

**Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
CNRS - INSERM - Université Louis Pasteur de Strasbourg (Strasbourg I)
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé**

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Louis Pasteur

Discipline : Sciences du vivant

Par

Dr. Moez GRIBAA

**GENETIQUE MOLECULAIRE DE NOUVELLES
FORMES D'ATAXIES PROGRESSIVES RECESSIVES**

**Date de Soutenance publique, le 17 Novembre 2006 devant la commission
d'examen :**

Mr. le Professeur Michel KOENIG

Directeur de thèse

Mr. le Professeur Patrick AUBOURG

Rapporteur externe

Mme le Professeur Christine TRANCHANT

Rapporteur interne

Mr. le Docteur Giovanni STEVANIN

Rapporteur externe

Dédicaces

Je remercie le Professeur Jean-Louis MANDEL de m'avoir accepté dans son équipe, ce qui m'a permis de m'investir dans ce beau domaine de la génétique moléculaire humaine.

Je remercie Mon directeur de thèse, Mr. le Pr. Michel KOENIG, qui m'a chaleureusement accueilli dans son groupe et qui m'a guidé tout au long de la réalisation de cette thèse avec ses conseils et ses directives qui m'ont énormément aidés dans l'orientation de mes objectifs et l'accomplissement de mes travaux. Je le remercie également pour sa grande patience pour mes grandes coupures et mes déplacements prolongés en Tunisie.

Je souhaite remercier chaleureusement les professeurs Christine TRANCHANT et Patrick AUBOURG, ainsi que le docteur Giovanni STEVANO, qui me font l'honneur d'être les membres de mon jury.

Je remercie l'Association Française contre l'Ataxie de Friedreich (AFAF) qui a financé une partie de mon travail durant la thèse.

Je remercie les cliniciens qui nous envoient les ADN des familles atteintes d'ataxie sans lesquelles ce travail ne pouvait avoir lieu. Il s'agit essentiellement de Mr. le Pr. Mustafa SALIH et Mme le Pr. Meriam TAGIR dont la collaboration ne cesse d'évoluer.

J'adresse mes remerciements aux membres de l'équipe JLM qui ont été toujours présents quand j'en avais besoin que ce soit pour des conseils scientifiques ou pour organiser des sorties. Je pense particulièrement à Yvan, Aline, Solange, Anne Sophie, Nadège, Delphine, Marie, Marie, Nathalie, Christine, Lama, Aurora... ainsi qu'à Jérôme et Alain qui m'ont largement soutenus.

Je remercie spécialement Laurence, ma voisine de paillasse, qui m'a tout le temps aidé par ses conseils et ses coups de mains.

Je remercie chaleureusement Clotilde et Mathieu pour leur aide précieuse dans mes travaux permettant leur avancement plus rapide, ainsi que Dorra ma collègue de toujours qui a repris une partie de ces travaux et je lui souhaite bon courage pour la suite.

J'aimerais bien remercier Mme le Dr. Maria-Céu Moreira pour tous ses conseils et sa disponibilité durant mes premiers mois de thèse.

Je souhaite remercier les membres des équipes de « séquençage » et des « oligos » essentiellement Serge pour leur disponibilité et leur sens pratique.

Je remercie tous les membres de l'équipe du Diag qui, avec leur bonne humeur et leur joie de vivre, ont réussi assez souvent à me faire rappeler combien c'est important de rigoler.

Je remercie Mr. le Pr. Ali SAAD, mon chef de service de cytogénétique et de biologie de la reproduction de l'hôpital Farhat Hached de Sousse pour son soutien total.

Je remercie tous les membres du service de cytogénétique et de biologie de la reproduction de l'hôpital Farhat Hached de Sousse pour tous leurs encouragements incessants.

