCTTGGAAGCCAG	GGGAGGCTGAGCATACAGTG	327
3	AAAGAAGTCCATCCCTAATG	AAAAAGTTTGCTGATCCCTGA	457
4	CATACTGCTTTCTGCTCATTGG	ATTTTCATGTACAATGTTAGGGC	744
5	TGAAGCGTATCATGCACAATC	ATATCTGCCCAAGGGAGCTG	275
6-1	AGGGTTGAATGATCCCCAC	AAATGCGCAACTGTCTCTTG	459
6-2	AACATGACCTACAGGTGGGG	TGTGAATCCCATGATCTAGGC	435
7	GACTGAGGCTCTGATGTTGG	TCAATCCTTGCCTATTTGCAC	304
8	AGGCTGGGAGCTGTAGACTG	GCATAATACACAATGCCATTCC	399
9	GAAACACCATTCTAACACCTAGC	AGCAGTGCTTCAATGCAAAG	569
10	AGAGGCCACAGCTTTGATTAG	TTCCCTGTCATAACACCTCG	341
11	AGGATGAGGAAATATGGAAGC	TTGCTCAATTGTCAGTCATGG	290
12	GGCCTGCTTGGTCTTTGATAC	TCCTGAACTGGAGTCCTCTG	404
13-1	GCTTCCACAGAGAGCAGAGG	ACTGCTATGAGGGGAACGTG	490
13-2	CCTTCTCAGTTTCGCAGTGG	ATCTCACCGCTCCACCTTC	499

Legends to supplementary figures

Figure S1. Magnetic resonance imaging of one of the affected patients displaying marked diffuse cerebellar atrophy both on sagittal (A) and axial (B) images.

Table S1. Target regions of the two different arrays.

- 1a. Target regions of second array, current study.
- 1b. Target regions of first 1Mb array, previous study (Hoischen et al. 2010).
- 1c. Base pairs that were targeted on the second array.
- 1d. Total base pairs targeted after probe selection on the second array.

Table S2. General statistics of the sequencing run.

Left side: statistics on the sequence coverage. Right side: statistics on the detected variants by the Roche 454 software. Known SNPs are only variants with the exact nucleotide change as described in dbSNP.

Table S3. Overview of variants after initial prioritization.

Columns are from left to right: chromosome (Chr), position of the variant (Position), reference allele on the plus strand (Ref), variant allele on the plus strand (Var), percentage of reads with the variant allele (% Var), gene name in which the variant is located (Gene), RefSeq gene id (Gene Id), reference amino acid, where “SS” indicates a canonical splice site (Ref AA), variant amino acid (Mut AA), PhyloP log odds ratio for evolutionary conservation (PhyloP) (Pollard et al. 2010) and Grantam score for the amino acid substitution (Grantham). The lightly shaded variant was reported in our internal variant database. The dark shading indicates the causative mutation.

Table S4. Primer sequences of ANO10.

Primers used for amplification and sequence analysis of human ANO10.

References

1. Hoischen A et al (2010) Massively parallel sequencing of ataxia genes after array-based enrichment. *Hum.Mutat.* 31 (4):494-499.
2. Pollard KS et al (2010) Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies. *Genome Res.* 20 (1):110-121.

Chapitre 4 Résultats

I. Manuscript 5: Rundataxin, a novel protein with RUN and diacylglycerol binding domains, is mutant in a new recessive ataxia

II. Caractérisation fonctionnelle de la rundataxine

Manuscript 5: Rundataxin, a novel protein with RUN and diacylglycerol binding domains, is mutant in a new recessive ataxia

Je me suis concentrée par la suite sur l'analyse d'une large famille consanguine AR originaire d'Arabie Saoudite suivie par le Pr. Mustafa Salih (Figure 2A; Manuscrit 5). Les ADNs des parents, des 3 filles atteintes et des cinq enfants sains étaient tous disponibles. Les patientes de cette famille présentent une ataxie avec début précoce, avant l'âge de 7 ans et une dysarthrie. Deux patientes présentent en plus une épilepsie transitoire, sans rechute depuis le traitement instauré à l'âge de 3 ans, et un léger retard mental. Aucune spasticité ou neuropathie périphérique n'a été observée. L'IRM d'une des patientes à l'âge de 18 ans a révélé une atrophie modérée du cervelet avec un aspect folié marqué et une absence d'altération de la substance blanche au niveau du cortex cérébral ce qui suggère une ataxie purement cérébelleuse (Figure 1; Manuscrit 5). Les signes cliniques sont détaillés dans le Tableau 1 et tableau supplémentaire du manuscrit. Deux régions homozygotes ont été identifiées par analyse des puces Affymetrix 10K chez les 3 patientes au niveau des régions 11p13-q12.3 et 3q27.3-q29 (Figure 2B; Manuscrit 5).

Pour confirmer ou exclure la liaison à chacun de ces deux loci, j'ai analysé à l'aide de marqueurs microsatellites les parents et les individus sains. J'ai pu exclure la liaison au locus 11p13-q12.3 car la mère non malade était homozygote à ce locus, certainement parce qu'elle aussi était issue d'un mariage consanguin. En plus, l'enfant atteint P3 a reçu l'allèle supposé sain de sa mère et les enfants sains H2 et H5 partagent les mêmes haplotypes avec leurs sœurs malades P1 et P2 (Figure 2C; Manuscrit 5).

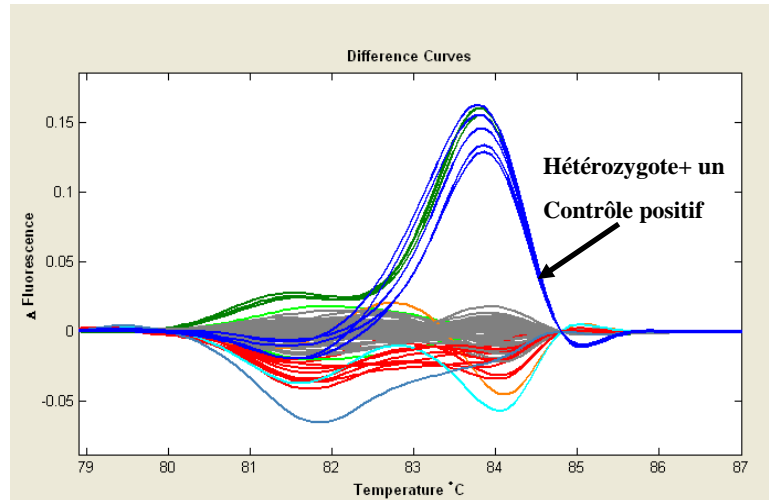
Au niveau du locus 3q27.3-q29, les parents étaient informatifs et les enfants sains ne partageaient pas les mêmes haplotypes que leurs sœurs atteintes ce qui a permis de confirmer la liaison de la maladie à ce locus bien que le LOD score soit de 2,7 (Figure 2D; Manuscrit 5). Une recombinaison chez la patiente P2 entre les SNP rs763342 et rs719872 a permis de réduire l'intervalle à 10,2 Mb. J'ai recherché ensuite avec l'aide de Nathalie Drouot des mutations dans les séquences exoniques et introniques flanquantes de 49 gènes parmi 55 situés dans cet intervalle. La liste de ces gènes et de leur fonction est donnée dans le tableau supplémentaire 2. Deux mutations faux-sens et une délétion d'un seul nucléotide ont été trouvées. Les deux mutations faux-sens, dans les gènes *ATP13A4* (c.1091T>C, p.Val364Ala) (Figure 14.A) et *FAM43A* (c.982G>A, p.G328S), ont été respectivement retrouvées dans plusieurs chromosomes parmi les 622 chromosomes contrôles analysés par profil de

dénaturation thermique (HRM, lightscanner). Ces deux variations sont donc considérées comme étant des polymorphismes. Le gène FAM43A n'a pas de fonction connue.

I. Gène ATP13A4

Le gène *ATP13A4* est un des 5 membres de la famille de transporteurs de cations P5-ATPases présents seulement chez les eucaryotes (Moller et al., 2008). La famille des ATPases de type P comprend une famille ubiquitaire de protéines impliquées dans le transport des substances chargées, le plus souvent des cations, au niveau des pompes actives des membranes biologiques. Les ATPases de type P ont été classées en 5 sous-familles : P1 trouvée chez les mammifères et inclut les K^+ , Cu^{2+} et Cd^{2+} -ATPases; P2 aussi chez les mammifères inclut les Ca^{2+} , Na^+/K^+ et H^+/K^+ -ATPases; P3 trouvée chez les bactéries, les eucaryotes inférieurs et les plantes et inclut les pompes à H^+ et Mg^{2+} ; P4 est présente chez tous les eucaryotes et est impliquée dans le transport des aminophospholipides; et P5 est présente chez les eucaryotes. Les ATPases de type P subissent de grands changements conformationnels lors du transport ionique. Deux conformations sont nommées E1 et E2 (enzyme-1 et enzyme-2) avec une affinité différente pour les nucléotides et les ions transportés (Kuhlbrandt, 2004). *ATP13A4* contient plusieurs régions conservées communes à toutes les ATPases de la famille P: 10 domaines transmembranaires, un domaine cation-ATPase, un domaine ATPase E1-E2 possédant un site de phosphorylation avec un résidu aspartate phosphorylé, et un domaine hydrolase (Figure 14.B). *ATP13A4* montre 57% d'identité à *ATP13A5*, 42% à *ATP13A3* et 38% à *ATP13A2* chez l'homme; cette similarité entre les membres de la famille P5-ATPases est conservée chez la souris (Schultheis et al., 2004). Le transcrit humain *ATP13A4* est exprimé ubiquitairement à la fois dans les tissus fœtaux et adultes .Cependant, son expression au niveau du cerveau est plus faible (Kwasnicka-Crawford et al., 2005). La présence de la variation (p.Val364Ala) du gène *ATP13A4* chez des individus contrôles démontre que cette variation est un polymorphisme rare.

A.



B.

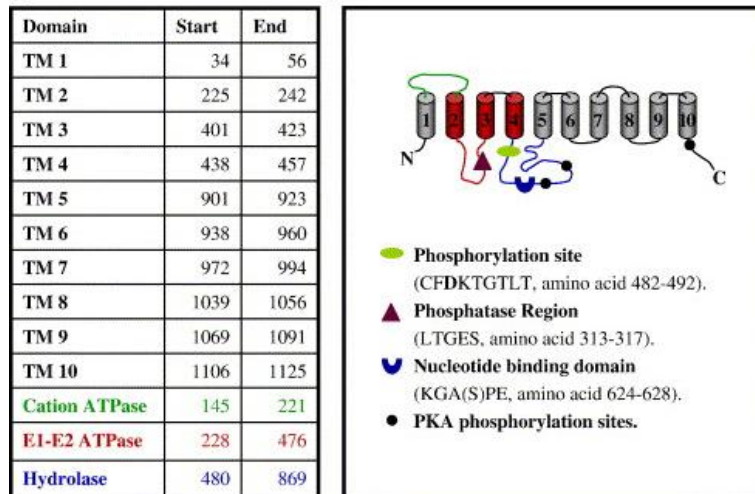


Figure 14: *ATP13A4*

A. Variation faux-sens trouvée chez les patients de la famille AR. Chaque profil (courbe) correspond à un individu contrôle. Un enfant porteur a également été analysé (contrôle positif). La variation est retrouvée à l'état hétérozygote chez des individus contrôles analysés par HRM ce qui démontre qu'il s'agit d'un polymorphisme. La variation a été vérifiée par séquençage chez les individus hétérozygotes.

B. Représentation schématique des différents domaines de l'ATPase ainsi que des sites de phosphorylation.

(d'après Dorota A. Kwasnicka-Crawford et al. Genomics 86 (2005) 182 – 194)

II. Gène KIAA0226

La délétion trouvée à l'état homozygote chez les 3 patientes de cette famille touche un seul nucléotide (2927delC) au niveau de l'exon 19 du gène *KIAA0226* et entraîne un décalage du cadre de lecture (Figure 3A, Manuscrit 5). Cette mutation est absente dans des individus contrôles de différentes origines et analysés par HRM. Le gène *KIAA0226* code pour une protéine de 972 acides aminés et de taille prédite de 108 kDa. Les prédictions bioinformatiques (SMART, Pfam, ...) montrent que *KIAA0226* code pour une nouvelle protéine de fonction inconnue que nous avons nommée «rundataxine» pour RUN-DAG-ataxine puisqu'elle comprend 2 domaines: un domaine RUN et un domaine riche en cystéine et similaire aux domaines de liaison au diacylglycérol (domaine «DAG binding-like») (Figure 3B ; Manuscrit 5). Le domaine RUN est présent dans de nombreuses protéines liées aux petites GTPases des familles Rap et Rab (Callebaut et al., 2001). Au niveau protéique, la mutation (p.Ala875ValfsX146) entraîne l'apparition d'une nouvelle phase de lecture de 146 acides aminés en remplacement du domaine «DAG binding-like», très conservé au cours de l'évolution (Figure 3B; Manuscrit 5). 172 familles d'ataxies récessives de différentes origines ont été analysées pour l'ensemble des 22 exons du gène de la rundataxine par HRM et par séquençage mais aucune autre mutation n'a été trouvée.

Les alignements de séquences homologues montrent que la rundataxine appartient à une famille de 7 paralogues chez l'homme dont 4 constituent la sous-famille M des protéines contenant un domaine d'homologie à la pleckstrine «PH» (PLEKHM-1 à -4) (Figure 3B; Manuscrit 5). La protéine la plus homologue à la rundataxine, contenant à la fois le domaine RUN et le domaine DAG binding-like, est la PLEKHM1. La PLEKHM1 colocalise avec un marqueur des endosomes tardifs de la famille Rab GTPase «Rab7», qui joue un rôle essentiel dans le transport vésiculaire au niveau des ostéoclastes (Van Wesenbeeck et al., 2007; Zhao et al., 2001a). Un homologue lointain, RUFY1 ou Rabip4, un effecteur de Rab4, possède un domaine RUN, 2 domaines de type coiled-coil et un doigt de zinc de type FYVE, riche en cystéine et liant spécifiquement les phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3Ps) (Mari et al., 2001). Rabip4 semble être une protéine des endosomes précoces et colocalise avec l'antigène 1 des endosomes précoces (EEA1, early endosome antigen 1) qui est un effecteur de Rab5 au niveau de ces endosomes. Pour mieux comprendre le rôle physiopathologique de *KIAA0226*, j'ai commencé sa caractérisation fonctionnelle tout d'abord au niveau du transcrit par l'analyse de l'épissage alternatif puis au niveau de la rundataxine normale par l'étude de son

expression et de sa localisation subcellulaire. L'étude de la protéine mutée a été réalisée dans un deuxième temps pour identifier l'impact de cette mutation sur la stabilité et la localisation de cette forme mutée.

II.a Epissage alternatif

J'ai étudié l'expression de *KIAA0226* au niveau de transcrits murins et humains. L'analyse des transcrits murins par RT-PCR montre que *mKiaa0226* est ubiquitaire avec une expression plus marquée au niveau des tissus nerveux (Figure 3C; Manuscrit 5). La présence d'EST variables dans les bases de données suggère que *KIAA0226* possède plusieurs transcrits. L'analyse des transcrits au niveau des fibroblastes humains montre que les exons 2, 8 et 12a sont alternativement épissés et que l'exon 1 est bien un exon codant, confirmant les données d'EST présents dans les bases de données. L'exclusion des exons 2 et 8 par épissage alternatif maintient le cadre de lecture et ne modifie pas les domaines conservés RUN et DAG-binding like alors que l'inclusion de l'exon 12a entraîne un décalage du cadre de lecture. Des mutations ont été ensuite recherchées dans l'exon 12a alternatif mais aucun changement nucléotidique n'a été mis en évidence.

II.b Caractérisation fonctionnelle de la rundataxine

II.b.1. Production d'anticorps et étude de l'expression de la rundataxine

L'homologie de la rundataxine avec des protéines impliquées dans le transport vésiculaire (PLEKHM1, RUFY1..) suggère qu'elle pourrait être impliquée dans cette voie, une fonction qui peut être élucidée par la détermination de sa localisation subcellulaire. A cette fin et en l'absence d'anticorps commerciaux, j'ai produit avec l'aide du service des «anticorps polyclonaux» de l'IGBMC des anticorps de lapin dirigés contre les parties N et C-terminales de la protéine. Les lapins ont été injectés deux fois par des peptides synthétiques servant d'antigènes. Ces peptides comprennent entre 15 à 20 acides aminés qui ont été choisis dans les parties N et C-terminales, car elles sont en général de bons épitopes parce que facilement accessibles à la surface de la protéine. Ces peptides sont homologues entre les séquences protéiques de l'homme et de la souris afin de permettre l'utilisation de ces anticorps pour la caractérisation des rundataxines humaine et de souris (Voir Matériels et

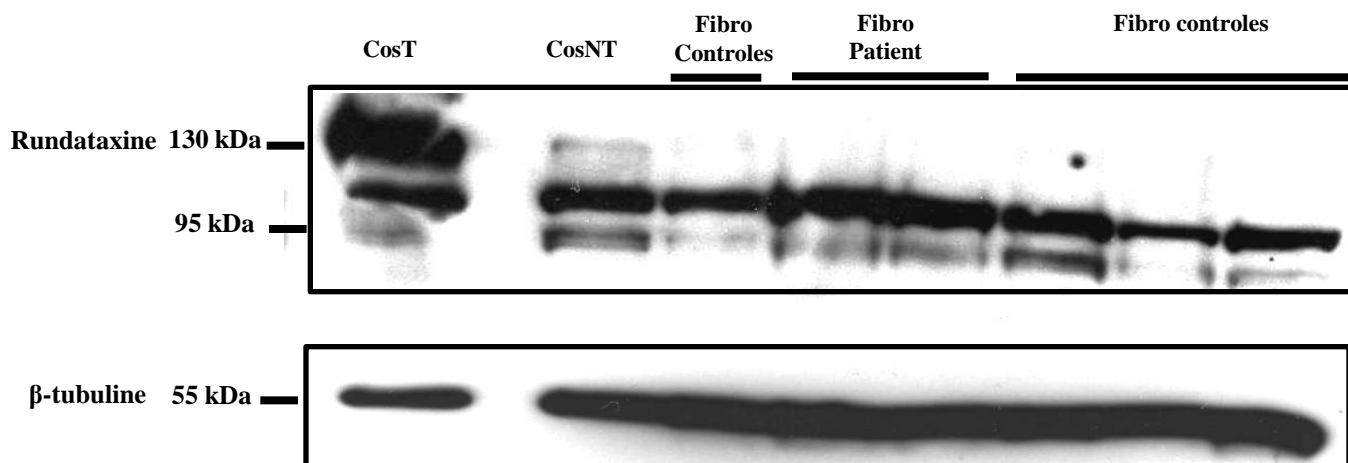


Figure 15: Expression de la rundataxine dans les cellules COS transfectées, analysée par western-blot

La rundataxine surexprimée est détectée avec l'anticorps N-terminal dans les cellules COS transfectées à une taille de 130 kDa supérieure à la taille prédite. La rundataxine endogène est très faiblement détectée dans les cellules COS non transfectées et n'est pas détectée dans les fibroblastes de sujets controles ou de patient. Le même résultat est obtenu avec l'anticorps C terminal (non montré). La β-tubuline est utilisée comme contrôle de chargement. La même quantité d'extrait protéique est déposée sur gel. Les anticorps N et C terminaux sont dilués à 1:10000

T: transfectées; NT: non transfectées

Méthodes). Les sérums récupérés avant le sacrifice des lapins (deux par peptides) ont été testés par western-blot pour leur capacité à reconnaître la protéine surexprimée dans des cellules COS transfectées transitoirement avec une construction contenant le vecteur d'expression eucaryote PXJ41 exprimant le cDNA hKIAA0226 (Figure 11; cf Matériels et Méthodes). Les sérums 2847 et 2849, correspondant aux peptides N et C terminaux respectivement, pour lesquels une bande est observée pour les sérums immunisés et non pour les sérums pré-immuns ont été purifiés sur colonne d'affinité. Sur western-blot, la taille observée de la rundataxine dans les cellules COS transfectées était de 130 kDa, ce qui est supérieur à la taille prédite (108 kDa) (Figure 15). La rundataxine endogène n'était pas détectée au niveau des cellules Cos non transfectées et des fibroblastes normaux et de patients malgré la présence du transcrit correspondant détecté par RT-PCR. De plus, j'ai essayé d'enrichir la rundataxine endogène des cellules COS et des fibroblastes par immunoprécipitation des extraits cellulaires par l'un des deux anticorps puis la révélation par western-blot par le 2^{ème} anticorps anti-rundataxine, mais sans succès, alors que l'immunoprécipitation de la rundataxine surexprimée était possible. La comparaison des signaux de la rundataxine avant et après immunoprécipitation indiquait que l'enrichissement était insuffisant pour détecter la rundataxine endogène.

II.b.2. Localisation subcellulaire

En absence de détection de la protéine endogène dans les fibroblastes humains par western-blot, j'ai étudié la localisation subcellulaire de la rundataxine uniquement en surexpression dans des cellules COS et Hela. L'immunomarquage montre que la rundataxine est associée à des structures vésiculaires (Figure 16). Etant donné que l'homologue le plus proche de la rundataxine, la PLEKHM1, colocalise avec Rab7 et que RUFY1 colocalise avec EEA1 au niveau des endosomes précoces contenant Rab5, j'ai réalisé des expériences de comarquage par cotransfection avec des constructions exprimant GFP-Rab7 et GFP-Rab5 (fournis par François Legueux, Equipe Marie-christine Rio) pour déterminer le type des vésicules auxquelles la rundataxine est associée. Les co-transfections des cellules COS et Hela avec la construction PXJ41-hKIAA0226 et une des constructions GFP-Rab5 ou GFP-Rab7 montrent une colocalisation de la rundataxine avec Rab7 au niveau des endosomes tardifs (Figure 17) et pas de colocalisation avec Rab5 qui est un marqueur des endosomes

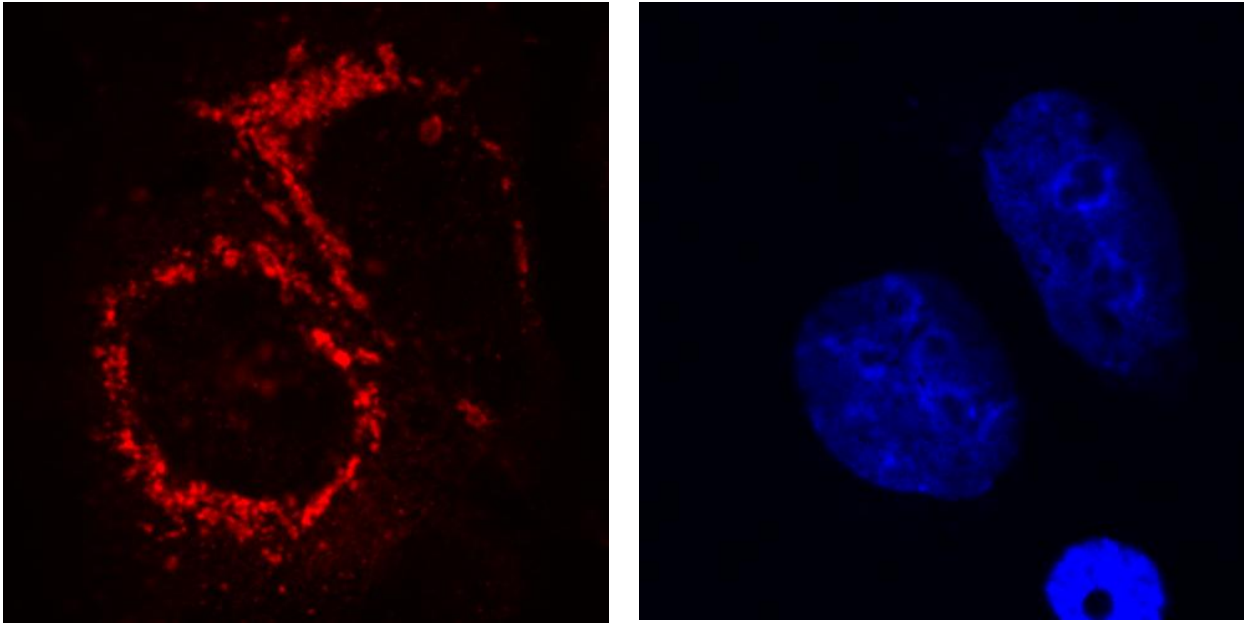
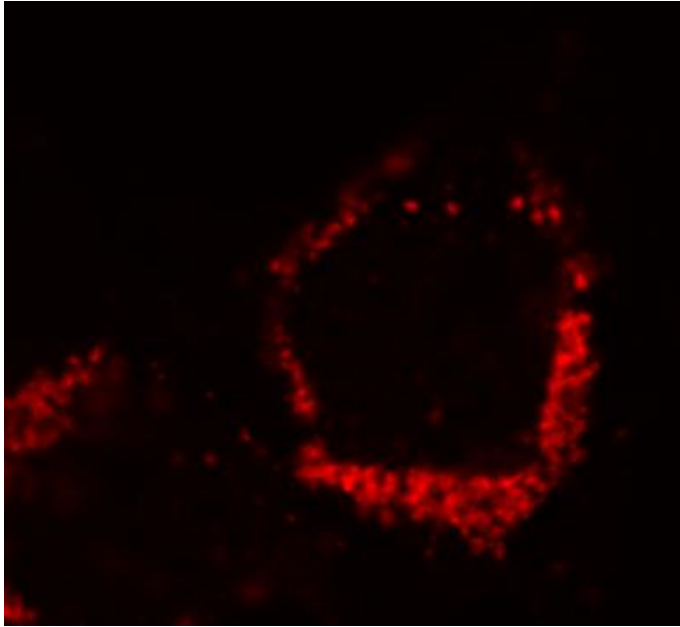


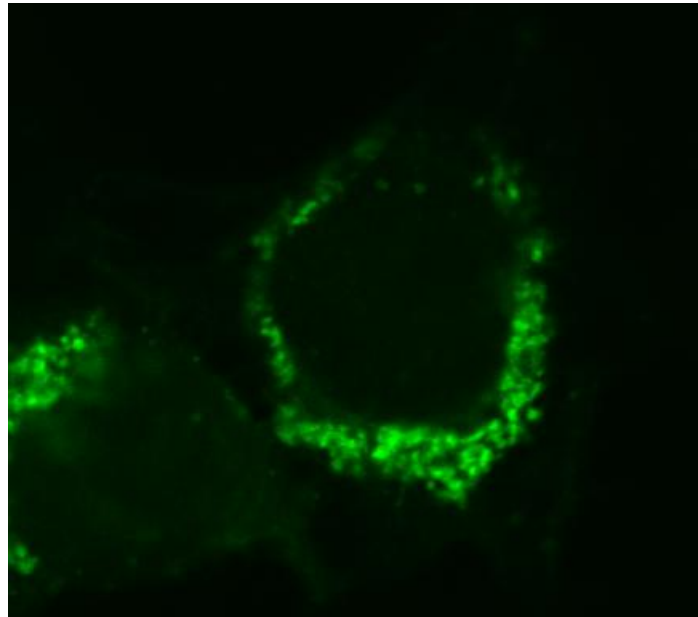
Figure 16: Localisation cellulaire de la rundataxine dans les cellules Hela en immunocytofluorescence

La première colonne correspond à la détection de la rundataxine (rouge). La rundataxine est associée à des structures vésiculaires. La 2^{ème} colonne montre les noyaux marqués en bleu avec du Hoescht (1:200). La superposition des 2 signaux est montrée dans la dernière colonne. L'anticorps primaire est utilisé à une dilution de 1:1000 et correspond à un des 2 anticorps anti-rundataxine. L'anticorps secondaire est un GAR couplé à Alexa 594 et est dilué au 1:1000.

A.



B.



C.

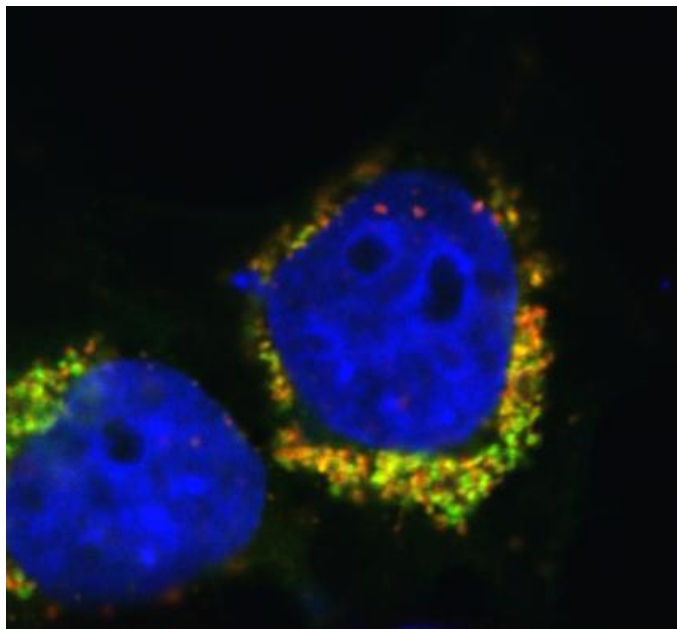


Figure 17: colocalisation de la rundataxine avec GFP-Rab7 dans les cellules HeLa en immunocytofluorescence par imagerie confocale

Image confocale d'une cellule HeLa montrant une colocalisation de la rundataxine avec Rab7. Les cellules HeLa sont co-transfectées avec la rundataxine et une construction Rab7 couplée à la GFP.

A. détection de la rundataxine (rouge). **B.** GFP-Rab7 (vert). La superposition des 2 signaux, rundataxine et Rab7, est montrée en **C.** Les noyaux sont marqués en bleu avec du Hoescht (1:200). L'anticorps C-terminal est utilisé à une dilution de 1:1000. L'anticorps secondaire est un anticorps de chèvre contre les IgG de lapin GAR (goat anti-IgG rabbit) couplé à Alexa 594 et est dilué au 1:1000.

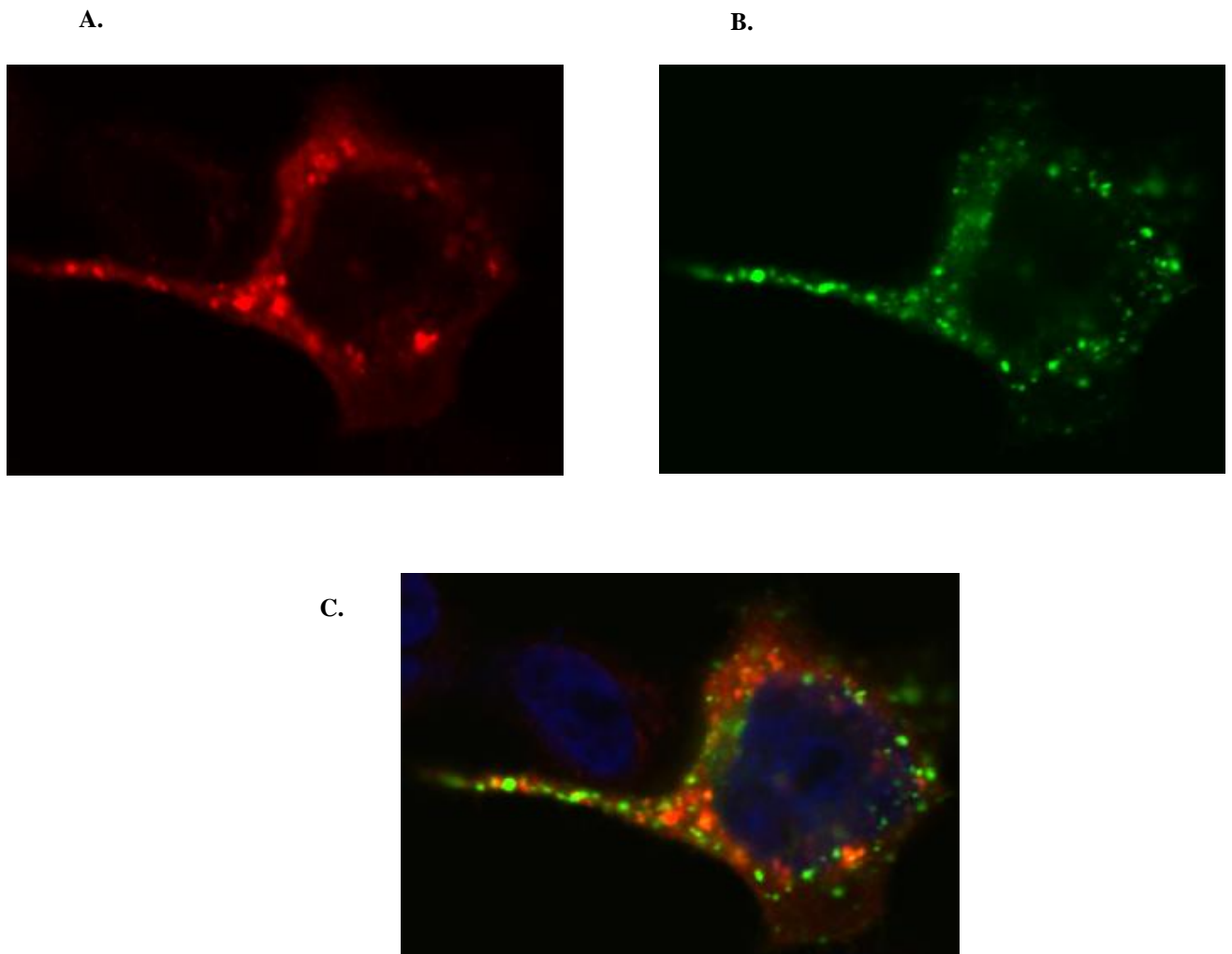


Figure 18: Absence de colocalisation de la rundataxine avec GFP-Rab5 dans les cellules HeLa en immunocytofluorescence par imagerie confocale

Image confocale d'une cellule HeLa montrant l'absence de colocalisation de la rundataxine avec Rab5. Les cellules HeLa sont co-transfectées avec la rundataxine et une construction Rab5 couplée à la GFP.

A. détection de la rundataxine avec l'anticorps C-terminal anti-rundataxine (rouge). **B.** GFP-Rab5 (vert). La superposition des 3 signaux est montrée en **C.** noyaux marqués en bleu avec du Hœscht (1:200). L'anticorps primaire est utilisé à une dilution de 1:1000. L'anticorps secondaire est un GAR (goat anti-IgG rabbit) couplé à Alexa 594 et est aussi dilué au 1:1000.

précoces (Figure 18). Les images de microscopie confocale en 3D nous ont permis de reconstituer une image en trois dimensions de cellules Hela surexprimant la rundataxine.

II.b.3. Etude de l'expression de la rundataxine mutante (p.Ala875ValfsX146)

J'ai réalisé le clonage de la mutation responsable de l'ataxie de Salih (mutation c.2927delC, p.Ala875ValfsX146) dans le même vecteur d'expression eucaryote PXJ41-hKIAA0226 (Figure 12; cf Matériels et Méthodes) pour étudier la stabilité et la localisation de la rundataxine mutante dans les cellules Cos et Hela et comparer sa localisation par rapport à celle de la protéine normale. En western-blot, la rundataxine mutante a été détectée par l'anticorps N-terminal mais pas avec l'anticorps C-terminal à cause du décalage du cadre de lecture après l'acide aminé 874 (Figure 19). Les expériences d'immunofluorescence confirment ce résultat par l'absence de signal avec l'anticorps C-terminal (Figure 20).

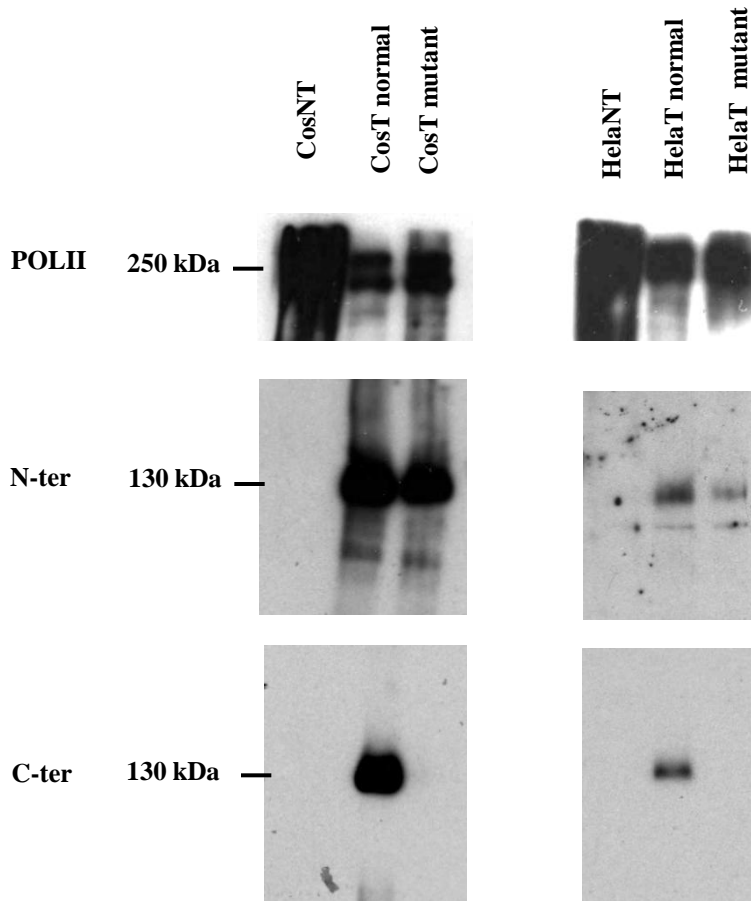
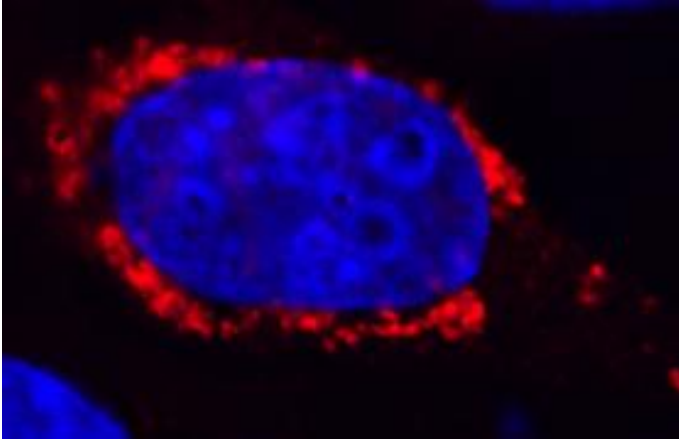


Figure 19: Expression en western-blot de la rundataxine mutante dans les cellules COS et HeLa

L'anticorps N-terminal détecte la rundataxine normale et mutante. L'anticorps C-terminal ne détecte que la rundataxine normale et pas la rundataxine mutante à cause du décalage du cadre de lecture par la mutation. La sous-unité β polymérase II est utilisée comme contrôle de chargement. Les anticorps N et C terminaux sont dilués à 1:10000

T: transfectées; NT: non transfectées

A.



B.

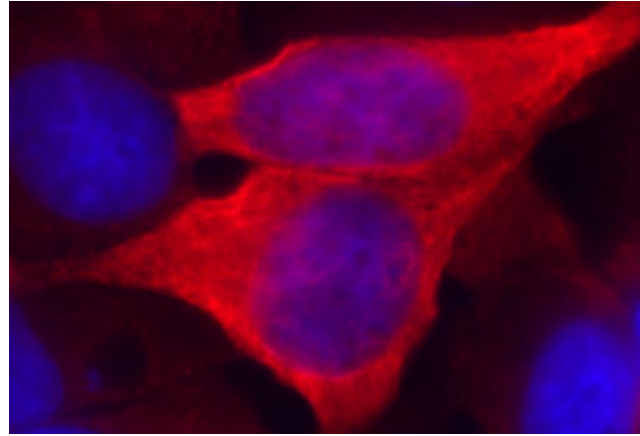


Figure 20: Localisation cytosolique des rundataxines normale et mutante dans les cellules HeLa en immunocytofluorescence

A. La rundataxine normale détectée par l'anticorps N-terminal (en rouge) associée aux vésicules

B. La rundataxine mutante (en rouge) présente une localisation cytosolique diffuse en comparaison avec la rundataxine normale. Les noyaux sont colorés en bleu. La rundataxine a été détectée par l'anticorps N-terminal.

Rundataxin, a novel protein with RUN and diacylglycerol binding domains, is mutant in a new recessive ataxia

Mirna Assoum,¹ Mustafa A. Salih,² Nathalie Drouot,¹ Dorra H'Mida-Ben Brahim,^{1,*} Clotilde Lagier-Tourenne,^{1,†} Abdulmajeed Aldrees,³ Salah A. Elmalik,³ Taha S. Ahmed,³ Mohammad Z. Seidahmed,⁴ Mohammad M. Kabiraj⁵ and Michel Koenig¹

1 Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/Université de Strasbourg, et Collège de France, 67404 Illkirch, France

2 Division of Paediatric Neurology, College of Medicine, King Saud University, Riyadh 11461, Saudi Arabia

3 Department of Physiology, College of Medicine, King Saud University, Riyadh 11461, Saudi Arabia

4 Department of Paediatrics, Security Forces Hospital, Riyadh 11481, Saudi Arabia

5 Department of Neurosciences, Armed Forces Hospital, Riyadh 11159, Saudi Arabia

*Present address: Service de Cytogénétique de Génétique Moléculaire et de Biologie de la Reproduction, CHU Farhat Hached, 4000 Sousse, Tunisia

†Present address: Ludwig Institute for Cancer Research, UCSD, La Jolla, CA 92093-0670, USA

Correspondence to: M. Koenig,
Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire,
1 rue Laurent Fries BP10142,
67404 Illkirch cedex,
France
E-mail: mkoenig@igbmc.fr

We have identified a novel form of recessive ataxia that segregates in three children of a large consanguineous Saudi Arabian family. The three patients presented with childhood onset gait and limb ataxia, dysarthria and had limited walking without aid into their teenage years. Two patients developed epilepsy at 7 months without relapse after treatment, and mental retardation. Linkage studies allowed us to identify a single locus that segregated with the disease on chromosome 3q28-qter. Mutation screening of all coding sequences revealed a single nucleotide deletion, 2927delC, in exon 19 of the *KIAA0226* gene, which results in a frame shift of the C-terminal domain (p.Ala943ValfsX146). The *KIAA0226* gene encodes a protein that we named rundataxin, with two conserved domains: an N-terminal RUN domain and a C-terminal domain containing a diacylglycerol binding-like motif. The closest paralogue of rundataxin, the pleckstrin homology domain family member M1, has been shown to colocalize with Rab7, a small GTPase associated with late endosomes/lysosomes, suggesting that rundataxin may also be associated with vesicular trafficking and signalling pathways through its RUN and diacylglycerol binding-like domains. The rundataxin pathway appears therefore distinct from the ataxia pathways involving deficiency in mitochondrial or nuclear proteins and broadens the range of mechanisms leading to recessive ataxias.

Keywords: Salih ataxia; cerebellar ataxia; epilepsy; rundataxin; RUN domain

Abbreviation: DAG = diacylglycerol; PCR = polymerase chain reaction; PKHM = Pleckstrin-homology, M subfamily

Introduction

Recessive progressive ataxias represent a large group of rare neurological disorders involving both central and peripheral nervous systems. They can be classified according to the major site of degeneration into three groups, namely cerebellar, spinocerebellar and sensory ataxias. Nevertheless, variable combinations of sites of degeneration and associated symptoms are often observed, as in Friedreich ataxia. Recessive ataxias can also be classified according to the pathological mechanisms causing the disease, since several ataxia genes turned out to encode either mitochondrial proteins or nuclear proteins involved in DNA repair. Five genes coding for mitochondrial proteins (frataxin, ABCB7, polymerase gamma, twinkle and ADCK3) are known to cause recessive ataxias (Campuzano *et al.*, 1997; Koutnikova *et al.*, 1997; Allikmets *et al.*, 1999; Van Goethem *et al.*, 2003; Nikali *et al.*, 2005; Lagier-Tourenne *et al.*, 2008), suggesting that oxidative stress generated by mitochondrial malfunction is the underlying mechanism. This prediction is supported by the fact that vitamin E, which is known to be the major membrane antioxidant of the body, causes progressive ataxia when deficient, as demonstrated in the ataxia with vitamin E deficiency and abetalipoproteinaemia (Narcisi *et al.*, 1995; Ouahchi *et al.*, 1995), for which vitamin E supplementation represents an efficient therapy (Muller, 1986; Gabsi *et al.*, 2001). On the other hand, five genes encoding for nuclear proteins involved in DNA repair (ataxia telangiectasia mutated, MRE11, aprataxin, tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 and senataxin) are also mutated in recessive ataxias (Chen and Lee, 1996; Stewart *et al.*, 1999; Moreira *et al.*, 2001, 2004; Takashima *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2004), indicating that DNA repair is the pathological mechanism in these diseases. Finally, other ataxia genes encode proteins linked to the membrane cytoskeleton (SYNE1 in autosomal recessive cerebellar ataxia type 1) (Gros-Louis *et al.*, 2007) or to cytosolic chaperones (sacsin and SIL1 in autosomal recessive spinocerebellar ataxia of Charlevoix-Saguenay and Marinesco-Sjögren syndrome, respectively) (Engert *et al.*, 2000; Anttonen *et al.*, 2005; Parfitt *et al.*, 2009), pointing to multiple progressive ataxia pathways. Here we report a family with three patients affected by a new form of pure recessive cerebellar ataxia and epilepsy who have a mutation in a novel protein with similarities to proteins involved in vesicular trafficking. We suggest naming this new entity 'Salih ataxia'.

Subjects and methods

Subjects

The study includes three children who were referred to the Division of Paediatric Neurology at King Khalid University Hospital, College of Medicine, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia, for evaluation of psychomotor retardation. The age at referral ranged between 8 and 16 years. The parents originated from the North-Western Province of Saudi Arabia. Neurological examinations and follow-up (spanning 8 years) were performed (M.A.S.). The most recent clinical evaluation for each patient was entered in a standardized diagnostic form for spinocerebellar degeneration, which includes the salient symptoms

and signs of the disease, as well as scores for assessing the severity. The latter included cerebellar gait score, dysarthria score, modified Ashworth score (for assessing muscle tone), ambulatory score and 'PATA' test (for dysarthria evaluation). DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes of affected patients and their unaffected parents and siblings. Clinical evaluation, blood samples and skin biopsy were obtained, after written informed consent, as defined by the Local Ethical Committee of the College of Medicine, King Saud University, Riyadh.

Linkage analysis

Patients were analysed with the GeneChip Human Mapping 10K 2.0 Xba Array from Affymetrix. Single-nucleotide polymorphism genotypes were obtained by following the Affymetrix protocol for the GeneChip1 Mapping Array. Homozygous regions shared between the patients were identified with the HomoSNP program (plewniak@igbmc.u-strasbg.fr) that was set to identify regions of 25 or more consecutive homozygous single-nucleotide polymorphisms. Single-nucleotide polymorphisms of the shared homozygous regions were then individually inspected to verify that the same haplotype is shared between the patients and that, apart from recombination events, genotypes are identical beyond the homozygous regions. This was in order to demonstrate identity by descent, as opposed to identity by state.

Microsatellite marker analysis

Microsatellite markers referenced to the UCSC Human genome database (<http://genome.ucsc.edu>, March 2006 release) were used. Analysis was undertaken on an ABI Prism 3100 Genetic Analyser with allele sizes determined using the ABI PRISM1 Genotyper software package (Applied Biosystems). Microsatellite markers were analysed for parents and healthy siblings to confirm linkage to the regions of homozygosity by descent shared by the three affected children. Parental haplotypes linked to the disease were then defined.

Mutational analysis in the reference family

Mutation screening was performed by polymerase chain reaction (PCR) on genomic DNA and direct sequencing of the coding exons and intronic flanking sequences of all genes of the candidate region for Patients 1 and 2 as well as their father. PCR products were purified on Montage PCR₉₆ Cleanup Plates (Millipore), used in Sanger sequencing reactions with the ABI BigDye terminator kit (Applied Biosystems) and then subsequently run on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyser. The Seqscape 2.5 software (Applied Biosystems) was used to analyse the sequencing results.

Search for mutations in unrelated families and control individuals

The gene defective in the reference family was subsequently analysed in individuals from 172 families with non-Friedreich ataxia by LightScanner (Idaho technologies) high-resolution melting studies. This system allows the detection of mutational changes in DNA heteroduplexes by the study of the melting curve of PCR products amplified in the presence of 'LC Green' dye. Heteroduplexes were obtained directly by rapid renaturation after the last PCR denaturation cycle and also after mixing the DNA samples two by two prior to PCR in case

a sample contained a homozygous mutation. Samples that presented an abnormal melting profile were subsequently sequenced by the Sanger method. Primer sequences are available on the Helmholtz Institute of Human Genetics browser: <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/ExonPrimer.html>. Fragments were amplified in the presence of 1.5 mM MgCl₂ and with annealing temperatures ranging from 60–62°C for sequencing and 63°C for LightScanner analysis.

The same strategy was used to search for the presence of the coding variants of the reference family in 622 control chromosomes. Ninety-four control chromosomes were from Saudi Arabian individuals, 60 chromosomes were from non-Saudi individuals from the Middle East (including Turkey), 176 chromosomes were from North African individuals and the remaining chromosomes were from European ancestry.

Reverse transcription PCR analysis

Total RNA from primary human fibroblasts and mouse tissues were extracted using Trizol according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). Total RNA was reverse transcribed using the Superscript II kit (Invitrogen). The total human complementary DNA was amplified with four sets of primers generating overlapping fragments: exons 1–7 (forward: 5'-CAGGGACGCTCTCTGG-3'; reverse: 5'-GTGCCCTCTGCTTCTTGGAG-3'), exons 7–11 (forward: 5'-TTCTCTAGCCTCCACC AATC-3'; reverse: 5'-TTCAGCTCCTGGATCTCTCT-3'), exons 11–17 (forward: 5'-ATGATGAGCCAGTGCCTAGAG-3'; reverse: 5'-CTTCATGTGACACAGCTGGA-3') and exons 18–21 (forward: 5'ATAGGAAGGTC AAGCTGCTC-3'; reverse: 5'-TCAGTTCTGCAACAGGTG TG-3'). The murine complementary DNA was amplified with primer exons 4 and 7 (forward: 5'GTGCCACTGCCTCTCAGC-3'; reverse: 5'-CTTCTTGGAGTTGCCAGAA-3') and in exons 15 and 17 (forward: 5'-AAGCAGAATTACCGCTGTGC-3'; reverse: 5'-AGGAGCTCTTTGG CCAATC-3'). Murine *GAPDH* and *36B4* (encoding the acidic

ribosomal phosphoprotein P0) transcript analysis of the same reverse transcription reaction served as control for the amount of analysed tissue.

Results

A large consanguineous Saudi Arabian family (Family AR) with five healthy siblings and three sisters affected with childhood onset ataxia was identified. Patients 1 and 3 showed unsteadiness since they started walking, which was delayed (age 42 and 28 months, respectively). Patient 2 had delayed onset of walking (age 22 months) and developed unsteadiness at 7 years of age. The three patients had upper and lower limb and gait ataxia, dysarthria and nystagmus or saccadic pursuit (Table 1). They currently have limited walking without aid but are unable to run. Patient 1 has diminished deep tendon reflexes in both upper and lower limbs while the other two have diminished reflexes only in the upper limbs. They have no motor or sensory deficit, muscle wasting, fasciculation or extrapyramidal symptom and plantar response is flexor in each of them. Patients 1 and 3 developed epilepsy, each at the age of 7 months, which responded well to treatment with no relapse since 3 years of age. In Patient 1, the convulsions started in the form of 5–7 myoclonic jerks per day. She has been treated at the regional hospital on carbamazepine (Tegretol), phenytoin (Dilantin) and phenobarbital, none of which was apparently successful. Treatment was discontinued by the parents at the age of 23 months. She was seen, aged 26 months, at another hospital in Riyadh; clonazepam was started with favourable response. EEG (at 2.5 years) was reported to have shown multifocal spikes and spike and slow wave foci. She was successfully weaned off clonazepam at the age of 4.8 years. The seizures in Patient 3 consisted of sudden flexion of the head and

Table 1 Clinical features of Family AR

	Patient 1	Patient 2	Patient 3
Sex (current age, years)	F (25)	F (19)	F (16)
Age at assessment (years)	16	19	16
Age at onset of first sign	Epilepsy at 7 months	Unsteadiness at 7 years	Epilepsy at 7 months
Outcome of epilepsy after treatment	No relapse since age 3 years	–	No relapse since age 3 years
Motor development	Delayed, walked at 42 months	Delayed, walked at 22 months	Delayed, walked at 28 months
Learning abilities	Delayed, talked at >4 years	Delayed, talked at 3 years	Delayed, talked at 4 years
Onset of unsteadiness	Since walking	at 7 years	Since walking
Onset of dysarthria	Since talking	Since talking	Since talking
Cerebellar ataxia			
Upper limbs	Mild	Mild	Severe
Lower limbs	Moderate	Moderate	Severe
Gait	Moderate	Moderate	Severe
Dysarthria	Moderate	Moderate	Severe
Deep tendon reflexes			
Upper limbs	Diminished	Diminished	Diminished
Lower limbs	Diminished	Enhanced	Enhanced
Abnormal eye movements	Nystagmus (no ocular apraxia)	Saccadic pursuit	Saccadic pursuit
Mental status (onset)	Mental retardation (since early childhood)	–	Mental retardation (since early childhood)

both upper limbs, hip and knee flexions. The frequency was approximately 6 times/day, lasting for 10 s, mostly when she awoke from sleep. She received clonazepam for 1 week at the regional hospital and was referred to another hospital in Riyadh at the age of 10 months. An EEG showed frequent discharges consisting of spikes, polyspikes and slow waves, generalized and focal from the right and left hemispheres. A clinical diagnosis of infantile spasm was made and she received vigabatrin. Clonazepam was added because she continued to have daily seizures. She has been seizure free since the age of 3 years and was successfully weaned off her last anticonvulsant (vigabatrin) at the age of 7 years. Patients 1 and 3 also have moderate mental retardation detected since early childhood; however, no formal IQ was done in either patient. MRI of the three patients was normal at ages 16, 9 and 8 years, respectively, but showed mild cerebellar atrophy and prominent folia in Patient 2 at the age of 18 years (Fig. 1). Metabolic ataxias were excluded by laboratory testing (Supplementary Table 1). The parents and healthy carriers were clinically examined and found to be normal; they did not have cerebellar imaging examinations.