*A ma femme Ikram,
que j'aime le plus au monde,
que dieu la garde à mes côtés,*

*A ma
Mère Cherifa
et mon
Père Laroussi,*

*A mes frères et sœurs ;
Sabour, Hamdi,
Imen, Houda,
Afeef, Sihem
et Sondess,
à mes beaux frères et mes belles sœurs
ainsi qu'à leurs enfants,*

TABLE DES MATIERES

	Pages
Liste des figures	08
Liste des tableaux:	08
Liste des abréviations	09
Introduction	10
I- Classification des ataxies	11
II- Le syndrome cérébelleux	16
III- Projets abordés pendant mon travail de thèse	17
IV- Le syndrome de Martin et Van Boegert	18
V- Le syndrome ATLD (ataxia-telangiectasia like disease)	20
A- MRE11	20
B- Rad50	21
C- Nbs1	21
D- Rôle du complexe MRN	23
1- Rôle du complexe MRN dans la réparation de l'ADN	24
a. La recombinaison homologue (HR)	24
b. La réparation par jonction des extrémités non-homologues (NHEJ)	24
c- Implication du complexe MRN dans la réparation de l'ADN par recombinaison homologue	25
d- Implication du complexe MRN dans le processus de NHEJ	26
2- MRN et le contrôle du cycle cellulaire	26
E- Les mutations des gènes du complexe MRN	27
1- La mutation du gène <i>NBS1</i>	27
2- Les mutations du gène <i>MRE11</i>	28
3- Les mutations du gène <i>RAD50</i>	29

VI- Les ataxies autosomiques récessives associées à une épilepsie	29
A- Les épilepsies	29
* Les crises généralisées	30
* Les crises partielles	30
* Les crises unilatérales	30
B- La maladie d'Unverricht-Lundborg	31
C- La maladie de Lafora	32
D- Les lipofuscinoses ceroides neuronales (CLNs)	33
E- L'épilepsie myoclonique avec des fibres rouges en loques (MERRF)	34
F- Les sialidoses	34
G- La polymérase gamma (POLG)	35
Résultats	36
A. Liaison génétique	37
1. La cartographie génétique par homozygotie	37
2. Les marqueurs polymorphiques du génome	38
3. Mesure statistique de la liaison : le LOD score	39
B. Ataxie spinocérébelleuse avec cécité et surdité (SCABD)	39
C. Première famille étudiée après un tour complet du génome humain	44
D. Ataxia Telangiectasia-like disease (ATLD)	45
E. Ataxie récessive associée à une épilepsie	48
Discussion	56
I- Réduction de la taille du locus 6p21-23	55
II- Identification de 3 nouvelles familles atteintes d'ATLD et présentant la même nouvelle mutation au niveau du gène <i>MRE11</i>	60
III- Identification d'une nouvelle forme clinico-biologique d'ataxie associée à une épilepsie et étude de sa liaison génétique	63
IV- Importance des données cliniques dans les études de liaison Génétique	67
Matériel et méthodes	69
A- Génotypage	70
1- Tour du génome entier au Centre National de Génotypage (CNG)	70
2- Tour du génome entier dans notre laboratoire	70
3- Confirmation par l'étude d'autres marqueurs	71
a. <i>Méthode radioactive</i>	71

<i>b. TP-PCR (Triple Primers PCR) fluorescente</i>	71
4. Génotypage par des SNP utilisant des puces à oligonucléotides	72
B- Séquençage	73
C- Calcul du Lod Score	73
D- DHPLC	74
Conclusion	75
Publications	76
Publication 1	77
Publication 2 (Manuscrit en préparation)	90
Communication liée au travail de thèse	111
Références	116
Publications résultant du travail de thèse mais non décrits dans ce rapport	125

Liste des figures

Pages

- Figure 1 : Haplotype des différents membres de la famille arabo-israélienne montrant sa liaison au locus 6p21-23.	19
- Figure 2 : la protéine Mre11	20
- Figure 3 : Structures des protéines Mre11, Rad50 et Nbs1 et leur mode d'interaction lors de la réparation de l'ADN	22
- Figure 4 : Interaction de la protéine ATM avec les autres protéines de la réparation de l'ADN et du contrôle du cycle cellulaire	23
- Figure 5 : Réparation des cassures double brin par HR et NHEJ	25
- Figure 6 : Principe de la cartographie génétique par homozygotie	38
- Figure 7 : Haplotype des 3 familles liées au locus 6p22	40
- Figure 8 : Confirmation de la liaison de la famille C au locus du 6p21-22	43
- Figure 9 : Génotype des individus de la famille F	45
- Figure 10 : Profil DHPLC	48
- Figure 11 : Analyse de la liaison de la famille H. au chromosome 3	51
- Figure 12 : Etude de liaison de la famille A. au chromosome 16	53
- Figure 13 : Amplification d'un microsatellite à l'aide de trois amorces (TP-PCR)	72