We performed homozygosity mapping on Family AR, which shows first-degree consanguinity as well as several loops of remote consanguinity (Fig. 2), by analysing the three affected individuals with whole genome single-nucleotide polymorphism arrays. Two regions of shared homozygosity between the three patients were identified on chromosomes 3qter and 11p13-q12.3, respectively. Linkage studies on these two regions were then performed on all family members (parents and affected and healthy siblings) with a dense set of microsatellite markers, in order to confirm or exclude linkage. This excluded linkage to the 11p13-q12.3 region, as it revealed that the mother was also homozygous over the smallest shared haplotype, probably due to a remote consanguinity that relates her parents three generations ago. Flanking markers of the 11p15.1-q12.3 region showed that Patient 3 received a maternal haplotype different from the other two patients, who shared the same large homozygous haplotype with two of the healthy siblings (Fig. 2), therefore confirming exclusion of linkage.

Linkage analysis with microsatellite markers of the 3q27.3-qter region on all family members is consistent with linkage to this 10.2 Mb interval (Fig. 2). Despite the fact that the LOD score in favour of linkage to the 3q27.3-qter region is only 2.7, due to the

multiple consanguinity loops, the 3q27.3-qter region is the only region that shows linkage to the disease in this family. We then screened for mutations in the patients by sequencing the coding exons and exon–intron boundaries of 49 genes localized in the 10.2 Mb linked 3q interval (Supplementary Table 2). Only six genes of the 10.2 Mb linked interval were not sequenced since they were involved in known and distinct diseases or had a specific expression in tissues not compatible with an ataxic phenotype (Supplementary Table 2). In addition to known polymorphisms, three novel nucleotide changes were identified: two missense and one frame-shift change. The two missense mutations were found in genes *ATP13A4* (c.1091T>C, p.Val364Ala) and *FAM43A* (c.982G>A, p.G328S), respectively, but were ascribed as polymorphisms due to their identification in some of the 622 control chromosomes analysed by Lightscanner high-resolution melting studies. The frame-shift change is a single nucleotide deletion, 2927delC, in exon 19 of the *KIAA0226* gene, which results in the usage of a novel 145-amino-acid reading frame (p.Ala943ValfsX146) that is longer than the normal C-terminal sequence. This change was not identified in the 622 control chromosomes analysed. In total, 172 families with non-Friedreich ataxia, including nine families from Saudi Arabia, were analysed for mutations in *KIAA0226*. No additional mutations were identified. Further analysis of clinically targeted cohorts of patients with ataxia will be important since it may increase the chance to identify additional patients affected by this rare condition.

KIAA0226 encodes a 972-amino-acid protein, with two conserved domains (Fig. 3): an N-terminal RUN domain and a C-terminal domain containing a diacylglycerol (DAG) binding-like motif. We therefore named this new protein rundataxin (RUN-DAG-ataxin, RDTX). The 2927delC change of *KIAA0226* causes a frame-shift that removes the DAG binding-like motif of rundataxin, which is the most conserved domain of the protein (in vertebrates and invertebrates), strongly suggesting that the 2927delC change is pathogenic, presumably by a loss of function mechanism. Reverse transcription PCR analysis of *KIAA0226* on human fibroblast RNA showed that exons 2, 8 and 12b can be alternatively spliced out (data not shown). This alternative splicing does not change the reading frame and does not affect the conserved domains. Reverse transcription PCR analysis on adult

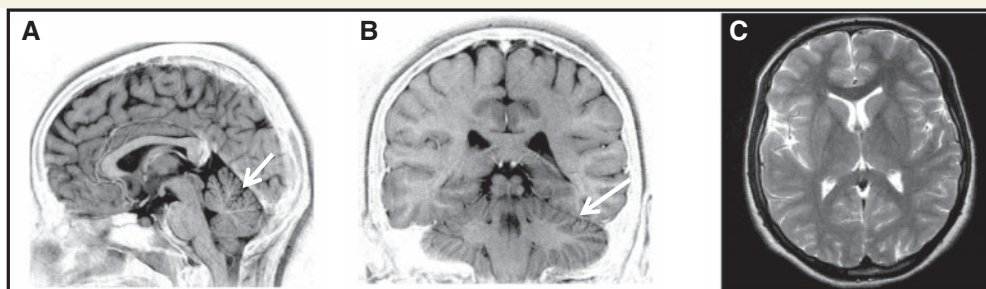


Figure 1 Brain MRI of Patient 2 (aged 18 years; at 9 years, brain imaging was essentially normal). Arrows point to dilated interfoliar sulci. (A) Sagittal inverted T₂-weighted image showing moderate cerebellar vermis atrophy. (B) Coronal inverted T₂-weighted image showing mild atrophy of the cerebellar hemispheres and prominent folia. (C) Transverse T₂-weighted image at the level of the basal ganglia. There are no hyperintense signals or white matter alterations.

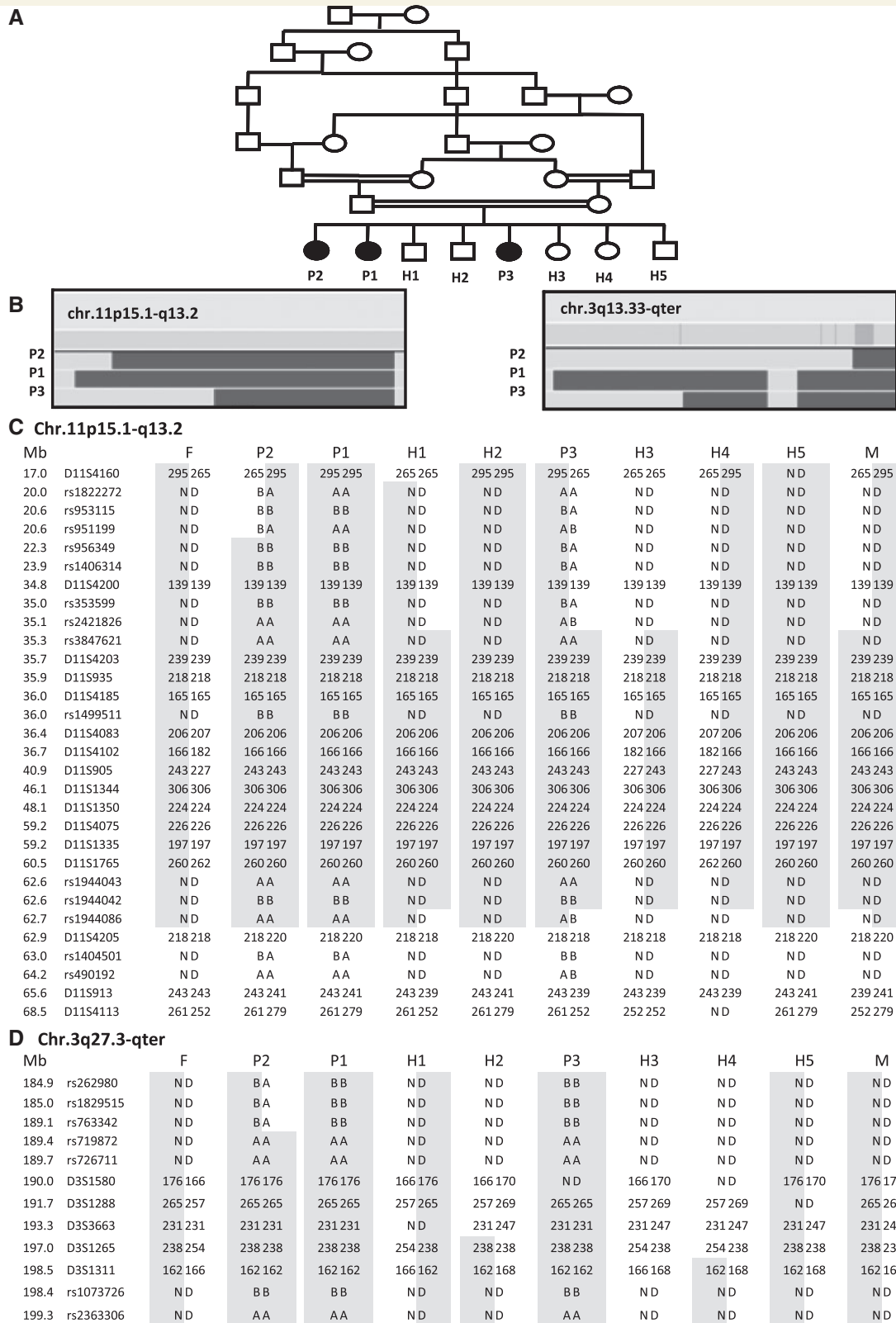


Figure 2 Pedigree and linkage analysis of Family AR. (A) Pedigree of Family AR showing first-degree consanguinity as well as several loops of remote consanguinity. (B) Single-nucleotide polymorphism array results for the three patients for the regions 3q27.3-qter and 11p15.1-q13.2. Shared regions of homozygosity are visualized by the HomoSNP software, which displays one patient per line. Regions with more than 25 consecutive homozygous single-nucleotide polymorphisms are in dark grey. Regions of heterozygosity are in light grey. The three affected siblings share regions of homozygosity by descent on chromosomes 3q27.3-qter and 11p13-q12.3. (C) Microsatellite marker analysis at chromosome 11p15.1-q13.2 in all family members. Markers and their position along the chromosome (in Mb) are

mouse tissues showed that *Kiaa0226* is ubiquitously expressed (Fig. 3).

In order to gain insights on rundataxin, phylogenetic studies were undertaken. With respect to the DAG binding-like domain, humans have five rundataxin paralogues: Pleckstrin-homology, M subfamily (PKHM) proteins M1, M3 and M4, DEF8 and C13ORF18 (Fig. 3). Only rundataxin, PKHM1 and DEF8 have an orthologue in *Drosophila*. PKHM3/PKHM4 and C13ORF18, which are truncated paralogues of PKHM1 and rundataxin, respectively, appear to be of more recent origin (Fig. 3). Only rundataxin and PKHM1 possess both the RUN and the DAG binding-like domains, PKHM1 having two pleckstrin homology domains in place of the intermediate rundataxin domain with the predicted coiled-coil structure.

Discussion

In this study, we report the identification of a family with three children affected with a new form of recessive ataxia, which we suggest naming 'Salih ataxia', and of a frameshift mutation of *KIAA0226* that segregates with the disease. The disease is an early childhood-onset, slowly progressive pure cerebellar ataxia associated with epilepsy and mental retardation in two of three patients. It is currently not known whether epilepsy and mental retardation are due to a mutation distinct from that causing ataxia which segregated by chance with ataxia in the two patients, or whether they represent clinical variability of this new entity. Identification of additional patients with mutations in *KIAA0226*, by further analysis of clinically targeted cohorts of ataxia patients, will be important as it will help to solve this issue. The demonstration that the *KIAA0226* homozygous 2927delC mutation is indeed causing recessive ataxia is established by the fact that the 3q27.3-qter region is the only region that segregates with the disease in this family, and that the 2927delC mutation is the only significant nucleotide change identified in all coding sequences of this region. In addition, the mutation alters the C-terminal domain of the protein, by removing and replacing with an alternative sequence the highly conserved DAG binding-like motif of this domain, presumably leading to loss of function. However, since the frame-shift mutation occurs towards the end of the protein, it is possible that loss of function is only partial, with some residual function maintained by the mutant protein, which may be protected against degradation by the presence of the longer alternative sequence. The partial loss of function hypothesis would be in agreement with the apparent very low frequency of the disease, since it would imply that the common complete loss of function mutations of the same gene, when

homozygous, would either not be viable or result in a different, more severe disease. The fact that the parents and healthy carriers showed no evidence of related signs or symptoms excludes the possibility that the mutation could be dominant or dominant negative. We named the novel protein encoded by the *KIAA0226* gene rundataxin, as it contains an N-terminal RUN domain and a C-terminal DAG binding-like domain. RUN domains are protein-protein binding domains that usually interact with small GTPases and could confer a role in multiple Ras-like GTPase signalling pathways (Callebaut *et al.*, 2001). DAG binding motifs are zinc finger-type motifs first identified in protein kinase C and DAG kinases (Colon-Gonzalez and Kazanietz, 2006). The function of rundataxin is still unknown but comparison with paralogues of known function may help to shed light on its function. Very little is known about the mammalian paralogues PKHM3, PKHM4, DEF8 and C13ORF18, while PKHM1 has been found mutated in osteopetrosis in rats and humans (Van Wesenbeeck *et al.*, 2007). Rat Plekhm1 is highly expressed in osteoclasts and colocalizes with Rab7, a small GTPase associated with late endosomes/lysosomes, suggesting that rundataxin may also be associated with vesicular trafficking and signalling pathways. Another protein containing both an N-terminal RUN domain and a C-terminal cystein-rich lipid-binding domain (a phospholipid-binding FYVE domain) is RUN and FYVE domain-containing protein 1 (RUFY1), also named Rabip4, an effector of Rab4. Mari and colleagues (2001) reported that RUFY1 is associated with early endosome membranes via its RUN domain. In Chinese hamster ovary cells, RUFY1 appears as an early endosomal protein, colocalizing with early endosome antigen1 (EEA1), an effector of Rab5. Based on protein homologies, it appears that the rundataxin pathway is distinct from the ataxia pathways involving deficiency in mitochondrial, nuclear or chaperone proteins and is more related to pathways disrupted in spastic paraplegias for which the defective proteins NIPA1, spastin, maspardin, atlastin, alsin and spartin are involved in vesicular trafficking (Zhu *et al.*, 2003; Goytain *et al.*, 2007; Rismanchi *et al.*, 2008; Connell *et al.*, 2009; Edwards *et al.*, 2009; Hanna and Blackstone, 2009). For example alsin, which is mutated in infantile-onset ascending hereditary paralysis and amyotrophic lateral sclerosis 2, is a guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rab5 and plays a role in intracellular endosomal trafficking. In addition, the ulceromutilating sensory neuropathy (HMSN2B, previously known as CMT2B) is caused by mutations in Rab7 (Verhoeven *et al.*, 2003; Houlden *et al.*, 2004; Meggouh *et al.*, 2006) and may present a molecular pathway similar to rundataxin deficiency. However, none of the three patients with the rundataxin mutation presented with pyramidal signs or motor neuropathy, indicating

Figure 2 Continued

indicated on the left. Regions of homozygosity by descent are shaded in grey. Selected single-nucleotide polymorphisms (from the array analysis) that delineate recombination breakpoints in the patients are also indicated. The mother is also homozygous over the 11p15.1-q13.2 region, presumably because she is also born from consanguineous parents (A), and is therefore non-informative over this region. Analysis with flanking markers indicates that Patient 3 has received a different maternal haplotype than Patients 1 and 2, therefore excluding linkage to this interval. In addition, two healthy siblings share the same parental homozygous haplotypes as Patients 1 and 2, therefore also excluding linkage to this interval. (D) Microsatellite marker analysis at chromosome 3q27.3-qter in all family members, as in C. Haplotype segregation confirmed linkage of the 3q27.3-qter locus to the disease in Family AR. ND = not determined.

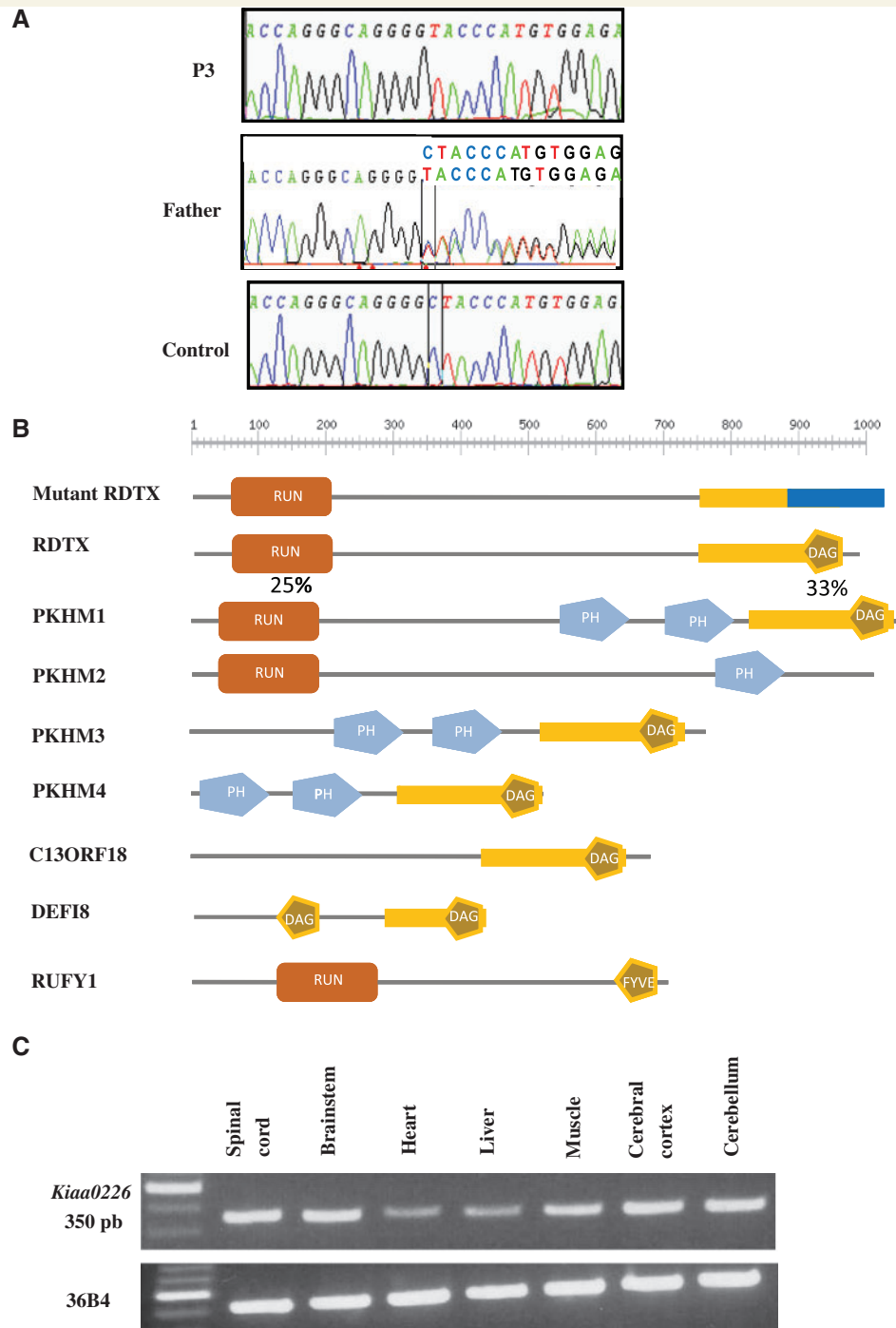


Figure 3 Analysis of the rundataxin gene and protein. (A) Sequence of rundataxin exon 19 in Patient 3 (P3), her father and a control individual. Patient 3 is homozygous for the deletion of the cytosine at position 2927, while her carrier father is heterozygous for this mutation. (B) Domains and human paralogues of rundataxin (RDTX). The predicted mutant rundataxin is shown on top of normal rundataxin. The novel 145-amino-acid sequence resulting from the shifted reading frame is depicted in blue. The percentage below the RUN and DAG binding-like domains of rundataxin indicates amino-acid identity with PKHM1 over these domains. RUN and FYVE domain-containing protein 1 (RUFY1) contains at its C-terminus a FYVE domain that is another type of lipid-binding zinc finger. (C) Expression analysis of *rundataxin* in adult mouse tissues. Mice *rundataxin* is ubiquitously expressed, though more prominently in the nervous system. 36B4, encoding the acidic ribosomal phosphoprotein P0 (RPLP0), was used as internal control. Similar results were obtained using *GAPDH* as an internal control (data not shown).

that *RDTX* was not *a priori* an obvious candidate gene for this disease.

Rab proteins constitute the largest family of monomeric small GTPases, which function in the tethering/docking of vesicles to their target compartment, leading to membrane fusion. However, Rab proteins have also been implicated in vesicle budding and, more recently, in the interaction of vesicles with cytoskeletal elements. Rab5 is localized at early endosomes, Rab6 is localized at the Golgi network, Rab7 and Rab9 are markers of late endosomes. The finding that Rab proteins have several functions suggests that all steps of vesicle transport could be coordinated by the same regulatory machinery (Zerial and McBride, 2001). Testing the hypothesis that rundataxin is also associated with intracellular vesicles through its RUN and DAG-binding-like domains should shed light on the mechanism that leads to ataxia in the case of rundataxin deficiency and broaden the range of mechanisms leading to recessive ataxias.

Acknowledgements

The scientific and technical assistance of Christelle Thibault, Serge Vicaire and Ingrid Bauer was highly appreciated. Thanks are also due to Professor Dr H Goebel, Department of Neuropathology, Johannes Gutenberg-University Medical Centre, Mainz, Germany, for revising the muscle biopsy of Patient 2.

Funding

This study was supported by funds from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Agence Nationale pour la Recherche-Maladies Rares and Maladies Neurologiques et Psychiatriques (ANR-05-MRAR-013-01 and ANR-09-MNPS-001-01 to M.K.). M.A. was supported by a BDI fellowship from CNRS. D.H-B.B. was supported by the French association 'Connaître les Syndromes Cérébelleux'. M.A.S. was supported by College of Medicine Research Center (Project No. 05-495), College of Medicine, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Brain* online.

References

- Allikmets R, Raskind WH, Hutchinson A, Schueck ND, Dean M, Koeller DM. Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (*ABC7*) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (*XLSA/A*). *Hum Mol Genet* 1999; 8: 743–9.
- Anttonen AK, Mahjneh I, Hamalainen RH, Lagier-Tourenne C, Kopra O, Waris L, et al. The gene disrupted in Marinesco–Sjogren syndrome encodes *SIL1*, an *HSPA5* cochaperone. *Nat Genet* 2005; 37: 1309–11.
- Callebaut I, de Gunzburg J, Goud B, Mornon JP. RUN domains: a new family of domains involved in Ras-like GTPase signaling. *Trends Biochem Sci* 2001; 26: 79–83.
- Campuzano V, Montermini L, Lutz Y, Cova L, Hindelang C, Jiralerspong S, et al. Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 1771–80.
- Chen G, Lee E. The product of the *ATM* gene is a 370-kDa nuclear phosphoprotein. *J Biol Chem* 1996; 271: 33693–7.
- Colon-Gonzalez F, Kazanietz MG. C1 domains exposed: from diacylglycerol binding to protein-protein interactions. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1761: 827–37.
- Connell JW, Lindon C, Luzio J P, Reid E. Spastin couples microtubule severing to membrane traffic in completion of cytokinesis and secretion. *Traffic* 2009; 10: 42–56.
- Edwards TL, Clowes VE, Tsang HT, Connell JW, Sanderson CM, Luzio JP, et al. Endogenous spartin (SPG20) is recruited to endosomes and lipid droplets and interacts with the ubiquitin E3 ligases AIP4 and AIP5. *Biochem J* 2009; 423: 31–9.
- Engert JC, Berube P, Mercier J, Dore C, Lepage P, Ge B, et al. ARSACS, a spastic ataxia common in northeastern Quebec, is caused by mutations in a new gene encoding an 11.5-kb ORF. *Nat Genet* 2000; 24: 120–5.
- Gabsi S, Gouider-Khouja N, Belal S, Fki M, Kefi M, Turki I, et al. Effect of vitamin E supplementation in patients with ataxia with vitamin E deficiency. *Eur J Neurol* 2001; 8: 477–81.
- Goytain A, Hines RM, El-Husseini A, Quamme GA. NIPA1 (SPG6), the basis for autosomal dominant form of hereditary spastic paraplegia, encodes a functional Mg²⁺ transporter. *J Biol Chem* 2007; 282: 8060–8.
- Gros-Louis F, Dupre N, Dion P, Fox MA, Laurent S, Verreault S, et al. Mutations in *SYNE1* lead to a newly discovered form of autosomal recessive cerebellar ataxia. *Nat Genet* 2007; 39: 80–5.
- Hanna MC, Blackstone C. Interaction of the SPG21 protein ACP33/masparidin with the aldehyde dehydrogenase ALDH16A1. *Neurogenetics* 2009; 10: 217–28.
- Houlden H, King RH, Muddle JR, Warner TT, Reilly MM, Orrell RW, et al. A novel RAB7 mutation associated with ulcero-mutilating neuropathy. *Ann Neurol* 2004; 56: 586–90.
- Koutnikova H, Campuzano V, Foury F, Dolle P, Cazzalini O, Koenig M. Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nat Genet* 1997; 16: 345–51.
- Lagier-Tourenne C, Tazir M, Lopez LC, Quinzii CM, Assoum M, Drouot N, et al. ADCK3, an ancestral kinase, is mutated in a form of recessive ataxia associated with coenzyme Q10 deficiency. *Am J Hum Genet* 2008; 82: 661–72.
- Mari M, Macia E, Le Marchand-Brustel Y, Cormont M. Role of the FYVE finger and the RUN domain for the subcellular localization of Rabip4. *J Biol Chem* 2001; 276: 42501–8.
- Meggouh F, Bienfait HM, Weterman MA, de Visser M, Baas F. Charcot-Marie-Tooth disease due to a de novo mutation of the RAB7 gene. *Neurology* 2006; 67: 1476–8.
- Moreira MC, Barbot C, Tachi N, Kozuka N, Uchida E, Gibson T, et al. The gene mutated in ataxia-ocular apraxia 1 encodes the new HIT/Zn-finger protein aprataxin. *Nat Genet* 2001; 29: 189–93.
- Moreira MC, Klur S, Watanabe M, Nemeth AH, Le Ber I, Moniz JC, et al. Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2. *Nat Genet* 2004; 36: 225–7.
- Muller DP. Vitamin E—its role in neurological function. *Postgrad Med J* 1986; 62: 107–12.
- Narcisi TM, Shoulders CC, Chester SA, Read J, Brett DJ, Harrison GB, et al. Mutations of the microsomal triglyceride-transfer-protein gene in abetalipoproteinemia. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 1298–310.
- Nikali K, Suomalainen A, Saharinen J, Kuokkanen M, Spelbrink JN, Lonnqvist T, et al. Infantile onset spinocerebellar ataxia is caused by recessive mutations in mitochondrial proteins Twinkle and Twinky. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 2981–90.
- Ouahchi K, Arita M, Kayden H, Hentati F, Ben Hamida M, Sokol R, et al. Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the alpha-tocopherol transfer protein. *Nat Genet* 1995; 9: 141–5.
- Parfitt DA, Michael GJ, Vermeulen EG, Prodromou NV, Webb TR, Gallo JM, et al. The ataxia protein saccin is a functional co-chaperone

- that protects against polyglutamine-expanded ataxin-1. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 1556–65.
- Rismanchi N, Soderblom C, Stadler J, Zhu PP, Blackstone C. Atlastin GTPases are required for Golgi apparatus and ER morphogenesis. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 1591–604.
- Stewart GS, Maser RS, Stankovic T, Bressan DA, Kaplan MI, Jaspers NG, et al. The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* 1999; 99: 577–87.
- Takashima H, Boerkoel CF, John J, Saifi GM, Salih MA, Armstrong D, et al. Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. *Nat Genet* 2002; 32: 267–72.
- Taylor AM, Groom A, Byrd PJ. Ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD)-its clinical presentation and molecular basis. *DNA Repair (Amst)* 2004; 3: 1219–25.
- Van Goethem G, Martin JJ, Dermaut B, Lofgren A, Wibail A, Ververken D, et al. Recessive POLG mutations presenting with sensory and ataxic neuropathy in compound heterozygote patients with progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscul Disord* 2003; 13: 133–42.
- Van Wesenbeeck L, Odgren PR, Coxon FP, Frattini A, Moens P, Perdu B, et al. Involvement of PLEKHM1 in osteoclastic vesicular transport and osteopetrosis in incisors absent rats and humans. *J Clin Invest* 2007; 117: 919–30.
- Verhoeven K, De Jonghe P, Coen K, Verpoorten N, Auer-Grumbach M, Kwon JM, et al. Mutations in the small GTP-ase late endosomal protein RAB7 cause Charcot-Marie-Tooth type 2B neuropathy. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 722–7.
- Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 107–17.
- Zhu PP, Patterson A, Lavoie B, Stadler J, Shoeb M, Patel R, et al. Cellular localization, oligomerization, and membrane association of the hereditary spastic paraplegia 3A (SPG3A) protein atlastin. *J Biol Chem* 2003; 278: 49063–71.

Supplementary table: Additional clinical features and laboratory findings in family AR

	Patient 1	Patient 2	Patient 3
Disability stage*	3	3	3
Plantar reflex	Flexor	Flexor	Flexor
Sphincter disturbances	None	None	None
Motor deficit	None	None	None
Muscle wasting	None	None	None
Fasciculations	No	No	No
Sensory deficit (superficial sensory loss)	No	No	No
Skeletal abnormalities / scoliosis	None	None	None
Pes cavus	None	None	None
Facial dysmorphism	No	No	No
Sphincter disturbances	None	None	None
Extrapyramidal symptoms	None	None	None
Ophthalmological signs	No abnormality	No abnormality	No abnormality
Other signs (details)	Brachydactyly of 3 rd & 4 th toes. Short distal thumbs and nails (bilaterally)	-	Hypopigmented patch over right elbow
Cerebellar gait score	NA	2	3
Adiadocho-score	NA	12 times	7 times
Modified Ashworth Scale	NA	0: in upper limbs 1: in lower limbs	0: in upper limbs 1: in lower limbs
Ambulatory Score	NA	1	2
PATA test: dyarthria evaluation	NA	10 times	5 times
Alpha-fetoprotein	-	N	N
Carcinoembryonic antigen	-	N	N
Cholesterol (mmol/L) (N=3.2 – 5.2)	4.4	6.3 and 5.5	4.2
Serum amino-acid profile (by tandem MS)	N	N	N
Serum copper	-	N	N
Thyroid function tests (T3 and TSH)	-	N	N
Very long chain fatty acids and phytanic acid	-	N	-
Ceruloplasmin	-	N	-
EEG (Age when done)	Multifocal spikes + spikes and slow wave foci (2 1/2y)	-	Frequent discharges consisting of spikes, polyspikes and slow waves, generalized and focal from the R and L hemispheres
BAER (Age when done)	N in L ear. Increased hearing threshold in R ear (40dB) (14y)	-	Increased hearing threshold in L (60dB) and R (40dB) ears (16y)
VEP (Age when done)	N (14y)	-	Bilateral optic pathway involvement (P100 latency = 135.5 msec in L eye and 137 msec in R eye (16y)
ERG (Age when done)	N (14y)	-	N (16y)
Motor and sensory NCS	-	N apart from absent sural sensory nerve potential (19y)	N apart from absent sural sensory nerve potential (16y)
MRI brain (Age when done)	No white matter changes. Essentially normal (16y)	No white matter changes. Cerebellar atrophy at 18 y	Essentially normal (8y 5mo)
Muscle biopsy	Non-specific myopathic changes	-	-

Abbreviations: BAER= brain auditory evoked responses; EEG = electroencephalography; ERG= electroretinogram; L= left; MRI = magnetic resonance imaging; MS = mass spectrometry; N = normal; NA = not ascertained (could not be ascertained); NCS = nerve conduction studies; R= right; TSH= thyroid stimulating hormone; VEP; visual evoked potentials; y = years.
- = not done

- Disability Stage: 0=No functional handicap; 1=No functional handicap but signs at examination; 2=Mild, able to run, walking unlimited; 3=Moderate, unable to run, limited walking without aid; 4=Severe, walking with one stick; 5=Walking with two sticks; 6=Unable to walk, requiring wheelchair; 7=Confined to bed
- Cerebellar gait score (standing capacities, eyes open): 0=Normal: able to stand on one foot more than 10s; 1=Able to stand with feet together, but no longer able to stand on one foot more than 10 s; 2=Able to stand with feet together, but no longer able to stand with feet on tandem position; 3=No longer able to stand with feet together, but able to stand in natural position without support, with no or moderate sway; 4=Standing in natural position without support, with considerable sway and considerable corrections; 5=Standing in natural position with unilateral support; 6=Standing in natural position with bilateral support; 7=Unable to stand at all.
- Adiadocho-score: The number of alternate movements of the dominant hand counting only dorsal touch during 10 seconds (normal:15-20).
- Modified Ashworth Scale: 0=No increase in muscle tone; 1=Slight increase in muscle tone, manifested by a catch and release or by minimal resistance at the end range of motion when the part is moved in flexion or extension/adduction, etc or followed by minimal resistance throughout the remainder (less than half) of the range of motion, 2=More marked increase in muscle tone through most of the range of motion, but the affected part is easily moved; 3=Considerable increase in muscle tone, passive movement is difficult; 4=Affected part is rigid in flexion or extension (abduction or adduction, etc.).

Sequenced genes	Protein	Function	Novel coding variants ^a
<i>LPP</i>	LIM domain containing preferred translocation partner	activation of gene transcription/ Zinc finger domains	–
<i>FAM79B/TPRG1</i>	Tumor protein p53-regulated gene 1 protein	uncharacterized	–
<i>TP63</i>	Tumor protein p63	member of the p53 family, transcription factor	–
<i>CLDN1</i>	Claudin 1	tight junction protein, mutated in neonatal ichthyosis-sclerosing cholangitis syndrome	–
<i>UNQ846/TMEM207</i>	Transmembrane protein 207	uncharacterized	–
<i>CCDC50</i>	Coiled-coil domain containing protein 50/ Ymer protein	mutated in DFNA44 (deafness)	–
<i>FGF12</i>	fibroblast growth factor 12	fibroblast growth factor	–
<i>C3ORF59</i>	LOC151963	uncharacterized	–
<i>ATP13A4</i>	ATPase subfamily member 13A4	cation-transporting P5-ATPase	1091T>C (V364A) exon 10
<i>HRASLS</i>	HRAS-like suppressor	cell cycle control protein	–
<i>OPA1</i>	Optic atrophy 1	dynamin-related GTPase, mitochondrial, mutated in OPA1	–
<i>HES-1</i>	Hairy and enhancer of split 1	basic helix-loop-helix family of transcription factors	–
<i>CPN2</i>	Carboxypeptidase N, polypeptide 2	regulatory subunit	–
<i>LRRC15</i>	Leucine rich repeat containing protein 15	single-pass type I membrane protein	–
<i>TMEM44</i>	Transmembrane protein 44	uncharacterized	–
<i>AX746839</i>	Uncharacterized	uncharacterized	–
<i>LSG1</i>	Large subunit GTPase 1	export of 60S ribosomal subunit	–
<i>FAM43A</i>	LOC131583	uncharacterized	982G>A (G328S) exon 1
<i>C3ORF21</i>	LOC152002	uncharacterized	–
<i>CENTB2</i>	Centaurin beta2	ArfGAP GTPase activating protein	–
<i>PPP1R2</i>	Protein phosphatase 1, regulatory subunit 2	inhibitor of protein-phosphatase 1	–
<i>APOD</i>	Apolipoprotein D	lipoprotein	–
<i>TNK2</i>	Tyrosine kinase non-receptor 2	clathrin-mediated endocytosis	–
<i>TFRC</i>	Transferrin receptor	cellular uptake of iron	–
<i>FLJ25996</i>	Uncharacterized	uncharacterized	–
<i>ZDHHC19</i>	Zinc finger, DHHC domain containing protein 19	probable palmitoyltransferase	–
<i>OSTalpha</i>	Organic solute transporter alpha	intestinal basolateral transporter for bile acid	–
<i>PCYT1A</i>	Phosphate cytidylyltransferase 1, choline	phosphatidylcholine synthesis	–
<i>MGC33212/TCTEX1D2</i>	Tctex1 domain-containing protein 2	dynein light chain Tctex-type protein	–
<i>TM4SF19</i>	transmembrane 4 L six family member 19	tetraspanin L6	–
<i>UBXD7</i>	UBX domain containing protein 7	uncharacterized	–
<i>C3ORF43</i>	LOC255798	uncharacterized	–
<i>RNF168</i>	Ring finger protein 168, E3 ubiquitin ligase	involved in DNA double-strand break repair	–
<i>WDR53</i>	WD repeat domain 53	uncharacterized	–
<i>LRRC33</i>	Leucine rich repeat containing protein 33	uncharacterized	–
<i>C3ORF34</i>	LOC84984	uncharacterized	–
<i>PIGX</i>	Glycosylphosphatidylinositol-mannosyltransferase I component X	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis	–
<i>PAK2</i>	P21-activated kinase 2	link Rho GTPases to cytoskeleton reorganization and nuclear signaling	–
<i>SENP5</i>	SUMO1/sentrin specific peptidase 5	SUMO-specific protease	–
<i>NCBP2</i>	Nuclear cap binding protein subunit 2	pre-mRNA binding protein involved in splicing, processing and export	–
<i>PIGZ</i>	Glycosylphosphatidylinositol-mannosyltransferase I component Z	glycosylphosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis	–
<i>MFI2</i>	Melanotransferrin	cellular uptake of iron	–
<i>DLG1</i>	Discs, large homolog 1	membrane associated guanylate kinase(MAGUK) homolog	–
<i>BDH1</i>	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 1	interconversion of acetoacetate and (R)-3-hydroxybutyrate	–
<i>KIAA0226</i>	rundataxin	mutated in Salih ataxia (this paper)	2927delC (Ala943ValfsX146) exon 19
<i>FYTTD1</i>	Forty-two-three domain containing protein 1	mRNA export from nucleus to cytoplasm	–
<i>LRCH3</i>	Leucine-rich repeats and calponin homology protein	uncharacterized	–
<i>IQCG</i>	IQ motif containing protein G	uncharacterized	–
<i>RPL35A</i>	Ribosomal protein L35a	component of the 60S ribosomal subunit	–

Discussion

I. Stratégie de cartographie par homozygotie

Au cours de ce travail et grâce à la stratégie de cartographie par homozygotie dans des familles consanguines, j'ai identifié et participé à l'identification de 4 gènes d'ataxies récessives. Grâce à la disponibilité des puces de génotypage de SNPs, l'analyse du tour du génome par génotypage de 400 marqueurs microsatellites a été remplacée par l'analyse des SNP. Au début, nous avons analysé la plupart de nos familles à l'aide des puces 10K et 50K, les seules disponibles à l'époque. L'analyse des résultats de SNP a été largement facilitée par l'utilisation du programme HomoSNP et la création d'une base de données permettant de localiser tous les gènes d'ataxies récessives. Une fois que la région d'homozygotie par descendance a été confirmée chez les membres atteints d'une famille, la recherche de mutations dans les gènes de cette région nous a permis de trouver le gène en cause et le mécanisme physiopathologique impliqué.

L'utilisation des puces Affymetrix nous a permis d'identifier 10 mutations dans 11 familles homozygotes pour une région qui chevauche avec un gène d'ataxie connu (*sacsine*, *aprataxine*, *ATM* et *senataxine*). Cette analyse s'est avérée indispensable puisque la présentation clinique des patients n'était pas toujours suffisante pour orienter le diagnostic. La présentation clinique des patients des six familles ARSACS n'a pas permis à elle seule de mettre le gène *Sacsine* en cause. Les membres atteints de cinq familles parmi les six avaient un tableau atypique d'ARSACS avec un âge de début tardif (>5ans) alors que l'âge de début d'une ARSACS classique correspond au début de la marche. Pour la famille 8, les patients avaient un âge de début tardif (16 et 32 ans) et une évolution très lentement progressive sans développer de neuropathie motrice ce qui n'est pas en faveur du diagnostic d'AOA1. La recherche de la mutation dans l'*aprataxine* n'est devenue évidente qu'après analyse de cette famille par les puces de génotypage. En absence d'élévation du taux d' α -foetoprotéine et de mutation dans les gènes *ATM* et *MRE11* chez les quatre enfants atteints de la famille 10 malgré une liaison génétique claire à ce locus, nous suggérons qu'une mutation dans un nouveau gène de la région 11q21-q23 est responsable de l'ataxie dans cette famille. La recherche de ce gène est en cours par séquençage haut débit.

La couverture en SNP peut parfois limiter l'identification des régions d'homozygotie parce que la majorité des régions homozygotes de petite taille sont dues à une homozygotie par manque d'informativité des SNP et non une homozygotie par descendance, ce qui est un facteur confondant. Par exemple, la région unique d'homozygotie partagée par les 3 patients

de la famille 6 est de 23 Mb couverte seulement par 27 SNP (puce 10K) : une région un peu plus petite n'aurait pas été identifiée. L'utilisation des puces «nouvelle génération» avec une haute densité en SNP (250K et 900K) permettra de résoudre cette difficulté. Les puces de génotypage 900K, combinant plus de 900.000 marqueurs polymorphes de type SNP répartis de manière uniforme dans le génome humain, offrent la possibilité de faire le tour complet du génome avec une très forte densité de marqueurs qui compense le défaut relatif d'hétérozygotie de chaque SNP.

Malgré l'efficacité de notre stratégie, la majorité des familles analysées par puces (87 familles) sont restées sans diagnostic et la recherche de mutations a été entreprise. La mutation pourrait être dans de nouveaux gènes ou dans d'autres gènes connus d'ataxies. Certaines familles sont liées à des loci déjà connus d'ataxies et d'autres sont homozygotes dans des régions contenant les gènes *SYNE1*, *MRE11*, *TDPI*, *Twinkle* et *POLG*. Cependant, aucune mutation dans ces gènes n'a été identifiée. Notre travail a permis d'identifier 4 nouveaux gènes responsables de la maladie dans 8 familles. Bien que l'un des 4 gènes code pour une protéine mitochondriale, ce qui correspond à une voie physiopathologique majeure des ataxies récessives, les 3 autres gènes codent pour des protéines apparemment impliquées dans des voies physiopathologiques nouvelles.

II. Physiopathologie des ataxies récessives

Deux défauts majeurs sont responsables d'ataxies récessives progressives: le premier lié au dysfonctionnement mitochondrial et au stress oxydatif et le deuxième concernant les défauts de réparation de l'ADN. Cependant, l'identification de nouveaux mécanismes impliqués dans les ataxies a élargi le spectre physiopathologique des ataxies. Nous avons pu mettre en cause des gènes codant pour une protéine du transport vésiculaire, une lipase dégradant probablement les endocannabinoïdes et un canal ionique.

A. Protéines mitochondriales et stress oxydatif: cas d'*ADCK3* muté dans *ARCA2*

Le dysfonctionnement mitochondrial est le résultat de mutations au niveau de l'ADN mitochondrial ou de l'ADN nucléaire codant des protéines mitochondriales. Ce

dysfonctionnement est en plus associé à une élévation de la production de ROS (reactive oxygen species) et un stress oxydant. Une ataxie cérébelleuse majeure a été identifiée chez des patients ayant un déficit en coenzyme Q₁₀ (Lamperti et al., 2003). L'identification des mutations d'*ADCK3* responsable de cette nouvelle forme d'ataxie ARCA2 associée à un déficit en coenzyme Q₁₀ a renforcé l'hypothèse sur l'implication des protéines mitochondriales dans les ataxies, bien que ceci puisse également représenter un biais d'observation. La diminution de la fonction respiratoire du CoQ₁₀ génère probablement un stress oxydant. Un autre exemple, le déficit en vitamine E anti-oxydante est responsable de l'ataxie dans le cas d'AVED et d'ABL.

Bien que modéré, le déficit en coenzyme Q₁₀ observé chez les patients ARCA2 montre l'implication d'*ADCK3* dans le métabolisme de CoQ₁₀. Ce phénotype modéré pourrait être expliqué par un rôle régulateur, plutôt qu'enzymatique, d'*ADCK3* dans la biosynthèse du CoQ. L'homologie d'*ADCK3* avec la famille des kinases atypiques est en faveur d'une fonction régulatrice. En effet, les déficits primaires en CoQ₁₀ sont associés à 3 phénotypes cliniques majeurs:

- Une forme infantile sévère d'encéphalopathie pouvant être associée ou non à une myopathie ou à une atteinte multisystémique avec en particulier une atteinte rénale (Rotig et al., 2000)
- Une forme de myopathie avec implication du système nerveux central.
- Une forme dominée par une ataxie qui peut être associée à d'autres signes neurologiques ou extra-neurologiques (Lamperti et al., 2003).

Des mutations dans des gènes codant pour des protéines ayant un rôle direct dans la biosynthèse du CoQ₁₀ sont responsables de déficits primaires en CoQ₁₀ et d'un phénotype plus sévère. Ceci est le cas des mutations dans les gènes *PDSS1* (Mollet et al., 2007), *PDSS2* (Lopez et al., 2006) et *CoQ2* (Mollet et al., 2007; Quinzii et al., 2006). Les mutations de *PDSS1* ont été décrites chez des patients avec une atteinte multisystémique avec une encéphalopathie, une surdité et une atteinte rénale. Deux mutations à l'état hétérozygote composite ont été décrites dans *PDSS2* chez un patient présentant un tableau sévère associant un syndrome de Leigh à une néphropathie. Les mutations dans les gènes codant pour des protéines non directement impliquées dans la voie de biosynthèse du CoQ₁₀ sont responsables de déficits secondaires en CoQ comme dans le cas de AOA1.

Dans le cas de déficit en CoQ, Il est important de faire le diagnostic précocément car un traitement substitutif oral en CoQ a montré un effet bénéfique chez certains de ces patients (Rotig et al., 2000). Le traitement substitutif en CoQ a montré un effet sur la fonction mitochondriale de certains patients (Aure et al., 2004; Rotig et al., 2000). Cependant, dans certains cas les patients s'aggravent ou voient apparaître de nouveaux symptômes alors qu'ils sont sous traitement (Aure et al., 2004). En particulier, il ne semble pas que l'ataxie soit améliorée par le traitement substitutif (Aure et al., 2004; Quinzii et al., 2007), alors que l'atteinte musculaire semble être sensible à ce traitement (Aure et al., 2004).

B. L' α/β hydrolase et le système endocannabinoïde

Les mutations perte de fonction de l'enzyme ABHD12 responsables du syndrome PHARC montrent pour la première fois l'implication du système endocannabinoïde dans une maladie héréditaire. ABHD12 appartient à la famille des α/β hydrolases contenant 15 membres. ABHD12 est une glycoprotéine intégrale de la membrane et est connue sous le nom de Monoacylglycérol lipase ou 2-arachidonylglycérol hydrolase (2AG). Dans un modèle murin, Blankman et al ont montré que l'hydrolyse du 2AG est assurée par 2 hydrolases autres que ABHD12: ABHD6 et MAGL. MAGL est responsable de l'hydrolyse de 85% du 2AG, 9% sont hydrolysés par ABHD12 et 4% par ABHD6 (Blankman et al., 2007). Le 2-AG est un des endocannabinoïdes du système nerveux central agissant sur les récepteurs des cannabinoïdes CB1 et CB2. Le système endocannabinoïde régule les différents processus physiologiques incluant la neurotransmission, la régulation de l'appétit, l'inflammation... Les mutations de ABHD12 peuvent être responsables de la perte de fonction d'hydrolyse du 2AG, dans les cellules gliales où ABHD12 est fortement exprimée, entraînant son accumulation ainsi que la suractivation des récepteurs CB1 induisant une neurodégénérescence. Des études fonctionnelles sont essentielles pour la compréhension du mécanisme en cause et la relation entre le système endocannabinoïde et les ataxies.

C. Implication des canaux ioniques dans les ataxies

L'identification des mutations dans 3 familles d'origines différentes dans le gène *ANO10* montre que *ANO10* est le gène causal de l'ataxie. *ANO10* (ou *TMEM16K*) est un membre de la famille des anoctamines qui codent pour des canaux chlore calcium-dépendant. Le rôle des canaux chlore calcium-dépendant dans la régulation de l'excitabilité neuronale est bien établi et les dérégulations de la signalisation calcique au niveau des cellules de Purkinje est un des mécanismes majeurs responsables d'une ataxie cérébelleuse. *ANO10* peut jouer un rôle dans cette signalisation et donc une absence d'*ANO10* pourrait entraîner une perturbation calcique et être responsable de cette nouvelle forme d'ataxie cérébelleuse pure. Cette forme d'ataxie due à des mutations dans un canal chlore rappelle les ataxies épisodiques dominantes de type 1 et 2 qui résultent des mutations dans les 2 gènes *KCNA1* (ou *Kv1.1*) et *CACNA1A* respectivement. Ces 2 gènes sont particulièrement abondants dans le cervelet. *KCNA1* code pour un canal potassium voltage-dépendant (Browne et al., 1994). *CACNA1A* code pour la sous-unité α (cav2.1) d'un canal calcium P/Q voltage-dépendant, un des principaux canaux impliqués dans la libération de neurotransmetteur dans le système nerveux central. Cependant, la fonction de *ANO10* reste à élucider.

D. La rundataxine définit une nouvelle voie physiopathologique

L'identification de la rundataxine souligne une fois de plus l'hétérogénéité physiopathologique des ataxies récessives en impliquant un nouveau mécanisme lié au transport vésiculaire. Malgré un LOD score dans notre famille AR inférieur à 3, la région 3q27.3-qter était la seule région liée à la maladie dans cette famille. De plus la mutation 2927delC au niveau de l'exon 19 du gène *KIAA0226* était la seule mutation pathologique trouvée dans les 49 gènes séquencés sur les 55 gènes de la région (les 6 autres gènes étaient de très mauvais candidats pour une ataxie). La recherche de mutations dans 172 autres familles n'a pas permis l'identification d'une autre mutation causale dans ce gène suggérant que cette forme d'ataxie est très rare. Au niveau protéique, la mutation 2927delC entraîne l'utilisation d'un nouveau cadre de lecture et l'absence du motif C-terminal de liaison au DAG.

1. Le domaine RUN

Les données bioinformatiques ainsi que nos premiers résultats de caractérisation de la rundataxine suggèrent que la rundataxine est impliquée dans le trafic vésiculaire. Comme ses paralogues, la rundataxine ne contient pas de domaine transmembranaire. Elle contient un domaine RUN en N-terminal et un domaine DAG-binding like en C-terminal. La fonction des paralogues de la rundataxine n'est connue que pour la PLEKHM1 et RUFY1. Les domaines RUN sont présents dans les protéines associées aux Rab GTPases. Malgré la divergence entre les domaines RUN, ils sont tous organisés en 6 motifs (A-F) riches en acides aminés hydrophobes conservés et possèdent une structure secondaire dominée par des hélices α . Des acides aminés basiques (R, K et H) présents dans les blocs A et D sont très conservés et peuvent jouer un rôle dans l'interaction avec les petites GTPases de la famille Rab (Callebaut et al., 2001). La fonction des domaines RUN n'est pas bien connue. Le gène *PLEKHM1* code pour une protéine adaptatrice qui contient en plus des domaines RUN et du domaine C-terminal de liaison au DAG, deux domaines PH. Les domaines PH sont présents dans une large variété de protéines impliquées dans le trafic intracellulaire (incluant celles qui interagissent avec les petites GTPases). Ces domaines lient les phosphoinositides et sont responsables du recrutement de la protéine vers la face cytosolique de la membrane (Cozier et al., 2004). La PLEKHM1, paralogue le plus proche de la rundataxine, colocalise avec Rab7 au niveau des endosomes tardifs/lysosomes. La localisation de la PLEKHM1 au niveau des endosomes tardifs dépend du recrutement de Rab7 à la membrane endosomale après son activation par géranylgeranylation (Van Wesenbeeck et al., 2007). L'absence de la PLEKHM1 entraîne l'altération des processus impliqués dans le transport/fusion des endosomes tardifs dans les ostéoclastes et en conséquence empêche la formation de la bordure en brosse. D'autre part, le domaine RUN de RUFY1 (Rabip4) situé en N-terminal est responsable de sa localisation subcellulaire au niveau des membranes puisque les interactions avec Rab4 et les PtdIns(3)P, situées au niveau du domaine C-terminal, ne sont pas suffisantes pour l'association membranaire de RUFY1 (Mari et al., 2001).

2. Le motif DAG

Le motif DAG binding-like de la rundataxine (HX₁₃CX₂CX₁₇CX₂CX₄HX₂CX₈C) diffère, par sa composition en acides aminés compris entre les différentes cystéines et

histidines, du domaine C1 des protéines kinases typiques et atypiques (HX₁₂CX₂CX₁₃CX₂CX₄HX₂CX₇C) (Figure 21). Il sera important de vérifier la capacité du motif de la rundataxine à lier le diacylglycérol et d'étudier la fonction exacte de ce motif. Notons que le domaine C1 présent dans les Vav et DAG kinases ne lie pas le DAG. Vav1 est un GEF pour Rac1, RhoA et cdc42. Les domaines PH et C1 de vav1 contribuent indirectement à cette activité GEF (Rapley et al., 2008). Les mutations de la protéine kinase C γ responsables de l'ataxie spinocérébelleuse SCA14 sont concentrées au niveau du domaine C1. PKC γ est exprimée au niveau des différents neurones en particulier au niveau des cellules de Purkinje du cervelet qui dégènèrent dans SCA14. Les mutations du domaine C1 perturbent la translocation à la membrane et l'activation de sa fonction kinase. Ceci résulte en une diminution de la phosphorylation des canaux calciques TRPC3 (canonical transient receptor potential) et une altération du flux calcique. Un taux intracellulaire élevé de calcium est alors probablement responsable de la neurodégénérescence observée dans SCA14 (Adachi et al., 2008).