Liste des tableaux

- Tableau I : liste des maladies héréditaires associés à une ataxie cérébelleuse	12
- Tableau II : liste des gènes séquencés au niveau de la région 6p22.1-22.2	41
- Tableau III : Comparaison des signes cliniques entre l'ataxie télangiectasie (AT), l'ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD) et le syndrome Nijmegen breakage (NBS)	62
- Tableau IV : Comparaison entre traits cliniques des syndromes d'épilepsie myoclonique progressive de l'enfant, de l'adolescent et de l'adulte avec ceux de nos patients	65

LISTE DE ABREVIATIONS

- **ABL** : Abetalipoproteinemia
- **ADN** : Acide DésoxyriboNucléique
- **AOA** : Ataxia with Oculomotrice Apraxia
- **AT** : Ataxia-Telangiectasia
- **ATLD** : Ataxia-Telangiectasia Like Disease
- **AVED** : Ataxia with isolated Vitamin E Deficiency
- **CDB** : Coupures Double Brin de l'ADN
- **CLN** : Ceroid Lipofuscinoses Neuronal
- **cM** : Centimorgan
- **CNG** : Centre National de Génotypage
- **CPK** : Créatinine PhosphoKinase
- **ddNTP** : didésoxyriboNucléoside Tri-Phosphate
- **DHPLC** : Denaturing High Performance Liquid Chromatography
- **DRPLA** : DentatoRubral Pallidoluisian Atrophy
- **EEG** : ElectroEncéphaloGraphie
- **HR** : Homologous Recombinaison
- **IOSCA** : Infantile Onset Spinocerebellar Ataxia
- **IRM** : Imagerie par Résonance Magnétique
- **Kb** : Kilobases
- **kDa** : KiloDalton
- **LDH** : Lactico-DésHydrogénase
- **Mb** : Mégabase
- **MERRF** : Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers
- **MRN** : complexe *Mre11-Rad50-Nbs1*
- **NBS** : Nijmegen Breakage Syndrome
- **NHEJ** : Non Homologous End Joining
- **PCR** : Polymerase Chain Reaction
- **PEO** : progressive External Ophthalmoplegia
- **PMA** : Progressive Myoclonic Ataxia
- **PME** : Progressive Myoclonus Epilepsie
- **POLG** : Polymérase Gamma
- **RD** : Refsum Disease
- **RFLP** : Restriction Fragment Length Polymorphsim
- **SANDO** : Sensory Ataxic Neuropathy with Dysarthria and Ophthalmoparesis
- **SCA** : Spinocerebellar Ataxia
- **SCABD** : Spinocerebellar Ataxia with Blindness and Deafness
- **SCAN** : Spinocerebellar Ataxia with Neuropathy
- **SNP** : Single Nucleotide Polymorphism
- **STR** : Short Tandem Repeats
- **TEAA** : Triéthylammonium Acétate
- **Tm** : melting Temperature
- **UL** : Unverricht-Lundborg

INTRODUCTION

L'ataxie est un symptôme qui peut être isolé ou faire partie d'un syndrome particulier. Elle signifie la maladresse, ou la perte de coordination. Elle peut affecter les doigts et les mains, les bras et les jambes, la parole ou les mouvements de l'œil.

I- Classification des ataxies

L'ataxie peut résulter d'une lésion du cervelet, des voies spino-cérébelleuses et/ou de la sensibilité profonde proprioceptive [1].

Cette perte de coordination peut être provoquée par:

- Une cause traumatique :
 - accidents de la circulation
 - accidents à la naissance
- Une affection cérébrale qui peut toucher le cervelet :
 - sclérose en plaque
 - tumeurs du cervelet
 - accidents vasculaires
- Une maladie neurodégénérative héréditaire (Tableau I) qui peut être :
 - de transmission autosomique récessive
 - de transmission autosomique dominante
 - de transmission liée à l'X
 - d'origine mitochondriale

Ce dernier groupe représente la cause la plus fréquente des ataxies.