D'autre part, le rôle du DAG dans la fusion vacuolaire chez la levure *S.cerevisiae* est confirmé par l'utilisation d'inhibiteurs de la phospholipase C. Ces inhibiteurs bloquent la synthèse du DAG qui provient de l'hydrolyse du PI(4,5)P₂ par la phospholipase C. Cette fusion dépend des Rab et des complexes SNARE et nécessite aussi les autres phosphoinositides comme le PI(4,5)P₂ ou le PI(3)P (Jun et al., 2004). De plus, le précurseur du DAG, PI(4,5)P₂, est nécessaire pour les premières étapes de la fusion vacuolaire; l'amorçage et l'arrimage.

3. Expression de la rundataxine

La rundataxine est exprimée d'une manière ubiquitaire et elle doit être présente en faible quantité dans les fibroblastes dans lesquels nous n'avons pu mettre en évidence que son transcrit. Nous avons pu mettre en évidence un épissage alternatif de ce transcrit extrait à partir des fibroblastes humains. Cet épissage alternatif ne change pas le cadre de lecture et est en phase avec les domaines RUN et DAG binding-like. Bien qu'ubiquitaire, il sera intéressant de déterminer le profil d'expression de la rundataxine dans différentes régions neuronales au cours du développement et de la différenciation neuronale pour vérifier si la rundataxine a un

C1-PKCα	DHKFIARFFKQPTF-CSHC	TDF---	IWGF	GKQ-GFQ	CQVCCFV	VHKRC	HEFV	TFS-C												
C1 -vav	GHD	FQMF	SFEETTS-CKAC	QML---	LRGT	FYQ-GYR	CHRC	RASAHKECLGRVPP--C												
C1-PKCζ	GHL	FQAK	RFNRRAY-CGQC	SER---	IWGL	ARQ-GYR	CINCKLLVHKR	CHGLVPLT-C												
PLEKHM1	QH	VYHCDL	CTQ	RGFI	CQIC	QHH-DI	I	FPFE	FDTTVRC	AECK	TVFH	QSC	QAVV	KKG-C						
Rundataxine	TH	VERC	MLC	QAKGFI	CEFC	Q	NEDDI	I	FP	FEL	HK	CR	TCEE	CK	ACYHK	AC	FK	SG	SC	PRC

Figure 21: Alignement entre les domaines C1

La signature du domaine C1 de la PLEKHM1 et de la rundataxine diffère de celle des protéines kinases typiques et atypiques par le nombre des acides aminés compris entre les cystéines et histidines conservées.

rôle particulier dans certaines structures du système nerveux central ou au cours du développement.

La difficulté à détecter la rundataxine endogène dans les fibroblastes humains de sujets contrôles et de patients nous a amenés à poursuivre sa caractérisation uniquement par surexpression dans des cellules COS et Hela. Nous avons observé une association de la rundataxine aux vésicules et nos études de colocalisation montrent que la rundataxine colocalise avec Rab7. De plus, la rundataxine ne colocalise pas avec Rab5 située au niveau des endosomes précoces. Des résultats préliminaires montrent aussi l'absence de colocalisation avec EEA1 (EEA1; early endosome antigen1). Les résultats de comarquage avec EEA1 restent à confirmer ainsi que la présence ou l'absence de colocalisation de la rundataxine avec des marqueurs des lysosomes (LAMP1 et LAMP2). L'interaction entre la rundataxine et Rab7 peut aussi être confirmée par des expériences de co-immunoprécipitation. Il sera intéressant de tester si l'interaction de la rundataxine avec Rab7 est une interaction directe comme c'est le cas de Rab5 avec RUFY1 et probablement aussi de la PLEKHM1 avec Rab7.

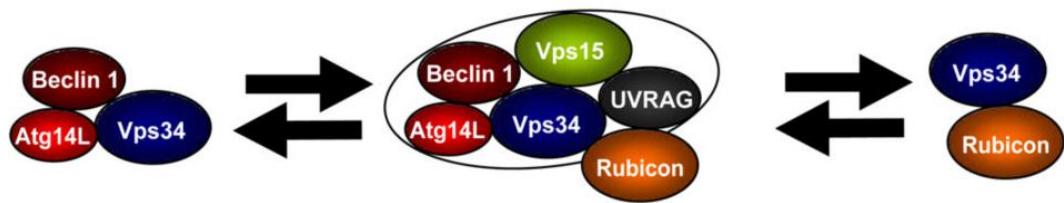
Comme prévu, la rundataxine mutante est bien détectée par l'anticorps N-terminal et non détectée par l'anticorps C-terminal confirmant l'absence du motif DAG-binding like. Ceci suggère aussi que la rundataxine mutante est stable, ce qui peut s'expliquer par la troncation d'une partie relativement petite de la protéine et le remplacement par un peptide sans structure prédite. La rundataxine mutante exprimée dans les cellules Hela présente une localisation cytosolique diffuse, ce qui montre que le motif DAG-binding like de la rundataxine est responsable de sa localisation au niveau des endosomes.

4. Rubicon (Rundataxine)

Zhong. et al et Matsunaga et al. (Matsunaga et al., 2009; Zhong et al., 2009) ont également identifié dès 2009 la rundataxine qu'ils ont nommée Rubicon. Nous n'avons pas pu identifier l'identité entre Rundataxine et Rubicon que lorsque les banques de séquence (dans notre cas SwissProt) ont mis à jour l'annotation de la séquence protéique de KIAA0226 avec les publications s'y rattachant, en octobre 2010. En effet, les deux articles princeps sur Rubicon d'avril 2009 ne contenaient la mention de *KIAA0226* ni dans le résumé des articles, ni dans les mots-clés, de telle sorte que ces articles ne pouvaient pas être identifiés par recherche

bibliographique électronique avec ce mot-clé. Il conviendra à l'avenir de donner le crédit de la première description de la protéine à Zhong et al. et Matsunaga et al. en appelant systématiquement cette protéine Rubicon (Rundataxine). Ces auteurs ont identifié Rubicon en cherchant par purification d'affinité et microséquençage les partenaires protéiques de la Becline1, un effecteur essentiel des mécanismes d'autophagie. Ils ont ainsi purifié 2 nouvelles protéines, Rubicon et Atg14L, en complexe avec la Becline1. Le nom de Rubicon découle de cette caractérisation: RUN domain and cysteine-rich domain containing, Beclin1-interacting protein. La Becline1 forme un complexe stable avec hVps34 ou phosphatidylinositol-3 kinase (PI(3)K) de classe III et hVps15. Ce complexe est impliqué dans la régulation de l'autophagie. Zhong. et al et Matsunaga et al. ont identifié *in vivo* un complexe majeur contenant la Becline1, p150/hVps15, hVps34, UVRAG, Atg14L et Rubicon. Ils ont pu déterminer aussi les domaines protéiques responsables de ces interactions. La Becline1 interagit avec Atg14L grâce à son domaine coiled-coil alors que l'interaction de la Becline1 avec Rubicon nécessite à la fois son domaine coiled-coil et son domaine conservé au cours de l'évolution nommé ECD. A son tour, Atg14L s'associe avec la Becline1 et hVps34 grâce à ses 2 domaines coiled-coil. Le domaine coiled-coil de Rubicon est responsable de son interaction avec la Becline1 et Vps34. Ces deux équipes ont pu déchiffrer le rôle d'Atg14L et Rubicon dans la régulation de l'autophagie en modulant l'activité de Vps34. Atg14L augmente l'activité de Vps34 et intervient dans la formation de l'autophagosome alors que Rubicon diminue l'activité de Vps34 et intervient dans l'étape de maturation de l'autophagosome. Rubicon co-localise principalement avec le marqueur des endosomes/lysosomes Lamp1, ce qui est totalement en accord avec mes propres résultats de colocalisation, et n'est pas localisée à la membrane des autophagosomes contrairement à Atg14L qui est localisée à la membrane des autophagosomes et du réticulum endoplasmique qui constitue une source de membranes pour les autophagosomes. Rubicon ne colocalise pas avec le marqueur GM130 de l'appareil de Golgi et colocalise partiellement avec EEA1.

A partir de ces résultats, les auteurs proposent la présence de 2 complexes: un complexe au niveau de l'autophagosome formé de la Becline1, Vps34 (PI3Kinase III), Vps15 et Atg14L et impliqué dans la formation de l'autophagosome et un 2^{ème} complexe localisé au niveau des endosomes, formé de la Becline1, Vps34 (PI3-Kinase III), Vps15, UVRAG et Rubicon et impliqué à la fois dans la maturation de l'autophagosome et de l'endosome (Figure 22). Rubicon régule négativement la fusion de l'autophagosome au lysosome et le transport endocytaire. En effet, une inhibition de l'expression de Rubicon résulte en une



**b. Complexe contenant
Atg14L et Becline1**

a. Complexe majeur in vivo

**c. Complexe
contenant Rubicon**

Figure 22: Les différents complexes possibles impliqués dans la régulation de l'autophagie

a. Dans les conditions physiologiques normales, un complexe majeur est formé d'un core principal (Becline1, p150/hVps15, hVps34, UVRAG et Atg14L) en association avec Rubicon .

D'autres complexes peuvent aussi être présents et participent dans la régulation de l'autophagie en modulant l'activité de Vps34:
b. Complexe contenant la Becline1 et Atg14L et intervenant dans la biogénèse de l'autophagosome.

c. Complexe contenant Rubicon et Vps34 et régulant négativement la maturation de l'autophagosome

(Modifiée d'après Zhong et al. Nat Cell Biol. 2009 April; 11(4): 468–476)

augmentation de la dégradation lysosomale du récepteur à l'EGF et en une réduction du recyclage vers la membrane plasmique du récepteur de la transferrine après son internalisation à travers les compartiments de l'endocytose.

D'autre part, Tabata et al (Tabata et al.) ont montré très récemment que Rubicon ainsi que son homologue, la PLEKHM1, interagissent directement avec Rab7 via leur domaine C-terminal nommé RH (Rubicon homologous domain). Ce domaine, composé de 9 cystéines et d'une histidine, est le domaine que nous avons nommé DAG binding-like et présente une homologie avec les domaines FYVE qui lient les phosphoinositides (domaines en doigt de zinc). Zhong et al. ont trouvé que, grâce à son domaine riche en cystéines, Rubicon est localisée au niveau de structures enrichies en Phosphatidylinositols-3 Phosphate (PtdIns(3)P). Nos résultats de colocalisation avec Rab7 et de l'effet de la mutation (p.Ala943ValfsX146) qui altère ce domaine sont en accord avec ceux de Tabata puisque la mutagenèse des cystéines et de l'histidine du doigt de zinc-like (mutants CGHL) réalisée par Tabata et al. abolit l'interaction de Rubicon et de PLEKHM1 avec Rab7 et donc leur localisation au niveau des endosomes. Contrairement à Rubicon, la PLEKHM1 n'interagit pas avec la Becline1. Pour remplir sa fonction, Rubicon s'associe à la fois au complexe Becline1- hVps34- hVps15 et à Rab7 (Figure 23). Comme Rubicon, la PLEKHM1 régule négativement le trafic endocytaire du récepteur à l'EGF. Alors que la surexpression de PLEKHM1 ou de Rubicon inhibe le transport de l'EGF vers les lysosomes et entraîne un élargissement des endosomes, la surexpression des mutants CGHL n'a aucun effet sur le transport vers les lysosomes ou la morphologie des compartiments endocytaires. Ceci montre que Rubicon facilite le recyclage des récepteurs à la membrane plasmique et réduit le transport vers les lysosomes grâce à son association avec Rab7. De plus, les mutants CGHL de Rubicon peuvent s'associer à la Becline1. Les résultats de Tabata montrent que Rubicon sert d'intermédiaire dans l'interaction de Rab7 avec hVps34 et hVps15. De plus, l'interaction avec Rab7 n'est pas suffisante à elle seule pour assurer la totalité des fonctions de Rubicon. L'association avec le complexe de la Becline1 est également essentielle. Des résultats précédents ont montré qu'UVRAG se lie au complexe HOPS qui a une activité GEF (guanine exchange factor) pour Rab7.

Contrairement à Rubicon, UVRAG régule positivement l'activité de Vps34/PI3Kinase de classe III et est impliquée dans la maturation de l'autophagosome et de l'endosome probablement par son interaction avec C-VPS/HOPS. Très récemment, Sun et al. (Sun et al.) ont montré qu'UVRAG et Rab7 sont en compétition pour s'associer à Rubicon. Rubicon séquestre UVRAG du complexe HOPS et bloque donc l'activation de Rab7. Une fois

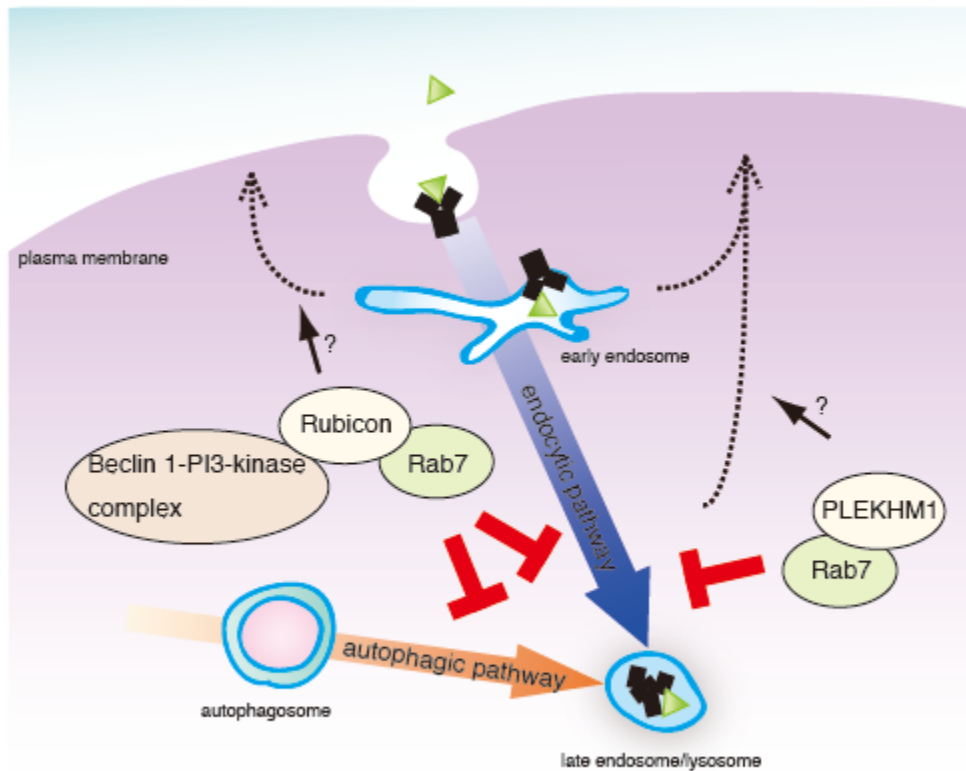


Figure 23: Rubicon et PLEKHM1: rôle dans la voie de l'endocytose

Rubicon et PLEKHM1 régulent négativement la voie endocytique grâce à leur interaction avec Rab7. Rubicon s'associe à la fois au complexe de la Becline1-PI3kinase et Rab7 lui permettant de réguler la voie endocytique et la maturation de l'autophagosome. En régulant négativement la voie de l'endocytose, Rubicon et PLEKHM1 pourront faciliter le recyclage des récepteurs à la membrane plasmique et réduire le transport vers les lysosomes.

Rab7 est sous sa forme active liée au GTP, elle interagit avec Rubicon et entre en compétition avec UVRAG du complexe Rubicon/UVRAG. Autrement dit, Rab7-GTP libère UVRAG séquestrée par Rubicon. Ceci a deux conséquences: d'une part UVRAG se lie au complexe C-VPS/HOPS et l'active et d'une autre part, l'activité PI3Kinase de classe III est affectée puisque UVRAG régule positivement cette activité. De cette façon, Rubicon agit comme un effecteur de Rab7 en régulant négativement l'activation de Rab7 et la maturation des endosomes.

L'ensemble de ces résultats a donc révélé le rôle de la partie centrale de Rubicon contenant le domaine coiled-coil qui est responsable de son interaction avec la Beclin1 ainsi que le rôle du domaine C-terminal dans l'interaction avec Rab7. Rubicon interagit avec Vps34/ PI3-Kinase via son domaine RUN comme le montrent Sun et al (Sun et al.). Le domaine RUN est aussi indispensable pour la régulation de l'activité Kinase de PI3-Kinase et de l'autophagie.

L'absence de la colocalisation de Rubicon avec Rab7 dans le cas de la mutation (p.Ala943ValfsX146) trouvée dans notre famille a donc le même effet que les mutants CGHL. Dans ce cas, seule l'interaction avec Rab7 est altérée et donc il y aura une dérégulation de l'endocytose. La maturation des endosomes sera augmentée, le transport vers les lysosomes ainsi que la dégradation lysosomale des récepteurs comme le récepteur à l'EGF seront accélérés et le recyclage des récepteurs sera diminué.

D'autre part, l'expression de Rab7 dans les cellules neuronales s'explique par son rôle dans le transport axonal. En effet, Rab7 interagit avec TrkA et contrôle le trafic endosomal et la signalisation de TrkA (Saxena et al., 2005). Dans le système nerveux, les neurotrophines (NGF, BDNF...) et leurs récepteurs tyrosine kinase Trk régulent un grand nombre de processus incluant la survie cellulaire, la prolifération, la croissance des neurites et des axones, la plasticité synaptique, et l'expression d'importantes protéines comme les canaux ioniques et les récepteurs aux neurotransmetteurs. La liaison des neurotrophines à leurs récepteurs TrkA active la cascade de signalisation à la surface cellulaire. La signalisation TrkA active les petites GTPases incluant Ras, Rap-1, la famille des Rho/Rac GTPases et les voies régulées par les MAPKines, PI3-kinase et la phospholipase C γ . En présence de NGF, les cellules PC12 commencent leur différenciation par la croissance des neurites qui dépend de Erk1 et 2 (extracellular signal-regulated kinases) activées par la signalisation TrkA. Rab7 GTP (active) augmente la vitesse de transport endosomal assuré par la dynéine le long des

microtubules. Notons que la phospholipase C, activée par la signalisation TrkA, est responsable de l'hydrolyse du PI(4,5)P₂ en diacylglycérol et IP₃. Le DAG active les protéines kinases C. Dans les cellules PC12, PKC δ est nécessaire pour la croissance des neurites sous l'action du NGF et l'activation des kinases Erk1 et 2.

Les récepteurs TrkA activés ne sont pas localisés uniquement à la surface cellulaire mais aussi au niveau des endosomes. Après leur activation, les récepteurs TrkA présents dans les vésicules revêtues de clathrine sont internalisés. L'internalisation des récepteurs TrkA constitue une étape importante dans la croissance des neurites. Les récepteurs TrkA internalisés seront triés des endosomes précoces vers les endosomes tardifs et une partie sera dégradée par les lysosomes (Saxena et al., 2005). D'autres récepteurs internalisés seront transportés d'une manière rétrograde sur de longues distances de la synapse vers le corps cellulaire du neurone pour assurer les différentes réponses. Ce transport est médié par la dynéine le long des microtubules. L'internalisation des récepteurs permet donc d'arrêter la signalisation d'un côté et d'un autre côté de transmettre ce signal par transport rétrograde.

L'expression du dominant négatif Rab7 T22N résulte en une accumulation de TrkA au niveau des endosomes et une augmentation de la signalisation de TrkA dans des cellules PC12. Ceci entraîne aussi une augmentation de la phosphorylation de Erk1/2 et donc de leur activation, de la croissance des neurites et de l'expression de GAP-43 (growth associated protein 43) (Saxena et al., 2005). Or Rab7 joue un rôle important dans cette signalisation en régulant le transport rétrograde au niveau des axones des neurones moteurs et sensitifs. Deinhardt et al ont montré que Rab7 est présente dans les vésicules de transport axonal rétrograde impliquées dans le transport de neurotrophines et de leurs récepteurs (Deinhardt et al., 2006).

Le rôle de Rab7 dans le transport rétrograde au niveau du système nerveux suggère que la rundataxine pourrait être impliquée dans ce transport. Des mutations faux-sens de Rab7 sont responsables de la neuropathie Charcot-Marie-Tooth de type II ulcéro-mutilante CMT2B (Houlden et al., 2004; Meggouh et al., 2006; Verhoeven et al., 2003). Ces mutations touchent des acides aminés très conservés, ont un effet similaire à celui d'une forme mutante Rab7Q67L constitutivement active, et montrent une réduction de l'hydrolyse du GTP. Contrairement à Rab7Q67L, les mutations causant CMT2B ont une affinité réduite pour les nucléotides guanilique et en particulier pour le GDP (Cogli et al., 2009; De Luca et al., 2008; Spinosa et al., 2008). Ceci suggère que les formes mutantes de Rab7 sont des mutations gain

de fonction qui restent sous forme active, liées au GTP. Dans CMT2B, les mutations de Rab7 inhibent la croissance des neurites dans les cellules PC12 et Neuro2A (Cogli et al.). Cet effet est aussi observé dans le cas du mutant Rab7Q67L. Une des mutations de Rab7 dans CMT2B (L129F) montre une altération de la poche de liaison aux nucléotides qui entraîne une altération de liaison du GTP (McCray et al.). McCray et al ont montré que l'augmentation de l'activité GTPase dans les formes mutantes est due à un manque de régulation d'échange nucléotidique plutôt qu'à un défaut de l'hydrolyse, conduisant à une activation excessive de Rab7, à une localisation membranaire prolongée, et à une augmentation de l'interaction de Rab7 avec ses effecteurs. De plus, les mutants Rab7 sont capables d'être activés grâce à un échange rapide pour le GTP et non contrôlé par les GEFs et les GAPs.

5. Rubicon (Rundataxine) et protéines impliquées dans les paraplégies spastiques

La fonction suggérée de la rundataxine dans le trafic vésiculaire semble se rapprocher plus de celle des protéines mutées dans les paraplégies spastiques. Certaines protéines mutées dans les paraplégies spastiques partagent des mécanismes communs importants pour le maintien axonal.

La spastine, une AAA ATPase, est mutée dans la paraplégie spastique SPG4 (Charvin et al., 2003; Hazan et al., 1999). Elle joue un rôle important dans la dynamique des microtubules d'une manière similaire à la katanine impliquée dans cette fonction. Les mutations de la spastine sont associées avec une interaction anormale avec les microtubules (Errico et al., 2002) et avec un regroupement anormal des mitochondries et des peroxysomes dans la région périnucléaire (McDermott et al., 2003). Ceci suggère une perturbation du transport intracellulaire médié par la kinésine. La spastine joue aussi un rôle dans le trafic membranaire grâce à son domaine MIT (microtubule interacting and trafficking domain) et ses interactions avec la protéine centrosomale NA14 (Errico et al., 2004) et avec la protéine CHMP1B, une protéine associée au complexe ESCRTIII (endosomal sorting complex required for transport) (Reid et al., 2005). De plus, la spastine est présente au niveau de la voie sécrétoire précoce, des endosomes et du midbody ce qui suggère un rôle dans la cytokinèse (Connell et al., 2009). La spastine interagit avec l'atlastine (Evans et al., 2006; Sanderson et al., 2006).

L'atlastine est mutée dans SPG3 (Zhao et al., 2001b). L'atlastine est une GTPase localisée au niveau du golgi, du réticulum endoplasmique, des neurites et des cônes de croissance et est impliquée dans la croissance des neurites (Zhu et al., 2003; Zhu et al., 2006). Des mutations dans le domaine GTPase altèrent la morphologie du Golgi et du réticulum endoplasmique ceci montre que l'atlastine est impliquée dans le trafic vésiculaire à l'interface Golgi/ER et dans la maturation de l'appareil de Golgi (Namekawa et al., 2007).

L'alsine, qui est un GEF pour Rab5 et Rac1, est mutée dans la paraplégie spastique ascendante avec début infantile et dans une forme juvénile de sclérose latérale amyotrophique (Eymard-Pierre et al., 2002; Hadano et al., 2006; Hadano et al., 2001; Topp et al., 2004). Les mutations de l'alsine entraînent une altération du trafic vésiculaire. La déficience en alsine, localisée au niveau des endosomes précoces, conduit à une fusion retardée des endosomes contenant l'EGF et une diminution de leur motilité. Ceci suggère un rôle de l'alsine dans la fusion endosomale dépendante de Rab5 (Hadano et al., 2006).

NIPA1, mutée dans SPG6 (Rainier et al., 2003), est un transporteur de magnésium associé aux endosomes précoces (Goytain et al., 2007). La spartine, mutée dans SPG20 (Cicarelli et al., 2003) semble être impliquée dans les mêmes mécanismes que son interacteur Eps15: l'endocytose et le trafic vésiculaire (Bakowska et al., 2005). La maspardine, mutée dans SPG21 (Simpson et al., 2003), est localisée au niveau des membranes du réseau Golgi/ réticulum endoplasmique supportant son rôle dans cette voie (Hanna and Blackstone, 2009).

Il semble donc bien que la mutation de la rundataxine perturbe des voies physiopathologiques similaires à celles des paraplégies spastiques et des neuropathies périphériques, même si les trois patientes de notre famille mutée ne présentent ni spasticité ni neuropathie périphérique.

E. Conclusions et perspectives générales

En conclusion, notre stratégie de cartographie par homozygotie nous a permis d'identifier 4 gènes responsables de nouvelles formes d'ataxie. Cependant, les progrès dans le séquençage du génome humain va permettre de s'affanchir de l'étape de cartographie d'homozygotie proprement dite, pour aller directement à la recherche de la mutation. Les nouvelles avancées dans les possibilités de séquençage consistent en un séquençage à haut débit ciblé sur l'ensemble des exons codants du génome à partir de puces de capture dédiées à

l'exome. Ces nouvelles approches vont générer une masse considérable d'informations difficiles à gérer, même si la méthode peut partiellement se substituer à la liaison génétique en permettant de faire de la cartographie par homozygotie directement à partir des données de séquence. La masse de données accumulées devrait conduire à des besoins supplémentaires en validation de résultats. Différentes techniques de séquençage à haut débit ou «next generation sequencing» sont présentes sur le marché et diffèrent par la préparation des échantillons, le séquençage et l'alignement des séquences. Une difficulté inhérente à la production d'énormes quantités de séquences est de distinguer la vraie mutation pathogène (signal) des nombreuses variations silencieuses polymorphiques du génome (bruit).

L'utilisation efficace de ces nouvelles stratégies devrait permettre d'identifier des dizaines d'autres gènes d'ataxie récessive, puisque ce groupe de maladies, comme d'autres, semble être d'une incroyable complexité et diversité. L'identification de nouveaux gènes d'ataxie permettra d'établir une corrélation phénotype-génotype et d'orienter le diagnostic et la thérapie de ces ataxies.

Références Bibliographiques

- Adachi, N., Kobayashi, T., Takahashi, H., Kawasaki, T., Shirai, Y., Ueyama, T., Matsuda, T., Seki, T., Sakai, N., and Saito, N. (2008). Enzymological analysis of mutant protein kinase C γ causing spinocerebellar ataxia type 14 and dysfunction in Ca²⁺ homeostasis. *J Biol Chem* 283, 19854-19863.
- Adamec, J., Rusnak, F., Owen, W. G., Naylor, S., Benson, L. M., Gacy, A. M., and Isaya, G. (2000). Iron-dependent self-assembly of recombinant yeast frataxin: implications for Friedreich ataxia. *Am J Hum Genet* 67, 549-562.
- Aicardi, J., Barbosa, C., Andermann, E., Andermann, F., Morcos, R., Ghanem, Q., Fukuyama, Y., Awaya, Y., and Moe, P. (1988). Ataxia-ocular motor apraxia: a syndrome mimicking ataxia-telangiectasia. *Ann Neurol* 24, 497-502.
- Allikmets, R., Raskind, W. H., Hutchinson, A., Schueck, N. D., Dean, M., and Koeller, D. M. (1999). Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A). *Hum Mol Genet* 8, 743-749.
- Amouri, R., Moreira, M. C., Zouari, M., El Euch, G., Barhoumi, C., Kefi, M., Belal, S., Koenig, M., and Hentati, F. (2004). Aprataxin gene mutations in Tunisian families. *Neurology* 63, 928-929.
- Anheim, M., Fleury, M., Monga, B., Laugel, V., Chaigne, D., Rodier, G., Ginglinger, E., Boulay, C., Courtois, S., Drouot, N., *et al.* Epidemiological, clinical, paraclinical and molecular study of a cohort of 102 patients affected with autosomal recessive progressive cerebellar ataxia from Alsace, Eastern France: implications for clinical management. *Neurogenetics* 11, 1-12.
- Anheim, M., Fleury, M., Monga, B., Laugel, V., Chaigne, D., Rodier, G., Ginglinger, E., Boulay, C., Courtois, S., Drouot, N., *et al.* (2009a). Epidemiological, clinical, paraclinical and molecular study of a cohort of 102 patients affected with autosomal recessive progressive cerebellar ataxia from Alsace, Eastern France: implications for clinical management. *Neurogenetics*.
- Anheim, M., Lagier-Tourenne, C., Stevanin, G., Fleury, M., Durr, A., Namer, I. J., Denora, P., Brice, A., Mandel, J. L., Koenig, M., and Tranchant, C. (2009b). SPG11 spastic paraplegia. A new cause of juvenile parkinsonism. *J Neurol* 256, 104-108.
- Anheim, M., Monga, B., Fleury, M., Charles, P., Barbot, C., Salih, M., Delaunoy, J. P., Fritsch, M., Arning, L., Synofzik, M., *et al.* (2009c). Ataxia with oculomotor apraxia type 2: clinical, biological and genotype/phenotype correlation study of a cohort of 90 patients. *Brain* 132, 2688-2698.
- Anttonen, A. K., Mahjneh, I., Hamalainen, R. H., Lagier-Tourenne, C., Kopra, O., Waris, L., Anttonen, M., Joensuu, T., Kalimo, H., Paetau, A., *et al.* (2005). The gene disrupted in Marinesco-Sjogren syndrome encodes SIL1, an HSPA5 cochaperone. *Nat Genet* 37, 1309-1311.
- Apel, E. D., Lewis, R. M., Grady, R. M., and Sanes, J. R. (2000). Syne-1, a dystrophin- and Klarsicht-related protein associated with synaptic nuclei at the neuromuscular junction. *J Biol Chem* 275, 31986-31995.
- Arita, M., Sato, Y., Miyata, A., Tanabe, T., Takahashi, E., Kayden, H. J., Arai, H., and Inoue, K. (1995). Human alpha-tocopherol transfer protein: cDNA cloning, expression and chromosomal localization. *Biochem J* 306 (Pt 2), 437-443.
- Atorino, L., Silvestri, L., Koppen, M., Cassina, L., Ballabio, A., Marconi, R., Langer, T., and Casari, G. (2003). Loss of m-AAA protease in mitochondria causes complex I deficiency and increased sensitivity to oxidative stress in hereditary spastic paraplegia. *J Cell Biol* 163, 777-787.
- Aure, K., Benoist, J. F., Ogier de Baulny, H., Romero, N. B., Rigal, O., and Lombes, A. (2004). Progression despite replacement of a myopathic form of coenzyme Q10 defect. *Neurology* 63, 727-729.
- Babcock, M., de Silva, D., Oaks, R., Davis-Kaplan, S., Jiralerspong, S., Montermini, L., Pandolfo, M., and Kaplan, J. (1997). Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science* 276, 1709-1712.
- Bakkenist, C. J., and Kastan, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499-506.
- Bakowska, J. C., Jenkins, R., Pendleton, J., and Blackstone, C. (2005). The Troyer syndrome (SPG20) protein spartin interacts with Eps15. *Biochem Biophys Res Commun* 334, 1042-1048.

- Ball, L. G., and Xiao, W. (2005). Molecular basis of ataxia telangiectasia and related diseases. *Acta Pharmacol Sin* 26, 897-907.
- Barboi, A. C. (2000). Cerebellar ataxia. *Arch Neurol* 57, 1525-1527.
- Barbot, C., Coutinho, P., Choro, R., Ferreira, C., Barros, J., Fineza, I., Dias, K., Monteiro, J., Guimaraes, A., Mendonca, P., *et al.* (2001). Recessive ataxia with ocular apraxia: review of 22 Portuguese patients. *Arch Neurol* 58, 201-205.
- Barlow, C., Hirotsune, S., Paylor, R., Liyanage, M., Eckhaus, M., Collins, F., Shiloh, Y., Crawley, J. N., Ried, T., Tagle, D., and Wynshaw-Boris, A. (1996). Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* 86, 159-171.
- Bassen, F. A., and Kornzweig, A. L. (1950). Malformation of the erythrocytes in a case of atypical retinitis pigmentosa. *Blood* 5, 381-387.
- Bayer, M., Fischer, J., Kremerskothen, J., Ossendorf, E., Matanis, T., Konczal, M., Weide, T., and Barnekow, A. (2005). Identification and characterization of Iporin as a novel interaction partner for rab1. *BMC Cell Biol* 6, 15.
- Bekri, S., Kispal, G., Lange, H., Fitzsimons, E., Tolmie, J., Lill, R., and Bishop, D. F. (2000). Human ABC7 transporter: gene structure and mutation causing X-linked sideroblastic anemia with ataxia with disruption of cytosolic iron-sulfur protein maturation. *Blood* 96, 3256-3264.
- Ben Hamida, C., Doerflinger, N., Belal, S., Linder, C., Reutenauer, L., Dib, C., Gyapay, G., Vignal, A., Le Paslier, D., Cohen, D., and *et al.* (1993a). Localization of Friedreich ataxia phenotype with selective vitamin E deficiency to chromosome 8q by homozygosity mapping. *Nat Genet* 5, 195-200.
- Ben Hamida, M., Belal, S., Sirugo, G., Ben Hamida, C., Panayides, K., Ionannou, P., Beckmann, J., Mandel, J. L., Hentati, F., Koenig, M., and *et al.* (1993b). Friedreich's ataxia phenotype not linked to chromosome 9 and associated with selective autosomal recessive vitamin E deficiency in two inbred Tunisian families. *Neurology* 43, 2179-2183.
- Benayoun, L., Granot, E., Rizel, L., Allon-Shalev, S., Behar, D. M., and Ben-Yosef, T. (2007). Abetalipoproteinemia in Israel: evidence for a founder mutation in the Ashkenazi Jewish population and a contiguous gene deletion in an Arab patient. *Mol Genet Metab* 90, 453-457.
- Benomar, A., Yahyaoui, M., Meggouh, F., Bouhouche, A., Boutchich, M., Bouslam, N., Zaim, A., Schmitt, M., Belaidi, H., Ouazzani, R., *et al.* (2002). Clinical comparison between AVED patients with 744 del A mutation and Friedreich ataxia with GAA expansion in 15 Moroccan families. *J Neurol Sci* 198, 25-29.
- Berriot-Varoqueaux, N., Aggerbeck, L. P., Samson-Bouma, M., and Wetterau, J. R. (2000). The role of the microsomal triglyceride transfer protein in abetalipoproteinemia. *Annu Rev Nutr* 20, 663-697.
- Bidichandani, S. I., Ashizawa, T., and Patel, P. I. (1997). Atypical Friedreich ataxia caused by compound heterozygosity for a novel missense mutation and the GAA triplet-repeat expansion. *Am J Hum Genet* 60, 1251-1256.
- Blankman, J. L., Simon, G. M., and Cravatt, B. F. (2007). A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biol* 14, 1347-1356.
- Bomont, P., Watanabe, M., Gershoni-Barush, R., Shizuka, M., Tanaka, M., Sugano, J., Guiraud-Chaumeil, C., and Koenig, M. (2000). Homozygosity mapping of spinocerebellar ataxia with cerebellar atrophy and peripheral neuropathy to 9q33-34, and with hearing impairment and optic atrophy to 6p21-23. *Eur J Hum Genet* 8, 986-990.
- Bonifacino, J. S., and Glick, B. S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116, 153-166.
- Bouchard, J. P., Barbeau, A., Bouchard, R., and Bouchard, R. W. (1978). Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Can J Neurol Sci* 5, 61-69.
- Bouchard, J. P., Richter, A., Mathieu, J., Brunet, D., Hudson, T. J., Morgan, K., and Melancon, S. B. (1998). Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Neuromuscul Disord* 8, 474-479.
- Braegger, C. P., Belli, D. C., Mentha, G., and Steinmann, B. (1998). Persistence of the intestinal defect in abetalipoproteinaemia after liver transplantation. *Eur J Pediatr* 157, 576-578.
- Browne, D. L., Gancher, S. T., Nutt, J. G., Brunt, E. R., Smith, E. A., Kramer, P., and Litt, M. (1994). Episodic ataxia/myokymia syndrome is associated with point mutations in the human potassium channel gene, KCNA1. *Nat Genet* 8, 136-140.
- Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J., and van Deurs, B. (2000). Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell* 11, 467-480.

Caldecott, K. W. (2003). DNA single-strand break repair and spinocerebellar ataxia. *Cell* 112, 7-10.

Callebaut, I., de Gunzburg, J., Goud, B., and Morion, J. P. (2001). RUN domains: a new family of domains involved in Ras-like GTPase signaling. *Trends Biochem Sci* 26, 79-83.

Campbell, C., Mitui, M., Eng, L., Coutinho, G., Thorstenson, Y., and Gatti, R. A. (2003). ATM mutations on distinct SNP and STR haplotypes in ataxia-telangiectasia patients of differing ethnicities reveal ancestral founder effects. *Hum Mutat* 21, 80-85.

Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M. D., Pianese, L., Cossee, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., *et al.* (1996). Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 271, 1423-1427.

Canman, C. E., and Lim, D. S. (1998). The role of ATM in DNA damage responses and cancer. *Oncogene* 17, 3301-3308.

Casari, G., De Fusco, M., Ciarmatori, S., Zeviani, M., Mora, M., Fernandez, P., De Michele, G., Filla, A., Coccozza, S., Marconi, R., *et al.* (1998). Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell* 93, 973-983.

Cavalier, L., Ouahchi, K., Kayden, H. J., Di Donato, S., Reutenauer, L., Mandel, J. L., and Koenig, M. (1998). Ataxia with isolated vitamin E deficiency: heterogeneity of mutations and phenotypic variability in a large number of families. *Am J Hum Genet* 62, 301-310.

Charvin, D., Cifuentes-Diaz, C., Fonknechten, N., Joshi, V., Hazan, J., Melki, J., and Betuing, S. (2003). Mutations of SPG4 are responsible for a loss of function of spastin, an abundant neuronal protein localized in the nucleus. *Hum Mol Genet* 12, 71-78.

Chavier, P., Parton, R. G., Hauri, H. P., Simons, K., and Zerial, M. (1990). Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* 62, 317-329.

Chen, G., and Lee, E. (1996). The product of the ATM gene is a 370-kDa nuclear phosphoprotein. *J Biol Chem* 271, 33693-33697.

Chen, Y. Z., Hashemi, S. H., Anderson, S. K., Huang, Y., Moreira, M. C., Lynch, D. R., Glass, I. A., Chance, P. F., and Bennett, C. L. (2006). Senataxin, the yeast Sen1p orthologue: characterization of a unique protein in which recessive mutations cause ataxia and dominant mutations cause motor neuron disease. *Neurobiol Dis* 23, 97-108.

Chun, H. H., and Gatti, R. A. (2004). Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype. *DNA Repair (Amst)* 3, 1187-1196.

Chung, K. T., Shen, Y., and Hendershot, L. M. (2002). BAP, a mammalian BiP-associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BiP. *J Biol Chem* 277, 47557-47563.

Ciccarelli, F. D., Proukakis, C., Patel, H., Cross, H., Azam, S., Patton, M. A., Bork, P., and Crosby, A. H. (2003). The identification of a conserved domain in both spartin and spastin, mutated in hereditary spastic paraplegia. *Genomics* 81, 437-441.

Clements, P. M., Breslin, C., Deeks, E. D., Byrd, P. J., Ju, L., Bieganowski, P., Brenner, C., Moreira, M. C., Taylor, A. M., and Caldecott, K. W. (2004). The ataxia-oculomotor apraxia 1 gene product has a role distinct from ATM and interacts with the DNA strand break repair proteins XRCC1 and XRCC4. *DNA Repair (Amst)* 3, 1493-1502.

Cogli, L., Piro, F., and Bucci, C. (2009). Rab7 and the CMT2B disease. *Biochem Soc Trans* 37, 1027-1031.

Cogli, L., Progida, C., Lecci, R., Bramato, R., Kruttgen, A., and Bucci, C. CMT2B-associated Rab7 mutants inhibit neurite outgrowth. *Acta Neuropathol* 120, 491-501.

Collins, F. S. (1992). Positional cloning: let's not call it reverse anymore. *Nat Genet* 1, 3-6.

Colon-Gonzalez, F., and Kazanietz, M. G. (2006). C1 domains exposed: from diacylglycerol binding to protein-protein interactions. *Biochim Biophys Acta* 1761, 827-837.

Connell, J. W., Lindon, C., Luzio, J. P., and Reid, E. (2009). Spastin couples microtubule severing to membrane traffic in completion of cytokinesis and secretion. *Traffic* 10, 42-56.

Cossee, M., Durr, A., Schmitt, M., Dahl, N., Trouillas, P., Allinson, P., Kostrzewa, M., Nivelon-Chevallier, A., Gustavson, K. H., Kohlschutter, A., *et al.* (1999). Friedreich's ataxia: point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes. *Ann Neurol* 45, 200-206.

Cossee, M., Puccio, H., Gansmuller, A., Koutnikova, H., Dierich, A., LeMeur, M., Fischbeck, K., Dolle, P., and Koenig, M. (2000). Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum Mol Genet* 9, 1219-1226.

Cossee, M., Schmitt, M., Campuzano, V., Reutenauer, L., Moutou, C., Mandel, J. L., and Koenig, M. (1997). Evolution of the Friedreich's ataxia trinucleotide repeat expansion: founder effect and premutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 7452-7457.

Cozier, G. E., Carlton, J., Bouyoucef, D., and Cullen, P. J. (2004). Membrane targeting by pleckstrin homology domains. *Curr Top Microbiol Immunol* *282*, 49-88.

Criscuolo, C., Banfi, S., Orio, M., Gasparini, P., Monticelli, A., Scarano, V., Santorelli, F. M., Perretti, A., Santoro, L., De Michele, G., and Filla, A. (2004a). A novel mutation in SACS gene in a family from southern Italy. *Neurology* *62*, 100-102.

Criscuolo, C., Mancini, P., Menchise, V., Sacca, F., De Michele, G., Banfi, S., and Filla, A. (2005a). Very late onset in ataxia oculomotor apraxia type I. *Ann Neurol* *57*, 777.

Criscuolo, C., Mancini, P., Sacca, F., De Michele, G., Monticelli, A., Santoro, L., Scarano, V., Banfi, S., and Filla, A. (2004b). Ataxia with oculomotor apraxia type 1 in Southern Italy: late onset and variable phenotype. *Neurology* *63*, 2173-2175.

Criscuolo, C., Sacca, F., De Michele, G., Mancini, P., Combarros, O., Infante, J., Garcia, A., Banfi, S., Filla, A., and Berciano, J. (2005b). Novel mutation of SACS gene in a Spanish family with autosomal recessive spastic ataxia. *Mov Disord* *20*, 1358-1361.

Date, H., Onodera, O., Tanaka, H., Iwabuchi, K., Uekawa, K., Igarashi, S., Koike, R., Hiroi, T., Yuasa, T., Awaya, Y., *et al.* (2001). Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene. *Nat Genet* *29*, 184-188.

De Luca, A., Progida, C., Spinosa, M. R., Alifano, P., and Bucci, C. (2008). Characterization of the Rab7K157N mutant protein associated with Charcot-Marie-Tooth type 2B. *Biochem Biophys Res Commun* *372*, 283-287.

Deinhardt, K., Salinas, S., Verastegui, C., Watson, R., Worth, D., Hanrahan, S., Bucci, C., and Schiavo, G. (2006). Rab5 and Rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway. *Neuron* *52*, 293-305.

Delatycki, M. B., Knight, M., Koenig, M., Cossee, M., Williamson, R., and Forrest, S. M. (1999). G130V, a common FRDA point mutation, appears to have arisen from a common founder. *Hum Genet* *105*, 343-346.

Deng, Y., Guo, X., Ferguson, D. O., and Chang, S. (2009). Multiple roles for MRE11 at uncapped telomeres. *Nature* *460*, 914-918.

Di Bella, D., Lazzaro, F., Brusco, A., Plumari, M., Battaglia, G., Pastore, A., Finardi, A., Cagnoli, C., Tempia, F., Frontali, M., *et al.* Mutations in the mitochondrial protease gene AFG3L2 cause dominant hereditary ataxia SCA28. *Nat Genet* *42*, 313-321.

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.

Duquette, A., Roddier, K., McNabb-Baltar, J., Gosselin, I., St-Denis, A., Dicaire, M. J., Loisel, L., Labuda, D., Marchand, L., Mathieu, J., *et al.* (2005). Mutations in senataxin responsible for Quebec cluster of ataxia with neuropathy. *Ann Neurol* *57*, 408-414.

Durr, A., Cossee, M., Agid, Y., Campuzano, V., Mignard, C., Penet, C., Mandel, J. L., Brice, A., and Koenig, M. (1996). Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. *N Engl J Med* *335*, 1169-1175.

Ebbing, B., Mann, K., Starosta, A., Jaud, J., Schols, L., Schule, R., and Woehlke, G. (2008). Effect of spastic paraplegia mutations in KIF5A kinesin on transport activity. *Hum Mol Genet* *17*, 1245-1252.

El-Khamisy, S. F., Saifi, G. M., Weinfeld, M., Johansson, F., Helleday, T., Lupski, J. R., and Caldecott, K. W. (2005). Defective DNA single-strand break repair in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1. *Nature* *434*, 108-113.

El Euch-Fayache, G., Lalani, I., Amouri, R., Turki, I., Ouahchi, K., Hung, W. Y., Belal, S., Siddique, T., and Hentati, F. (2003). Phenotypic features and genetic findings in sascin-related autosomal recessive ataxia in Tunisia. *Arch Neurol* *60*, 982-988.

Engert, J. C., Berube, P., Mercier, J., Dore, C., Lepage, P., Ge, B., Bouchard, J. P., Mathieu, J., Melancon, S. B., Schalling, M., *et al.* (2000). ARSACS, a spastic ataxia common in northeastern Quebec, is caused by mutations in a new gene encoding an 11.5-kb ORF. *Nat Genet* *24*, 120-125.

Errico, A., Ballabio, A., and Rugarli, E. I. (2002). Spastin, the protein mutated in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia, is involved in microtubule dynamics. *Hum Mol Genet* *11*, 153-163.

Errico, A., Claudiani, P., D'Addio, M., and Rugarli, E. I. (2004). Spastin interacts with the centrosomal protein NA14, and is enriched in the spindle pole, the midbody and the distal axon. *Hum Mol Genet* *13*, 2121-2132.

Evans, K., Keller, C., Pavur, K., Glasgow, K., Conn, B., and Luring, B. (2006). Interaction of two hereditary spastic paraplegia gene products, spastin and atlastin, suggests a common pathway for axonal maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 10666-10671.

Eymard-Pierre, E., Lesca, G., Dollet, S., Santorelli, F. M., di Capua, M., Bertini, E., and Boespflug-Tanguy, O. (2002). Infantile-onset ascending hereditary spastic paralysis is associated with mutations in the alsin gene. *Am J Hum Genet* *71*, 518-527.

Ferrari, G., Lamantea, E., Donati, A., Filosto, M., Briem, E., Carrara, F., Parini, R., Simonati, A., Santer, R., and Zeviani, M. (2005). Infantile hepatocerebral syndromes associated with mutations in the mitochondrial DNA polymerase-gammaA. *Brain* *128*, 723-731.

Filla, A., De Michele, G., Cavalcanti, F., Pianese, L., Monticelli, A., Campanella, G., and Coccozza, S. (1996). The relationship between trinucleotide (GAA) repeat length and clinical features in Friedreich ataxia. *Am J Hum Genet* *59*, 554-560.

Fink, J. K. (2002). Hereditary spastic paraplegia. *Neurol Clin* *20*, 711-726.

Fink, J. K. (2003). Advances in the hereditary spastic paraplegias. *Exp Neurol* *184 Suppl 1*, S106-110.

Fischerstrand, T., Knappskog, P., Majewski, J., Wanders, R. J., Boman, H., and Bindoff, L. A. (2009). A novel Refsum-like disorder that maps to chromosome 20. *Neurology* *72*, 20-27.

Gabsi, S., Gouider-Khouja, N., Belal, S., Fki, M., Kefi, M., Turki, I., Ben Hamida, M., Kayden, H., Mebazaa, R., and Hentati, F. (2001). Effect of vitamin E supplementation in patients with ataxia with vitamin E deficiency. *Eur J Neurol* *8*, 477-481.

Gatti, R. A. (1991). Speculations on the ataxia-telangiectasia defect. *Clin Immunol Immunopathol* *61*, S10-15.

Gething, M. J. (1999). Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol* *10*, 465-472.

Gilad, S., Chessa, L., Khosravi, R., Russell, P., Galanty, Y., Piane, M., Gatti, R. A., Jorgensen, T. J., Shiloh, Y., and Bar-Shira, A. (1998). Genotype-phenotype relationships in ataxia-telangiectasia and variants. *Am J Hum Genet* *62*, 551-561.

Gomez-Fernandez, J. C., and Corbalan-Garcia, S. (2007). Diacylglycerols, multivalent membrane modulators. *Chem Phys Lipids* *148*, 1-25.

Gotoda, T., Arita, M., Arai, H., Inoue, K., Yokota, T., Fukuo, Y., Yazaki, Y., and Yamada, N. (1995). Adult-onset spinocerebellar dysfunction caused by a mutation in the gene for the alpha-tocopherol-transfer protein. *N Engl J Med* *333*, 1313-1318.

Goytain, A., Hines, R. M., El-Husseini, A., and Quamme, G. A. (2007). NIPA1 (SPG6), the basis for autosomal dominant form of hereditary spastic paraplegia, encodes a functional Mg²⁺ transporter. *J Biol Chem* *282*, 8060-8068.

Grady, R. M., Starr, D. A., Ackerman, G. L., Sanes, J. R., and Han, M. (2005). Syne proteins anchor muscle nuclei at the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 4359-4364.

Grieco, G. S., Malandrini, A., Comanducci, G., Leuzzi, V., Valoppi, M., Tessa, A., Palmeri, S., Benedetti, L., Pierallini, A., Gambelli, S., *et al.* (2004). Novel SACS mutations in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay type. *Neurology* *62*, 103-106.

Gros-Louis, F., Dupre, N., Dion, P., Fox, M. A., Laurent, S., Verreault, S., Sanes, J. R., Bouchard, J. P., and Rouleau, G. A. (2007). Mutations in SYNE1 lead to a newly discovered form of autosomal recessive cerebellar ataxia. *Nat Genet* *39*, 80-85.

Gruenberg, J. (2001). The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* *2*, 721-730.

Gueven, N., Becherel, O. J., Kijas, A. W., Chen, P., Howe, O., Rudolph, J. H., Gatti, R., Date, H., Onodera, O., Taucher-Scholz, G., and Lavin, M. F. (2004). Aprataxin, a novel protein that protects against genotoxic stress. *Hum Mol Genet* *13*, 1081-1093.

Hadano, S., Benn, S. C., Kakuta, S., Otomo, A., Sudo, K., Kunita, R., Suzuki-Utsunomiya, K., Mizumura, H., Shefner, J. M., Cox, G. A., *et al.* (2006). Mice deficient in the Rab5 guanine nucleotide exchange factor ALS2/alsin exhibit age-dependent neurological deficits and altered endosome trafficking. *Hum Mol Genet* *15*, 233-250.

Hadano, S., Hand, C. K., Osuga, H., Yanagisawa, Y., Otomo, A., Devon, R. S., Miyamoto, N., Showguchi-Miyata, J., Okada, Y., Singaraja, R., *et al.* (2001). A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat Genet* 29, 166-173.

Hadano, S., Kunita, R., Otomo, A., Suzuki-Utsunomiya, K., and Ikeda, J. E. (2007). Molecular and cellular function of ALS2/alsin: implication of membrane dynamics in neuronal development and degeneration. *Neurochem Int* 51, 74-84.

Hagerman, R. J., Leehey, M., Heinrichs, W., Tassone, F., Wilson, R., Hills, J., Grigsby, J., Gage, B., and Hagerman, P. J. (2001). Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology* 57, 127-130.

Hakonen, A. H., Heiskanen, S., Juvonen, V., Lappalainen, I., Luoma, P. T., Rantamaki, M., Goethem, G. V., Lofgren, A., Hackman, P., Paetau, A., *et al.* (2005). Mitochondrial DNA polymerase W748S mutation: a common cause of autosomal recessive ataxia with ancient European origin. *Am J Hum Genet* 77, 430-441.

Hanein, S., Martin, E., Boukhris, A., Byrne, P., Goizet, C., Hamri, A., Benomar, A., Lossos, A., Denora, P., Fernandez, J., *et al.* (2008). Identification of the SPG15 gene, encoding spastizin, as a frequent cause of complicated autosomal-recessive spastic paraplegia, including Kjellin syndrome. *Am J Hum Genet* 82, 992-1002.

Hanna, M. C., and Blackstone, C. (2009). Interaction of the SPG21 protein ACP33/masparidin with the aldehyde dehydrogenase ALDH16A1. *Neurogenetics* 10, 217-228.

Hansen, J. J., Durr, A., Cournu-Rebeix, I., Georgopoulos, C., Ang, D., Nielsen, M. N., Davoine, C. S., Brice, A., Fontaine, B., Gregersen, N., and Bross, P. (2002). Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60. *Am J Hum Genet* 70, 1328-1332.

Hara, K., Shiga, A., Nozaki, H., Mitsui, J., Takahashi, Y., Ishiguro, H., Yomono, H., Kurisaki, H., Goto, J., Ikeuchi, T., *et al.* (2008). Total deletion and a missense mutation of ITPR1 in Japanese SCA15 families. *Neurology* 71, 547-551.