Ainsi, les formes génétiques d'ataxie doivent être distinguées des autres causes acquises. Cette distinction est basée surtout sur les antécédents familiaux, l'examen physique et la neuro-imagerie. Le diagnostic génétique n'est disponible que pour certaines pathologies.

La prévalence des différents types d'ataxies peut changer d'une région à une autre en raison d'un certain effet fondateur ; par exemple : la DRPLA et SCA3 sont plus communs au Japon et au Portugal respectivement [2, 3].

Tableau I : liste des maladies héréditaires associées à une ataxie cérébelleuse.

Classification des ataxies cérébelleuses récessives et liées à X :

Nom	Locus	Localisation chromosomique	Produit du gène	Transmission	Age d'apparition (en années)
Ataxie- Apraxie oculomotrice1	AOA1	9p13	Aprataxine	Autosomique récessive	1-16
Ataxie- Apraxie oculomotrice2	AOA2	9q34	Senataxine	Autosomique récessive	2-22
Ataxie- télangiectasies	ATM	11q22	ATM	Autosomique récessive	1-2
Ataxie télangiectasies like	MRE11	11q21	MRE11	Autosomique récessive	1-2
SCA avec neuropathie axonale	SCAN1	14q31	TDP1	Autosomique récessive	13-15
Maladie d'Unverricht Lundborg (Myoclonie baltique)		21q22.3	Cystatine B	Autosomique récessive	10-20
Ataxie de Cayman	ATCAY	19p13.3	Caytaxine	Autosomique récessive	Petite enfance
Ataxie spastique du Charlevoix- Saguenay	ARSACS	13q12	Sacsine	Autosomique récessive	1-20
Ataxie de Friedreich	FRDA	9q13	Fratixine	Autosomique récessive Autosomique récessive	2 à > 25
SCA d'apparition infantile	IOSCA	10q24	Twinkle	Autosomique récessive	1-2

Syndrome de Marinesco-Sjögren	SIL1	5q31	SIL1	Autosomique récessive	Enfance
Syndrome d'ataxie mitochondriale récessive	MIRAS	15q25	POLG1	Autosomique récessive	16-39
Ataxie spastique de Portneuf avec leucoencéphalopathie	ARSAL	2q33-34		Autosomique récessive	0-59
Ataxie avec déficit en vitamine E		8q13.1-q13.3	ATTP	Autosomique récessive	Enfance
Maladie de Salla (Surcharge en acide sialique)	SLC17A5	6q14-q15	Sialine	Autosomique récessive	1-1,5
Anémie sidéroblastique et SCA	ASAT	Xq13	ABC7	Liée à X	1
Ataxie avec tremblement et déclin cognitif	FXTAS	Xq27.3	FMR1 (X fragile)	Liée à X	Mâles > 50
Syndrome de Rett	MECP2	Xq28	MECP2	Liée à X	

Classification des ataxies cérébelleuses autosomiques dominantes :

Locus	Localisation chromosomique	Produit du gène (mutation)	Age d'installation (moyenne)	Forme clinique et signes associés
SCA1	6p23	Ataxine1 (CAG)*	4-74 (4 ^{ème} décennie)	Forme complexe (type I) : variable : Ophtalmoplégie, atrophie optique, démence, signes extrapyramidaux, amyotrophie.
SCA2	12q24	Ataxine2 (CAG)*	6-67 (40% >25)	
SCA3 : Maladie de Machado- Joseph	14q32	Ataxine3 (CAG)*		
SCA4	16q22		19-59 (39) 45-72 (56)	
SCA14	19q13.4-qter	PKC &	10-59 (31-40)	