Harding, A. E. (1981). Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain* 104, 589-620.

Harding, A. E. (1983). Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet* 1, 1151-1155.

Harding, A. E. (1993a). Clinical features and classification of inherited ataxias. *Adv Neurol* 61, 1-14.

Harding, A. E. (1993b). Hereditary spastic paraplegias. *Semin Neurol* 13, 333-336.

Harding, A. E., Matthews, S., Jones, S., Ellis, C. J., Booth, I. W., and Muller, D. P. (1985). Spinocerebellar degeneration associated with a selective defect of vitamin E absorption. *N Engl J Med* 313, 32-35.

Hazan, J., Fonknechten, N., Mavel, D., Paternotte, C., Samson, D., Artiguenave, F., Davoine, C. S., Cruaud, C., Durr, A., Wincker, P., *et al.* (1999). Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia. *Nat Genet* 23, 296-303.

Hellier, K. D., Hatchwell, E., Duncombe, A. S., Kew, J., and Hammans, S. R. (2001). X-linked sideroblastic anaemia with ataxia: another mitochondrial disease? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 70, 65-69.

Hentati, A., Deng, H. X., Hung, W. Y., Nayer, M., Ahmed, M. S., He, X., Tim, R., Stumpf, D. A., Siddique, T., and Ahmed (1996). Human alpha-tocopherol transfer protein: gene structure and mutations in familial vitamin E deficiency. *Ann Neurol* 39, 295-300.

Herzog, K. H., Chong, M. J., Kapsetaki, M., Morgan, J. I., and McKinnon, P. J. (1998). Requirement for Atm in ionizing radiation-induced cell death in the developing central nervous system. *Science* 280, 1089-1091.

Holmes, S. E., O'Hearn, E. E., McInnis, M. G., Gorelick-Feldman, D. A., Kleiderlein, J. J., Callahan, C., Kwak, N. G., Ingersoll-Ashworth, R. G., Sherr, M., Sumner, A. J., *et al.* (1999). Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5' region of PPP2R2B is associated with SCA12. *Nat Genet* 23, 391-392.

Horvath, R., Hudson, G., Ferrari, G., Futterer, N., Ahola, S., Lamantea, E., Prokisch, H., Lochmuller, H., McFarland, R., Ramesh, V., *et al.* (2006). Phenotypic spectrum associated with mutations of the mitochondrial polymerase gamma gene. *Brain* 129, 1674-1684.

Houlden, H., Johnson, J., Gardner-Thorpe, C., Lashley, T., Hernandez, D., Worth, P., Singleton, A. B., Hilton, D. A., Holton, J., Revesz, T., *et al.* (2007). Mutations in TTBK2, encoding a kinase implicated in tau phosphorylation, segregate with spinocerebellar ataxia type 11. *Nat Genet* 39, 1434-1436.

Houlden, H., King, R. H., Muddle, J. R., Warner, T. T., Reilly, M. M., Orrell, R. W., and Ginsberg, L. (2004). A novel RAB7 mutation associated with ulcero-mutilating neuropathy. *Ann Neurol* 56, 586-590.

Hudson, G., and Chinnery, P. F. (2006). Mitochondrial DNA polymerase-gamma and human disease. *Hum Mol Genet* 15 *Spec No 2*, R244-252.

Hume, A. N., Collinson, L. M., Rapak, A., Gomes, A. Q., Hopkins, C. R., and Seabra, M. C. (2001). Rab27a regulates the peripheral distribution of melanosomes in melanocytes. *J Cell Biol* 152, 795-808.

Ikeda, Y., Dick, K. A., Weatherspoon, M. R., Gincel, D., Armbrust, K. R., Dalton, J. C., Stevanin, G., Durr, A., Zuhlke, C., Burk, K., *et al.* (2006). Spectrin mutations cause spinocerebellar ataxia type 5. *Nat Genet* 38, 184-190.

Iwaki, A., Kawano, Y., Miura, S., Shibata, H., Matsuse, D., Li, W., Furuya, H., Ohyagi, Y., Taniwaki, T., Kira, J., and Fukumaki, Y. (2008). Heterozygous deletion of ITPR1, but not SUMF1, in spinocerebellar ataxia type 16. *J Med Genet* 45, 32-35.

Jacquemont, S., Hagerman, R. J., Hagerman, P. J., and Leehey, M. A. (2007). Fragile-X syndrome and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: two faces of FMR1. *Lancet Neurol* 6, 45-55.

Jacquemont, S., Hagerman, R. J., Leehey, M. A., Hall, D. A., Levine, R. A., Brunberg, J. A., Zhang, L., Jardini, T., Gane, L. W., Harris, S. W., *et al.* (2004). Penetrance of the fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in a premutation carrier population. *Jama* 291, 460-469.

Jansen, G. A., Hogenhout, E. M., Ferdinandusse, S., Waterham, H. R., Ofman, R., Jakobs, C., Skjeldal, O. H., and Wanders, R. J. (2000). Human phytanoyl-CoA hydroxylase: resolution of the gene structure and the molecular basis of Refsum's disease. *Hum Mol Genet* 9, 1195-1200.

Jansen, G. A., Wanders, R. J., Watkins, P. A., and Mihalik, S. J. (1997). Phytanoyl-coenzyme A hydroxylase deficiency -- the enzyme defect in Refsum's disease. *N Engl J Med* 337, 133-134.

Jun, Y., Fratti, R. A., and Wickner, W. (2004). Diacylglycerol and its formation by phospholipase C regulate Rab- and SNARE-dependent yeast vacuole fusion. *J Biol Chem* 279, 53186-53195.

Kaukonen, J., Juselius, J. K., Tiranti, V., Kyttila, A., Zeviani, M., Comi, G. P., Keranen, S., Peltonen, L., and Suomalainen, A. (2000). Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science* 289, 782-785.

Kispal, G., Csere, P., Guiard, B., and Lill, R. (1997). The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis. *FEBS Lett* 418, 346-350.

Kispal, G., Csere, P., Prohl, C., and Lill, R. (1999). The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *Embo J* 18, 3981-3989.

Koenig, M. (2003). Rare forms of autosomal recessive neurodegenerative ataxia. *Semin Pediatr Neurol* 10, 183-192.

Koob, M. D., Moseley, M. L., Schut, L. J., Benzow, K. A., Bird, T. D., Day, J. W., and Ranum, L. P. (1999). An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8). *Nat Genet* 21, 379-384.

Korhonen, J. A., Gaspari, M., and Falkenberg, M. (2003). TWINKLE Has 5' -> 3' DNA helicase activity and is specifically stimulated by mitochondrial single-stranded DNA-binding protein. *J Biol Chem* 278, 48627-48632.

Koskinen, T., Sainio, K., Rapola, J., Pihko, H., and Paetau, A. (1994). Sensory neuropathy in infantile onset spinocerebellar ataxia (IOSCA). *Muscle Nerve* 17, 509-515.

Koutnikova, H., Campuzano, V., Foury, F., Dolle, P., Cazzalini, O., and Koenig, M. (1997). Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nat Genet* 16, 345-351.

Kremer, E. J., Pritchard, M., Lynch, M., Yu, S., Holman, K., Baker, E., Warren, S. T., Schlessinger, D., Sutherland, G. R., and Richards, R. I. (1991). Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n. *Science* 252, 1711-1714.

Kuhlbrandt, W. (2004). Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 282-295.

Kukimoto-Niino, M., Takagi, T., Akasaka, R., Murayama, K., Uchikubo-Kamo, T., Terada, T., Inoue, M., Watanabe, S., Tanaka, A., Hayashizaki, Y., *et al.* (2006). Crystal structure of the RUN domain of the RAP2-interacting protein x. *J Biol Chem* *281*, 31843-31853.

Kwasnicka-Crawford, D. A., Carson, A. R., Roberts, W., Summers, A. M., Rehnstrom, K., Jarvela, I., and Scherer, S. W. (2005). Characterization of a novel cation transporter ATPase gene (ATP13A4) interrupted by 3q25-q29 inversion in an individual with language delay. *Genomics* *86*, 182-194.

Lamarche, J. B., Cote, M., and Lemieux, B. (1980). The cardiomyopathy of Friedreich's ataxia morphological observations in 3 cases. *Can J Neurol Sci* *7*, 389-396.

Lamarche, J. B., Lemieux, B., and Lieu, H. B. (1984). The neuropathology of "typical" Friedreich's ataxia in Quebec. *Can J Neurol Sci* *11*, 592-600.

Lamperti, C., Naini, A., Hirano, M., De Vivo, D. C., Bertini, E., Servidei, S., Valeriani, M., Lynch, D., Banwell, B., Berg, M., *et al.* (2003). Cerebellar ataxia and coenzyme Q10 deficiency. *Neurology* *60*, 1206-1208.

Larnaout, A., Belal, S., Zouari, M., Fki, M., Ben Hamida, C., Goebel, H. H., Ben Hamida, M., and Hentati, F. (1997). Friedreich's ataxia with isolated vitamin E deficiency: a neuropathological study of a Tunisian patient. *Acta Neuropathol* *93*, 633-637.

Lavin, M. F., Gueven, N., Bottle, S., and Gatti, R. A. (2007). Current and potential therapeutic strategies for the treatment of ataxia-telangiectasia. *Br Med Bull* *81-82*, 129-147.

Le Ber, I., Bouslam, N., Rivaud-Pechoux, S., Guimaraes, J., Benomar, A., Chamayou, C., Goizet, C., Moreira, M. C., Klur, S., Yahyaoui, M., *et al.* (2004). Frequency and phenotypic spectrum of ataxia with oculomotor apraxia 2: a clinical and genetic study in 18 patients with Parkinsonism & related disorders. *Ataxias. Brain* *127*, 759-767.

Le Ber, I., Moreira, M. C., Rivaud-Pechoux, S., Chamayou, C., Ochsner, F., Kuntzer, T., Tardieu, M., Said, G., Habert, M. O., Demarquay, G., *et al.* (2003). Cerebellar ataxia with oculomotor apraxia type 1: clinical and genetic studies. *Brain* *126*, 2761-2772.

Leehey, M. A., Munhoz, R. P., Lang, A. E., Brunberg, J. A., Grigsby, J., Greco, C., Jacquemont, S., Tassone, F., Lozano, A. M., Hagerman, P. J., and Hagerman, R. J. (2003). The fragile X premutation presenting as essential tremor. *Arch Neurol* *60*, 117-121.

Lindsey, J. C., Lusher, M. E., McDermott, C. J., White, K. D., Reid, E., Rubinsztein, D. C., Bashir, R., Hazan, J., Shaw, P. J., and Bushby, K. M. (2000). Mutation analysis of the spastin gene (SPG4) in patients with hereditary spastic paraparesis. *J Med Genet* *37*, 759-765.

Lonnqvist, T., Paetau, A., Nikali, K., von Boguslawski, K., and Pihko, H. (1998). Infantile onset spinocerebellar ataxia with sensory neuropathy (IOSCA): neuropathological features. *J Neurol Sci* *161*, 57-65.

Lopez, L. C., Schuelke, M., Quinzii, C. M., Kanki, T., Rodenburg, R. J., Naini, A., Dimauro, S., and Hirano, M. (2006). Leigh syndrome with nephropathy and CoQ10 deficiency due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) mutations. *Am J Hum Genet* *79*, 1125-1129.

Lu, J., Rashid, F., and Byrne, P. C. (2006). The hereditary spastic paraplegia protein spartin localises to mitochondria. *J Neurochem* *98*, 1908-1919.

Luoma, P., Melberg, A., Rinne, J. O., Kaukonen, J. A., Nuppenon, N. N., Chalmers, R. M., Oldfors, A., Rautakorpi, I., Peltonen, L., Majamaa, K., *et al.* (2004). Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study. *Lancet* *364*, 875-882.

MacDonald, J. I., Kubu, C. J., and Meakin, S. O. (2004). Nesca, a novel adapter, translocates to the nuclear envelope and regulates neurotrophin-induced neurite outgrowth. *J Cell Biol* *164*, 851-862.

Maguire, A., Hellier, K., Hammans, S., and May, A. (2001). X-linked cerebellar ataxia and sideroblastic anaemia associated with a missense mutation in the ABC7 gene predicting V411L. *Br J Haematol* *115*, 910-917.

Mari, M., Macia, E., Le Marchand-Brustel, Y., and Cormont, M. (2001). Role of the FYVE finger and the RUN domain for the subcellular localization of Rabip4. *J Biol Chem* *276*, 42501-42508.

Martelli, A., Wattenhofer-Donze, M., Schmucker, S., Bouvet, S., Reutenauer, L., and Puccio, H. (2007). Frataxin is essential for extramitochondrial Fe-S cluster proteins in mammalian tissues. *Hum Mol Genet* *16*, 2651-2658.

Martinello, F., Fardin, P., Ottina, M., Ricchieri, G. L., Koenig, M., Cavalier, L., and Trevisan, C. P. (1998). Supplemental therapy in isolated vitamin E deficiency improves the peripheral neuropathy and prevents the progression of ataxia. *J Neurol Sci* 156, 177-179.

Marzouki, N., Benomar, A., Yahyaoui, M., Birouk, N., Elouazzani, M., Chkili, T., and Benlemlih, M. (2005). Vitamin E deficiency ataxia with (744 del A) mutation on alpha-TTP gene: genetic and clinical peculiarities in Moroccan patients. *Eur J Med Genet* 48, 21-28.

Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., Maejima, I., Shirahama-Noda, K., Ichimura, T., Isobe, T., *et al.* (2009). Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol* 11, 385-396.

McCray, B. A., Skordalakes, E., and Taylor, J. P. Disease mutations in Rab7 result in unregulated nucleotide exchange and inappropriate activation. *Hum Mol Genet* 19, 1033-1047.

McDermott, C. J., Grierson, A. J., Wood, J. D., Bingley, M., Wharton, S. B., Bushby, K. M., and Shaw, P. J. (2003). Hereditary spastic paraparesis: disrupted intracellular transport associated with spastin mutation. *Ann Neurol* 54, 748-759.

Meggouh, F., Bienfait, H. M., Weterman, M. A., de Visser, M., and Baas, F. (2006). Charcot-Marie-Tooth disease due to a de novo mutation of the RAB7 gene. *Neurology* 67, 1476-1478.

Menasche, G., Pastural, E., Feldmann, J., Certain, S., Ersoy, F., Dupuis, S., Wulffraat, N., Bianchi, D., Fischer, A., Le Deist, F., and de Saint Basile, G. (2000). Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat Genet* 25, 173-176.

Moller, A. B., Asp, T., Holm, P. B., and Palmgren, M. G. (2008). Phylogenetic analysis of P5 P-type ATPases, a eukaryotic lineage of secretory pathway pumps. *Mol Phylogenet Evol* 46, 619-634.

Mollet, J., Giurgea, I., Schlemmer, D., Dallner, G., Chretien, D., Delahodde, A., Bacq, D., de Lonlay, P., Munnich, A., and Rotig, A. (2007). Prenyldiphosphate synthase, subunit 1 (PDSS1) and OH-benzoate polyprenyltransferase (COQ2) mutations in ubiquinone deficiency and oxidative phosphorylation disorders. *J Clin Invest* 117, 765-772.

Montermini, L., Andermann, E., Labuda, M., Richter, A., Pandolfo, M., Cavalcanti, F., Pianese, L., Iodice, L., Farina, G., Monticelli, A., *et al.* (1997). The Friedreich ataxia GAA triplet repeat: premutation and normal alleles. *Hum Mol Genet* 6, 1261-1266.

Moreira, M. C., Barbot, C., Tachi, N., Kozuka, N., Mendonca, P., Barros, J., Coutinho, P., Sequeiros, J., and Koenig, M. (2001a). Homozygosity mapping of Portuguese and Japanese forms of ataxia-oculomotor apraxia to 9p13, and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 68, 501-508.

Moreira, M. C., Barbot, C., Tachi, N., Kozuka, N., Uchida, E., Gibson, T., Mendonca, P., Costa, M., Barros, J., Yanagisawa, T., *et al.* (2001b). The gene mutated in ataxia-ocular apraxia 1 encodes the new HIT/Zn-finger protein aprataxin. *Nat Genet* 29, 189-193.

Moreira, M. C., Klur, S., Watanabe, M., Nemeth, A. H., Le Ber, I., Moniz, J. C., Tranchant, C., Aubourg, P., Tazir, M., Schols, L., *et al.* (2004). Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2. *Nat Genet* 36, 225-227.

Muller, D. P., and Lloyd, J. K. (1982). Effect of large oral doses of vitamin E on the neurological sequelae of patients with abetalipoproteinemia. *Ann N Y Acad Sci* 393, 133-144.

Muller, D. P., Lloyd, J. K., and Bird, A. C. (1977). Long-term management of abetalipoproteinemia. Possible role for vitamin E. *Arch Dis Child* 52, 209-214.

Namekawa, M., Muriel, M. P., Janer, A., Latouche, M., Dauphin, A., Debeir, T., Martin, E., Duyckaerts, C., Prigent, A., Depienne, C., *et al.* (2007). Mutations in the SPG3A gene encoding the GTPase atlastin interfere with vesicle trafficking in the ER/Golgi interface and Golgi morphogenesis. *Mol Cell Neurosci* 35, 1-13.

Narcisi, T. M., Shoulders, C. C., Chester, S. A., Read, J., Brett, D. J., Harrison, G. B., Grantham, T. T., Fox, M. F., Povey, S., de Bruin, T. W., and *et al.* (1995). Mutations of the microsomal triglyceride-transfer-protein gene in abetalipoproteinemia. *Am J Hum Genet* 57, 1298-1310.

Naviaux, R. K., and Nguyen, K. V. (2005). POLG mutations associated with Alpers syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Ann Neurol* 58, 491.

Nemeth, A. H., Bochukova, E., Dunne, E., Huson, S. M., Elston, J., Hannan, M. A., Jackson, M., Chapman, C. J., and Taylor, A. M. (2000). Autosomal recessive cerebellar ataxia with oculomotor apraxia (ataxia-telangiectasia-like syndrome) is linked to chromosome 9q34. *Am J Hum Genet* 67, 1320-1326.

- Ng, E. L., and Tang, B. L. (2008). Rab GTPases and their roles in brain neurons and glia. *Brain Res Rev* 58, 236-246.
- Nguyen, K. V., Ostergaard, E., Ravn, S. H., Balslev, T., Danielsen, E. R., Vardag, A., McKiernan, P. J., Gray, G., and Naviaux, R. K. (2005). POLG mutations in Alpers syndrome. *Neurology* 65, 1493-1495.
- Nikali, K., Isosomppi, J., Lonnqvist, T., Mao, J. I., Suomalainen, A., and Peltonen, L. (1997). Toward cloning of a novel ataxia gene: refined assignment and physical map of the IOSCA locus (SCA8) on 10q24. *Genomics* 39, 185-191.
- Nikali, K., Koskinen, T., Suomalainen, A., Pihko, H., and Peltonen, L. (1994). Infantile onset spinocerebellar ataxia represents an allelic disease distinct from other hereditary ataxias. *Pediatr Res* 36, 607-612.
- Nikali, K., Saharinen, J., and Peltonen, L. (2002). cDNA cloning, expression profile and genomic structure of a novel human transcript on chromosome 10q24, and its analyses as a candidate gene for infantile onset spinocerebellar ataxia. *Gene* 299, 111-115.
- Nikali, K., Suomalainen, A., Saharinen, J., Kuokkanen, M., Spelbrink, J. N., Lonnqvist, T., and Peltonen, L. (2005). Infantile onset spinocerebellar ataxia is caused by recessive mutations in mitochondrial proteins Twinkle and Twinky. *Hum Mol Genet* 14, 2981-2990.
- Nikali, K., Suomalainen, A., Terwilliger, J., Koskinen, T., Weissenbach, J., and Peltonen, L. (1995). Random search for shared chromosomal regions in four affected individuals: the assignment of a new hereditary ataxia locus. *Am J Hum Genet* 56, 1088-1095.
- Oberle, I., Rousseau, F., Heitz, D., Kretz, C., Devys, D., Hanauer, A., Boue, J., Bertheas, M., and Mandel, J. (1991). Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 252, 1097-1102.
- Ogawa, T., Takiyama, Y., Sakoe, K., Mori, K., Namekawa, M., Shimazaki, H., Nakano, I., and Nishizawa, M. (2004). Identification of a SACS gene missense mutation in ARSACS. *Neurology* 62, 107-109.
- Ophoff, R. A., Terwindt, G. M., Vergouwe, M. N., van Eijk, R., Oefner, P. J., Hoffman, S. M., Lamerdin, J. E., Mohrenweiser, H. W., Bulman, D. E., Ferrari, M., *et al.* (1996). Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNL1A4. *Cell* 87, 543-552.
- Orlacchio, A., Babalini, C., Borreca, A., Patrono, C., Massa, R., Basaran, S., Munhoz, R. P., Rogaeva, E. A., St George-Hyslop, P. H., Bernardi, G., and Kawarai, T. SPATACSIN mutations cause autosomal recessive juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 133, 591-598.
- Ouahchi, K., Arita, M., Kayden, H., Hentati, F., Ben Hamida, M., Sokol, R., Arai, H., Inoue, K., Mandel, J. L., and Koenig, M. (1995). Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the alpha-tocopherol transfer protein. *Nat Genet* 9, 141-145.
- Ouyang, Y., Takiyama, Y., Sakoe, K., Shimazaki, H., Ogawa, T., Nagano, S., Yamamoto, Y., and Nakano, I. (2006). Sacsin-related ataxia (ARSACS): expanding the genotype upstream from the gigantic exon. *Neurology* 66, 1103-1104.
- Pagon, R. A., Bird, T. D., Detter, J. C., and Pierce, I. (1985). Hereditary sideroblastic anaemia and ataxia: an X linked recessive disorder. *J Med Genet* 22, 267-273.
- Pandita, T. K., Pathak, S., and Geard, C. R. (1995). Chromosome end associations, telomeres and telomerase activity in ataxia telangiectasia cells. *Cytogenet Cell Genet* 71, 86-93.
- Pandolfo, M. (2009). Friedreich ataxia: the clinical picture. *J Neurol* 256 *Suppl 1*, 3-8.
- Patel, H., Cross, H., Proukakis, C., Hershberger, R., Bork, P., Ciccarelli, F. D., Patton, M. A., McKusick, V. A., and Crosby, A. H. (2002). SPG20 is mutated in Troyer syndrome, an hereditary spastic paraplegia. *Nat Genet* 31, 347-348.
- Paull, T. T., and Gellert, M. (1998). The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell* 1, 969-979.
- Puccio, H., Simon, D., Cossee, M., Criqui-Filipe, P., Tiziano, F., Melki, J., Hindelang, C., Matyas, R., Rustin, P., and Koenig, M. (2001). Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat Genet* 27, 181-186.

Quinzii, C., Naini, A., Salviati, L., Trevisson, E., Navas, P., Dimauro, S., and Hirano, M. (2006). A mutation in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2) causes primary coenzyme Q10 deficiency. *Am J Hum Genet* 78, 345-349.

Quinzii, C. M., DiMauro, S., and Hirano, M. (2007). Human coenzyme Q10 deficiency. *Neurochem Res* 32, 723-727.

Rainier, S., Chai, J. H., Tokarz, D., Nicholls, R. D., and Fink, J. K. (2003). NIPA1 gene mutations cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia (SPG6). *Am J Hum Genet* 73, 967-971.

Ranum, L. P., and Cooper, T. A. (2006). RNA-Mediated Neuromuscular Disorders. *Annu Rev Neurosci*.

Rapley, J., Tybulewicz, V. L., and Rittinger, K. (2008). Crucial structural role for the PH and C1 domains of the Vav1 exchange factor. *EMBO Rep* 9, 655-661.

Rasmussen, T. P., and Culbertson, M. R. (1998). The putative nucleic acid helicase Sen1p is required for formation and stability of termini and for maximal rates of synthesis and levels of accumulation of small nucleolar RNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 18, 6885-6896.

Refsum, S., Salomonsen, L., and Skatvedt, M. (1949). Heredopathia atactica polyneuritiformis in children. *J Pediatr* 35, 335-343.

Reid, E., Connell, J., Edwards, T. L., Duley, S., Brown, S. E., and Sanderson, C. M. (2005). The hereditary spastic paraplegia protein spastin interacts with the ESCRT-III complex-associated endosomal protein CHMP1B. *Hum Mol Genet* 14, 19-38.

Reid, E., Kloos, M., Ashley-Koch, A., Hughes, L., Bevan, S., Svenson, I. K., Graham, F. L., Gaskell, P. C., Dearlove, A., Pericak-Vance, M. A., *et al.* (2002). A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10). *Am J Hum Genet* 71, 1189-1194.

Richter, A. M., Ozgul, R. K., Poisson, V. C., and Topaloglu, H. (2004). Private SACS mutations in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS) families from Turkey. *Neurogenetics* 5, 165-170.

Riederer, M. A., Soldati, T., Shapiro, A. D., Lin, J., and Pfeffer, S. R. (1994). Lysosome biogenesis requires Rab9 function and receptor recycling from endosomes to the trans-Golgi network. *J Cell Biol* 125, 573-582.

Ristow, M., Pfister, M. F., Yee, A. J., Schubert, M., Michael, L., Zhang, C. Y., Ueki, K., Michael, M. D., 2nd, Lowell, B. B., and Kahn, C. R. (2000). Frataxin activates mitochondrial energy conversion and oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12239-12243.

Robay, D., Patel, H., Simpson, M. A., Brown, N. A., and Crosby, A. H. (2006). Endogenous spartin, mutated in hereditary spastic paraplegia, has a complex subcellular localization suggesting diverse roles in neurons. *Exp Cell Res* 312, 2764-2777.

Rotig, A., Appelkvist, E. L., Geromel, V., Chretien, D., Kadhon, N., Edery, P., Lebeideau, M., Dallner, G., Munnich, A., Ernster, L., and Rustin, P. (2000). Quinone-responsive multiple respiratory-chain dysfunction due to widespread coenzyme Q10 deficiency. *Lancet* 356, 391-395.

Rotig, A., de Lonlay, P., Chretien, D., Foury, F., Koenig, M., Sidi, D., Munnich, A., and Rustin, P. (1997). Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat Genet* 17, 215-217.

Rustin, P., Rotig, A., Munnich, A., and Sidi, D. (2002). Heart hypertrophy and function are improved by idebenone in Friedreich's ataxia. *Free Radic Res* 36, 467-469.

Salinas, S., Proukakis, C., Crosby, A., and Warner, T. T. (2008). Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms. *Lancet Neurol* 7, 1127-1138.

Sanderson, C. M., Connell, J. W., Edwards, T. L., Bright, N. A., Duley, S., Thompson, A., Luzio, J. P., and Reid, E. (2006). Spastin and atlastin, two proteins mutated in autosomal-dominant hereditary spastic paraplegia, are binding partners. *Hum Mol Genet* 15, 307-318.