SCA16	8q23		20-66 (40)	
SCA17	6q27	TBP (CAG)*	10-70 (3 ^{ème} décennie)	
SCA19	1p21-q21		20-45	
SCA21	7p21		6-30 (17)	
SCA28	18p11		12-36 (19)	
SCA7	3p14	Ataxine7 (CAG)*	1 ^{er} mois-76 ^{ème} année	Forme complexe (type II) : Rétinopathie pigmentaire
SCA5	11q13	B-III Spectrine ^{&}	15-50 (33)	Forme simple (type III)
SCA6	19p13	CACNA1A	19 à >55 (60% >60)	
SCA8	13q21	(CTG)*	40-50	
SCA11	15q14		17-33 (25)	
SCA12	5q31	PPP2R2B (CTG)*	8-55 (4 ^{ème} décennie)	
SCA15	3p24		10-50 (26)	
SCA22	1p21-q23		10-46	
SCA23	20p13-p12.2		43-56 (50)	
SCA26	19p13		26-60	
SCA27	13q34	FGF14 ^{&}	Enfance	
SCA10	22q13	Ataxine10 (ATTCT)*	10-40	Forme complexe (type IV) : Ataxie et épilepsie
SCA13	19q13	KCNC3 ^{&}	Petite enfance	Ataxie et retard mental

SCA18	7q31		1-27	Ataxie et neuropathie sensitivo-motrice
SCA20	11	Allelique à SCA5	19-64 (46)	
SCA25	2p15-p21		1.5-39	Ataxie et neuropathie sensitive
DRPLA	12p	TBP (CAG)*	10-70	Atrophie dentato-rubro-pallido-luysienne.
Locus lié au 16q	16q22	Puratrophine		

Mutations : (CAG)* : Expansion CAG traduite, (ATTCT) * : Expansion ATTCT,
 (CTG)* : Expansion CTG non codante, & : Mutation faux- sens

Les ataxies progressives autosomiques récessives représentent un groupe hétérogène de désordres neurologiques impliquant le système nerveux central et périphérique, et dans un certain nombre de cas d'autres systèmes et organes. Ces ataxies sont classées en 3 groupes selon l'emplacement principal de la dégénérescence [1] :

- Premier groupe : atteinte du cervelet comme l'ataxie télangiectasie, l'ataxie spastique de Charlevoix-Saguenay et l'ataxie cérébelleuse avec hypogonadisme hypogonadotrophe.
- Deuxième groupe : atteinte du cordon médullaire avec principalement l'ataxie de Friedreich, l'ataxie avec déficit en vitamine E (AVED), l'abêtalipoprotéïnémie (ABL), la maladie de Refsum (RD), l'ataxie spino-cérébelleuse infantile (IOSCA) et l'ataxie avec cécité et surdité (SCABD).
- Un troisième groupe de désordres implique une dégénérescence cérébelleuse associée à une neuropathie périphérique sensitivomotrice. Ce groupe comprend des entités très récemment identifiées, comme l'ataxie avec apraxie oculomotrice de type 1 et 2 (AOA1 et AOA2) et l'ataxie spinocérébelleuse avec neuropathie (SCAN1).

Certaines formes d'ataxies autosomiques récessives sont génétiquement et moléculairement bien caractérisées. Elles résultent pour la plupart de la perte de fonction de protéines cellulaires impliquées dans l'homéostasie métabolique, la réparation de l'ADN ou des fonctions de chaperon. Pour les autres formes, soit le gène en cause n'est pas encore connu soit la protéine pour laquelle il code a une fonction qui n'est pas encore connue [4].

II- Le syndrome cérébelleux

Le syndrome cérébelleux comporte une composante statique associée à l'atteinte du vermis cérébelleux et une composante cinétique associée aux hémisphères cérébelleux [5].

- Le syndrome vermien (ou statique) se manifeste essentiellement par des troubles de l'équilibre et de la marche avec une démarche ébrieuse et un élargissement du polygone de sustentation, tandis qu'en position debout, au garde à vous, apparaissent des oscillations non aggravées par la fermeture des yeux avec danse des jambiers (contractions irrégulières des tendons des jambiers antérieurs).
- Le syndrome cérébelleux cinétique ne comporte que peu de troubles de l'équilibre (sauf quand il est bilatéral) et se manifeste par :
 - . une asynergie,
 - . une dysmétrie de type hypermétrie aux épreuves doigt-nez et talon-genou,