Sano, Y., Date, H., Igarashi, S., Onodera, O., Oyake, M., Takahashi, T., Hayashi, S., Morimatsu, M., Takahashi, H., Makifuchi, T., *et al.* (2004). Aprataxin, the causative protein for EAOH is a nuclear protein with a potential role as a DNA repair protein. *Ann Neurol* 55, 241-249.

Sato, N., Amino, T., Kobayashi, K., Asakawa, S., Ishiguro, T., Tsunemi, T., Takahashi, M., Matsuura, T., Flanigan, K. M., Iwasaki, S., *et al.* (2009). Spinocerebellar ataxia type 31 is associated with "inserted" penta-nucleotide repeats containing (TGGAA)*n*. *Am J Hum Genet* 85, 544-557.

Savitsky, K., Sfez, S., Tagle, D. A., Ziv, Y., Sarti, A., Collins, F. S., Shiloh, Y., and Rotman, G. (1995). The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum Mol Genet* 4, 2025-2032.

Saxena, S., Bucci, C., Weis, J., and Kruttgen, A. (2005). The small GTPase Rab7 controls the endosomal trafficking and neuritogenic signaling of the nerve growth factor receptor TrkA. *J Neurosci* 25, 10930-10940.

Schmucker, S., and Puccio, H. Understanding the molecular mechanisms of Friedreich's ataxia to develop therapeutic approaches. *Hum Mol Genet* 19, R103-110.

Schols, L., Bauer, P., Schmidt, T., Schulte, T., and Riess, O. (2004). Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol* 3, 291-304.

Schultheis, P. J., Hagen, T. T., O'Toole, K. K., Tachibana, A., Burke, C. R., McGill, D. L., Okunade, G. W., and Shull, G. E. (2004). Characterization of the P5 subfamily of P-type transport ATPases in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 323, 731-738.

Seabra, M. C., Mules, E. H., and Hume, A. N. (2002). Rab GTPases, intracellular traffic and disease. *Trends Mol Med* 8, 23-30.

Senderek, J., Krieger, M., Stendel, C., Bergmann, C., Moser, M., Breitbach-Faller, N., Rudnik-Schoneborn, S., Blaschek, A., Wolf, N. I., Harting, I., *et al.* (2005). Mutations in *SIL1* cause Marinesco-Sjogren syndrome, a cerebellar ataxia with cataract and myopathy. *Nat Genet* 37, 1312-1314.

Seznec, H., Simon, D., Monassier, L., Criqui-Filipe, P., Gansmuller, A., Rustin, P., Koenig, M., and Puccio, H. (2004). Idebenone delays the onset of cardiac functional alteration without correction of Fe-S enzymes deficit in a mouse model for Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet* 13, 1017-1024.

Sharp, D., Blinderman, L., Combs, K. A., Kienzle, B., Ricci, B., Wager-Smith, K., Gil, C. M., Turck, C. W., Bouma, M. E., Rader, D. J., and *et al.* (1993). Cloning and gene defects in microsomal triglyceride transfer protein associated with abetalipoproteinaemia. *Nature* 365, 65-69.

Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 3, 155-168.

Shimada, Y., Okuno, S., Kawai, A., Shinomiya, H., Saito, A., Suzuki, M., Omori, Y., Nishino, N., Kanemoto, N., Fujiwara, T., *et al.* (1998). Cloning and chromosomal mapping of a novel ABC transporter gene (*hABC7*), a candidate for X-linked sideroblastic anemia with spinocerebellar ataxia. *J Hum Genet* 43, 115-122.

Shimazaki, H., Takiyama, Y., Sakoe, K., Ikeguchi, K., Nijima, K., Kaneko, J., Namekawa, M., Ogawa, T., Date, H., Tsuji, S., *et al.* (2002). Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia: the aprataxin gene mutations. *Neurology* 59, 590-595.

Simon, D., Seznec, H., Gansmuller, A., Carelle, N., Weber, P., Metzger, D., Rustin, P., Koenig, M., and Puccio, H. (2004). Friedreich ataxia mouse models with progressive cerebellar and sensory ataxia reveal autophagic neurodegeneration in dorsal root ganglia. *J Neurosci* 24, 1987-1995.

Simpson, M. A., Cross, H., Proukakis, C., Pryde, A., Hershberger, R., Chatonnet, A., Patton, M. A., and Crosby, A. H. (2003). Maspardin is mutated in mast syndrome, a complicated form of hereditary spastic paraplegia associated with dementia. *Am J Hum Genet* 73, 1147-1156.

Skibinski, G., Parkinson, N. J., Brown, J. M., Chakrabarti, L., Lloyd, S. L., Hummerich, H., Nielsen, J. E., Hodges, J. R., Spillantini, M. G., Thusgaard, T., *et al.* (2005). Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit *CHMP2B* in frontotemporal dementia. *Nat Genet* 37, 806-808.

Spelbrink, J. N., Li, F. Y., Tiranti, V., Nikali, K., Yuan, Q. P., Tariq, M., Wanrooij, S., Garrido, N., Comi, G., Morandi, L., *et al.* (2001). Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat Genet* 28, 223-231.

Spinosa, M. R., Progida, C., De Luca, A., Colucci, A. M., Alifano, P., and Bucci, C. (2008). Functional characterization of Rab7 mutant proteins associated with Charcot-Marie-Tooth type 2B disease. *J Neurosci* 28, 1640-1648.

Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 513-525.

Stenmark, H., and Olkkonen, V. M. (2001). The Rab GTPase family. *Genome Biol* 2, REVIEWS3007.

Stevanin, G., Azzedine, H., Denora, P., Boukhris, A., Tazir, M., Lossos, A., Rosa, A. L., Lerer, I., Hamri, A., Alegria, P., *et al.* (2008). Mutations in *SPG11* are frequent in autosomal recessive spastic

paraplegia with thin corpus callosum, cognitive decline and lower motor neuron degeneration. *Brain* 131, 772-784.

Stevanin, G., Santorelli, F. M., Azzedine, H., Coutinho, P., Chomilier, J., Denora, P. S., Martin, E., Ouvrard-Hernandez, A. M., Tessa, A., Bouslam, N., *et al.* (2007). Mutations in SPG11, encoding spatacsin, are a major cause of spastic paraplegia with thin corpus callosum. *Nat Genet* 39, 366-372.

Stewart, G. S., Maser, R. S., Stankovic, T., Bressan, D. A., Kaplan, M. I., Jaspers, N. G., Raams, A., Byrd, P. J., Petrini, J. H., and Taylor, A. M. (1999). The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* 99, 577-587.

Sun, Q., Westphal, W., Wong, K. N., Tan, I., and Zhong, Q. Rubicon controls endosome maturation as a Rab7 effector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 19338-19343.

Sun, Q., Zhang, J., Fan, W., Wong, K. N., Ding, X., Chen, S., and Zhong, Q. The run domain of rubicon is important for HVPS34 binding, lipid kinase inhibition and autophagy suppression. *J Biol Chem*.

Suraweera, A., Becherel, O. J., Chen, P., Rundle, N., Woods, R., Nakamura, J., Gatei, M., Criscuolo, C., Filla, A., Chessa, L., *et al.* (2007). Senataxin, defective in ataxia oculomotor apraxia type 2, is involved in the defense against oxidative DNA damage. *J Cell Biol* 177, 969-979.

Suraweera, A., Lim, Y., Woods, R., Birrell, G. W., Nasim, T., Becherel, O. J., and Lavin, M. F. (2009). Functional role for senataxin, defective in ataxia oculomotor apraxia type 2, in transcriptional regulation. *Hum Mol Genet* 18, 3384-3396.

Suzuki, Y., Murakami, N., Goto, Y., Orimo, S., Komiyama, A., Kuroiwa, Y., and Nonaka, I. (1997). Apoptotic nuclear degeneration in Marinesco-Sjogren syndrome. *Acta Neuropathol* 94, 410-415.

Svenson, I. K., Kloos, M. T., Jacon, A., Gallione, C., Horton, A. C., Pericak-Vance, M. A., Ehlers, M. D., and Marchuk, D. A. (2005). Subcellular localization of spastin: implications for the pathogenesis of hereditary spastic paraplegia. *Neurogenetics* 6, 135-141.

Tabata, K., Matsunaga, K., Sakane, A., Sasaki, T., Noda, T., and Yoshimori, T. Rubicon and PLEKHM1 Negatively Regulate the Endocytic/Autophagic Pathway via a Novel Rab7-binding Domain. *Mol Biol Cell* 21, 4162-4172.

Takashima, H., Boerkoel, C. F., John, J., Saifi, G. M., Salih, M. A., Armstrong, D., Mao, Y., Quiocho, F. A., Roa, B. B., Nakagawa, M., *et al.* (2002). Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. *Nat Genet* 32, 267-272.

Taroni, F., and DiDonato, S. (2004). Pathways to motor incoordination: the inherited ataxias. *Nat Rev Neurosci* 5, 641-655.

Tavani, F., Zimmerman, R. A., Berry, G. T., Sullivan, K., Gatti, R., and Bingham, P. (2003). Ataxia-telangiectasia: the pattern of cerebellar atrophy on MRI. *Neuroradiology* 45, 315-319.

Taylor, A. M., Groom, A., and Byrd, P. J. (2004). Ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD)-its clinical presentation and molecular basis. *DNA Repair (Amst)* 3, 1219-1225.

Tazir, M., Ali-Pacha, L., M'Zahem, A., Delaunoy, J. P., Fritsch, M., Nouioua, S., Benhassine, T., Assami, S., Grid, D., Vallat, J. M., *et al.* (2009). Ataxia with oculomotor apraxia type 2: A clinical and genetic study of 19 patients. *J Neurol Sci* 278, 77-81.

Topp, J. D., Gray, N. W., Gerard, R. D., and Horazdovsky, B. F. (2004). Alsln is a Rab5 and Rac1 guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem* 279, 24612-24623.

Traber, M. G., Sokol, R. J., Burton, G. W., Ingold, K. U., Papas, A. M., Huffaker, J. E., and Kayden, H. J. (1990). Impaired ability of patients with familial isolated vitamin E deficiency to incorporate alpha-tocopherol into lipoproteins secreted by the liver. *J Clin Invest* 85, 397-407.

Tranchant, C., Fleury, M., Moreira, M. C., Koenig, M., and Warter, J. M. (2003). Phenotypic variability of aprataxin gene mutations. *Neurology* 60, 868-870.

Tranebjaerg, L., Teslovich, T. M., Jones, M., Barmada, M. M., Fagerheim, T., Dahl, A., Escolar, D. M., Trent, J. M., Gillanders, E. M., and Stephan, D. A. (2003). Genome-wide homozygosity mapping localizes a gene for autosomal recessive non-progressive infantile ataxia to 20q11-q13. *Hum Genet* 113, 293-295.

Tybulewicz, V. L. (2005). Vav-family proteins in T-cell signalling. *Curr Opin Immunol* 17, 267-274.

Tyynismaa, H., Sembongi, H., Bokori-Brown, M., Granycome, C., Ashley, N., Poulton, J., Jalanko, A., Spelbrink, J. N., Holt, I. J., and Suomalainen, A. (2004). Twinkle helicase is essential for mtDNA maintenance and regulates mtDNA copy number. *Hum Mol Genet* 13, 3219-3227.

Ursic, D., Chinchilla, K., Finkel, J. S., and Culbertson, M. R. (2004). Multiple protein/protein and protein/RNA interactions suggest roles for yeast DNA/RNA helicase Sen1p in transcription, transcription-coupled DNA repair and RNA processing. *Nucleic Acids Res* 32, 2441-2452.

Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L., and Shiloh, Y. (2003). Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *Embo J* 22, 5612-5621.

van den Brink, D. M., Brites, P., Haasjes, J., Wierzbicki, A. S., Mitchell, J., Lambert-Hamill, M., de Belleruche, J., Jansen, G. A., Waterham, H. R., and Wanders, R. J. (2003). Identification of PEX7 as the second gene involved in Refsum disease. *Am J Hum Genet* 72, 471-477.

Van Goethem, G., Dermaut, B., Lofgren, A., Martin, J. J., and Van Broeckhoven, C. (2001). Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat Genet* 28, 211-212.

Van Goethem, G., Martin, J. J., Dermaut, B., Lofgren, A., Wibail, A., Ververken, D., Tack, P., Dehaene, I., Van Zandijcke, M., Moonen, M., *et al.* (2003). Recessive POLG mutations presenting with sensory and ataxic neuropathy in compound heterozygote patients with progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscul Disord* 13, 133-142.

van Swieten, J. C., Brusse, E., de Graaf, B. M., Krieger, E., van de Graaf, R., de Koning, I., Maat-Kievit, A., Leegwater, P., Dooijes, D., Oostra, B. A., and Heutink, P. (2003). A mutation in the fibroblast growth factor 14 gene is associated with autosomal dominant cerebellar ataxia [corrected]. *Am J Hum Genet* 72, 191-199.

Van Wesenbeeck, L., Odgren, P. R., Coxon, F. P., Frattini, A., Moens, P., Perdu, B., MacKay, C. A., Van Hul, E., Timmermans, J. P., Vanhoenacker, F., *et al.* (2007). Involvement of PLEKHM1 in osteoclastic vesicular transport and osteopetrosis in incisors absent rats and humans. *J Clin Invest* 117, 919-930.

Varon, R., Vissinga, C., Platzer, M., Cerosaletti, K. M., Chrzanowska, K. H., Saar, K., Beckmann, G., Seemanova, E., Cooper, P. R., Nowak, N. J., *et al.* (1998). Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* 93, 467-476.

Verhoeven, K., De Jonghe, P., Coen, K., Verpoorten, N., Auer-Grumbach, M., Kwon, J. M., FitzPatrick, D., Schmedding, E., De Vriendt, E., Jacobs, A., *et al.* (2003). Mutations in the small GTPase late endosomal protein RAB7 cause Charcot-Marie-Tooth type 2B neuropathy. *Am J Hum Genet* 72, 722-727.

Vitelli, R., Santillo, M., Lattero, D., Chiariello, M., Bifulco, M., Bruni, C. B., and Bucci, C. (1997). Role of the small GTPase Rab7 in the late endocytic pathway. *J Biol Chem* 272, 4391-4397.

Wakamiya, M., Matsuura, T., Liu, Y., Schuster, G. C., Gao, R., Xu, W., Sarkar, P. S., Lin, X., and Ashizawa, T. (2006). The role of ataxin 10 in the pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 10. *Neurology* 67, 607-613.

Wang, X., Shaw, W. R., Tsang, H. T., Reid, E., and O'Kane, C. J. (2007). Drosophila spichthyn inhibits BMP signaling and regulates synaptic growth and axonal microtubules. *Nat Neurosci* 10, 177-185.

Watanabe, M., Sugai, Y., Concannon, P., Koenig, M., Schmitt, M., Sato, M., Shizuka, M., Mizushima, K., Ikeda, Y., Tomidokoro, Y., *et al.* (1998). Familial spinocerebellar ataxia with cerebellar atrophy, peripheral neuropathy, and elevated level of serum creatine kinase, gamma-globulin, and alpha-fetoprotein. *Ann Neurol* 44, 265-269.

Waters, M. F., Minassian, N. A., Stevanin, G., Figueroa, K. P., Bannister, J. P., Nolte, D., Mock, A. F., Evidente, V. G., Fee, D. B., Muller, U., *et al.* (2006). Mutations in voltage-gated potassium channel KCNC3 cause degenerative and developmental central nervous system phenotypes. *Nat Genet* 38, 447-451.

Weinstein, R. (1999). Phytanic acid storage disease (Refsum's disease): clinical characteristics, pathophysiology and the role of therapeutic apheresis in its management. *J Clin Apher* 14, 181-184.

Wharton, S. B., McDermott, C. J., Grierson, A. J., Wood, J. D., Gelsthorpe, C., Ince, P. G., and Shaw, P. J. (2003). The cellular and molecular pathology of the motor system in hereditary spastic paraparesis due to mutation of the spastin gene. *J Neuropathol Exp Neurol* 62, 1166-1177.

Whitehouse, C. J., Taylor, R. M., Thistlethwaite, A., Zhang, H., Karimi-Busheri, F., Lasko, D. D., Weinfeld, M., and Caldecott, K. W. (2001). XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair. *Cell* 104, 107-117.

Wills, A. J., Manning, N. J., and Reilly, M. M. (2001). Refsum's disease. *Qjm* 94, 403-406.

Winterthun, S., Ferrari, G., He, L., Taylor, R. W., Zeviani, M., Turnbull, D. M., Engelsens, B. A., Moen, G., and Bindoff, L. A. (2005). Autosomal recessive mitochondrial ataxic syndrome due to mitochondrial polymerase gamma mutations. *Neurology* 64, 1204-1208.

Wong, L. J., Naviaux, R. K., Brunetti-Pierri, N., Zhang, Q., Schmitt, E. S., Truong, C., Milone, M., Cohen, B. H., Wical, B., Ganesh, J., *et al.* (2008). Molecular and clinical genetics of mitochondrial diseases due to POLG mutations. *Hum Mutat* 29, E150-172.

Woods, C. G., and Taylor, A. M. (1992). Ataxia telangiectasia in the British Isles: the clinical and laboratory features of 70 affected individuals. *Q J Med* 82, 169-179.

Xiao, Y., and Weaver, D. T. (1997). Conditional gene targeted deletion by Cre recombinase demonstrates the requirement for the double-strand break repair Mre11 protein in murine embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 25, 2985-2991.

Yamamoto, Y., Hiraoka, K., Araki, M., Nagano, S., Shimazaki, H., Takiyama, Y., and Sakoda, S. (2005). Novel compound heterozygous mutations in sarsin-related ataxia. *J Neurol Sci* 239, 101-104.

Yang, Y., Hentati, A., Deng, H. X., Dabbagh, O., Sasaki, T., Hirano, M., Hung, W. Y., Ouahchi, K., Yan, J., Azim, A. C., *et al.* (2001). The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 29, 160-165.

Yokota, T., Igarashi, K., Uchihara, T., Jishage, K., Tomita, H., Inaba, A., Li, Y., Arita, M., Suzuki, H., Mizusawa, H., and Arai, H. (2001). Delayed-onset ataxia in mice lacking alpha-tocopherol transfer protein: model for neuronal degeneration caused by chronic oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 15185-15190.

Yokota, T., Shiojiri, T., Gotoda, T., and Arai, H. (1996). Retinitis pigmentosa and ataxia caused by a mutation in the gene for the alpha-tocopherol-transfer protein. *N Engl J Med* 335, 1770-1771.

Yokota, T., Shiojiri, T., Gotoda, T., Arita, M., Arai, H., Ohga, T., Kanda, T., Suzuki, J., Imai, T., Matsumoto, H., *et al.* (1997). Friedreich-like ataxia with retinitis pigmentosa caused by the His101Gln mutation of the alpha-tocopherol transfer protein gene. *Ann Neurol* 41, 826-832.

Zerial, M., and McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 107-117.

Zhang, Q., Skepper, J. N., Yang, F., Davies, J. D., Hegyi, L., Roberts, R. G., Weissberg, P. L., Ellis, J. A., and Shanahan, C. M. (2001). Nesprins: a novel family of spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues. *J Cell Sci* 114, 4485-4498.

Zhao, H., Laitala-Leinonen, T., Parikka, V., and Vaananen, H. K. (2001a). Downregulation of small GTPase Rab7 impairs osteoclast polarization and bone resorption. *J Biol Chem* 276, 39295-39302.

Zhao, X., Alvarado, D., Rainier, S., Lemons, R., Hedera, P., Weber, C. H., Tukel, T., Apak, M., Heiman-Patterson, T., Ming, L., *et al.* (2001b). Mutations in a newly identified GTPase gene cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Nat Genet* 29, 326-331.

Zhong, Y., Wang, Q. J., Li, X., Yan, Y., Backer, J. M., Chait, B. T., Heintz, N., and Yue, Z. (2009). Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat Cell Biol* 11, 468-476.

Zhu, J., Petersen, S., Tessarollo, L., and Nussenzweig, A. (2001). Targeted disruption of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to early embryonic lethality in mice. *Curr Biol* 11, 105-109.

Zhu, P. P., Patterson, A., Lavoie, B., Stadler, J., Shoeb, M., Patel, R., and Blackstone, C. (2003). Cellular localization, oligomerization, and membrane association of the hereditary spastic paraplegia 3A (SPG3A) protein atlastin. *J Biol Chem* 278, 49063-49071.

Zhu, P. P., Soderblom, C., Tao-Cheng, J. H., Stadler, J., and Blackstone, C. (2006). SPG3A protein atlastin-1 is enriched in growth cones and promotes axon elongation during neuronal development. *Hum Mol Genet* 15, 1343-1353.

Zuchner, S., Wang, G., Tran-Viet, K. N., Nance, M. A., Gaskell, P. C., Vance, J. M., Ashley-Koch, A. E., and Pericak-Vance, M. A. (2006). Mutations in the novel mitochondrial protein REEP1 cause hereditary spastic paraplegia type 31. *Am J Hum Genet* 79, 365-369.

Zuhlke, C., Laccone, F., Cossee, M., Kohlschutter, A., Koenig, M., and Schwinger, E. (1998). Mutation of the start codon in the FRDA1 gene: linkage analysis of three pedigrees with the ATG to ATT transversion points to a unique common ancestor. *Hum Genet* 103, 102-105.

Résumé

Les ataxies héréditaires représentent un groupe hétérogène de pathologies caractérisées par des anomalies de coordination des mouvements associées à des troubles de l'équilibre et de la marche et sont principalement dues à la dégénérescence du cervelet et de ses connections afférentes et efférentes. Notre travail se concentre sur les ataxies progressives récessives non métaboliques, indépendamment du site de la pathologie. A ce jour, 14 gènes responsables d'ataxies récessives progressives non métaboliques ainsi que plusieurs loci ont été identifiés, mais un grand nombre de patients reste sans diagnostic, indiquant que d'autres gènes responsables d'ataxie restent à identifier.

Nous avons analysé un ensemble de 97 familles consanguines par puces de génotypage 10K ou 50K afin d'identifier les gènes responsables. Dans un premier temps, nous avons étudié l'utilité et les limites des puces pour le diagnostic de l'ataxie du Charlevoix-Saguenay (ARSACS), de l'ataxie avec apraxie oculomotrice de types 1 et 2 (AOA1 et AOA2) et de l'ataxie téléangectasie (AT). Nous avons ainsi pu identifier 10 mutations responsables d'ataxie: 6 familles possédaient une mutation dans le gène de la *sacsacine*, 2 familles avaient une mutation dans le gène de l'*aprataxine*, une famille pour le gène de la *senataxine* et une famille pour le gène *ATM*. Grâce à notre stratégie de cartographie par homozygotie, nous avons pu identifier dans le reste des familles quatre gènes responsables de nouvelles formes d'ataxies autosomiques récessives. Nous avons localisé un nouveau gène en 1q41-q42 et nous avons identifié les mutations causales dans le gène *ADCK3* codant pour une kinase atypique mitochondriale impliquée dans la synthèse du coenzyme Q₁₀. Les patients mutés présentaient une ataxie cérébelleuse débutant dans l'enfance, parfois associée à une intolérance à l'exercice et une élévation modérée des lactates sériques. L'identification de mutations *ADCK3* dans une nouvelle forme d'ataxie autosomique récessive démontre le rôle primaire du déficit en coenzyme Q₁₀ dans la physiopathologie de cette ataxie. Par la suite, nous avons pu identifier un locus d'ataxie autosomique récessive lentement progressive dans 4 familles Algériennes consanguines et une grande famille des Emirats Arabes Unis. Ce locus est situé dans la région péricentromérique du chromosome 20 qui correspond au locus PHARC (pour Polyneuropathy, Hearing loss, Ataxia, Retinitis pigmentosa and Cataract). Nous avons pu identifier deux mutations tronquantes dans le gène *ABHD12* chez les atteints des 5 familles. Le gène *ABHD12* code pour une α/β hydrolase impliquée dans l'hydrolyse de l'acide 2-arachidonique-glycérol, un endocannabinoïde majeur du SNC. L'identification de mutations dans *ABHD12* ouvre la voie vers la compréhension du mécanisme physiopathologique dans le PHARC. L'analyse des puces Affymetrix m'a permis d'identifier une famille homozygote et liée au niveau du chromosome 3p22.3-21.32. Une collaboration avec S. Vermeer et collègues (Nimègue) a permis d'identifier des mutations dans le gène *ANO10* dans une nouvelle forme d'ataxie avec atrophie cérébelleuse sévère. *ANO10* ou *TMEM16K* est un membre de la famille des anoctamines qui comprend au moins 9 protéines possédant 8 domaines transmembranaires et un domaine DUF590 de fonction inconnue. Ce gène code pour un canal chlore calcium-dépendant hautement exprimé dans le cerveau adulte, en particulier au niveau des lobes frontaux et occipitaux et du cervelet. Finalement, j'ai identifié par la même approche la mutation causale chez les 3 patientes d'une grande famille originaire d'Arabie Saoudite consanguine. La mutation, une délétion homozygote (2927delC) au niveau de l'exon 19 du gène *KIAA0226*, entraîne un décalage du cadre de lecture. *KIAA0226* code pour une nouvelle protéine, que j'ai nommée rundataxine et qui possède un domaine RUN, un domaine coiled-coil et un domaine similaire aux domaines de liaison au DiAcylGlycérol des protéines kinases C (domaine «DAG binding-like»). Au niveau protéique, la mutation (p.Ala875ValfsX146) entraîne l'apparition d'une nouvelle phase de lecture de 146 acides aminés en remplacement du domaine «DAG binding-like», très conservé au cours de l'évolution. L'homologue le plus proche à la rundataxine, la *PLEKHM1* colocalise avec Rab7, un marqueur des endosomes tardifs de la famille Rab GTPase. Pour caractériser la rundataxine, j'ai produit des anticorps contre les extrémités N et C terminales de cette protéine pour étudier sa localisation subcellulaire. J'ai observé une association de la rundataxine avec les vésicules et la colocalisation de la rundataxine avec Rab7. La rundataxine mutante exprimée dans les cellules Hela présente une localisation cytosolique diffuse, ce qui montre que le motif DAG-binding like est responsable de la localisation de la rundataxine au niveau des endosomes. Ces résultats d'immunomarquage sont en accord avec les résultats publiés récemment par 2 équipes qui ont caractérisé sur le plan fonctionnel cette protéine qu'ils ont nommée Rubicon (Zhong, et al et Matsunaga et al). Ils ont montré que Rubicon interagit avec le complexe Beclin1, phosphatidylinositol-3 kinase (PI(3)K)/Vps34, Vps15 et UVRAG impliqué dans la régulation de l'autophagie. Rubicon régule négativement l'autophagie, la maturation de l'autophagosome et des endosomes, et la voie de l'endocytose. Très récemment, Tabata et al. ont montré que Rubicon et son homologue *PLEKHM1* interagissent directement avec Rab7 par leur domaine C-terminal DAG binding-like.

En conclusion, l'identification de 4 gènes d'ataxie récessive impliqués dans des mécanismes différents a permis de montrer la grande hétérogénéité physiopathologique des ataxies. La caractérisation fonctionnelle de ces gènes permettra d'élucider les mécanismes impliqués dans les ataxies récessives.