- . une adiadococinésie : une asynergie qui désigne des perturbations de l'association des mouvements élémentaires, nécessaires au déroulement harmonieux de l'activité cinétique. Ainsi le patient cérébelleux, couché, ne peut s'asseoir sans un soulèvement exagéré des membres inférieurs au-dessus du plan du lit, il ne peut se pencher en arrière ou perd l'équilibre par suite du manque de flexion compensatrice des genoux. Il présente également une lenteur d'exécution des mouvements alternatifs successifs comme les « marionnettes »,
- . une dysarthrie avec parole mal articulée et scandée,
- . des troubles de l'écriture qui est irrégulière, faite de lettres de taille anarchique
- . une hypotonie qui résulte d'une exagération de la passivité sans hyperextensibilité.

III- Projets abordés pendant mon travail de thèse

Mon projet de thèse était centré principalement sur l'étude de trois nouvelles formes d'ataxies récessives progressives. La première forme que j'ai étudiée est l'ataxie spinocérébelleuse avec cécité et surdité, que l'on peut aussi appeler syndrome de Martin et Van Boegert du nom des auteurs ayant publié, avec précision, la première famille multiplex correspondant à ce syndrome. Ce travail faisait suite au travail dans notre laboratoire de Pascale Bomont qui avait publié la localisation génétique d'une maladie correspondant à ce syndrome et ségrégeant dans une famille multiplex consanguine. J'ai ensuite étudié plusieurs familles consanguines originaires d'Arabie Saoudite pour lesquelles une analyse de liaison génome entier avait été réalisée au Centre National de Génotypage (CNG, Evry). L'une de ces familles avait une ataxie cérébelleuse associée à une apraxie oculomotrice. L'analyse basée sur les données du CNG m'a permis de suspecter l'implication du gène MRE11, dont les mutations de seulement deux familles de deux patients chacune avaient été décrites précédemment. Deux autres familles avaient une présentation atypique de la maladie d'Unverricht-Lundborg avec prédominance du syndrome ataxique. Une quatrième famille qui, comme les deux précédentes, avait un syndrome épileptique associé correspondait à un nouveau syndrome dont nous avons pu préciser les caractéristiques cliniques et pathologiques et dont j'ai pu déterminer la localisation génétique. Les données de la littérature liées à ces trois formes d'ataxie sont présentées tour à tour dans cette introduction.

IV- Le syndrome de Martin et Van Boegert

(SPINOCEREBELLAR ATAXIA WITH BLINDNESS AND DEAFNESS; SCABD)

(MIM [%271250](#))

Il s'agit d'une ataxie associée à une atrophie optique et une surdité de perception d'évolution progressive (syndrome de Van Bogaert et Martin [6]). Ce syndrome débute vers l'âge de 9 - 12 ans par des troubles de la marche de type ataxique et se complique ultérieurement par des troubles de la vision secondaires à une atrophie optique. Une surdité par dégénérescence cochléaire ne tarde pas à s'installer dans les années qui suivent.

Une étude génétique faite en 2000 par Pascale BOMONT, sur une grande famille arabe israélienne a permis de lier ce syndrome au chromosome 6 [7].

Il s'agit d'une famille consanguine dont les deux patients, un oncle et une nièce, sont atteints d'une ataxie qui a débuté à un âge assez tôt.

Pour l'oncle, tout a commencé à l'âge de 3 ans par une démarche ataxique qui s'est aggravée progressivement l'obligeant à utiliser un fauteuil roulant. Cette ataxie était associée à des contractures épisodiques de ses mains. Entre temps il a développé un nystagmus associé à une baisse de l'acuité visuelle. L'examen du fond d'œil a montré une atrophie optique bilatérale. Son acuité auditive a également diminué, entraînant une surdité presque totale à l'âge de 27 ans.

La nièce a présenté une symptomatologie qui a débuté à l'âge de 3 ans par une démarche ataxique. Son examen à l'âge de 6 ans n'a montré aucune atteinte des nerfs crâniens et les analyses biochimiques sanguines suivantes se sont révélées toutes normales : Aldolase, CPK, LDH, vitamines E et B12, acide folique, créatinine, glucose, acides gras libres, cétones, lactate et pyruvate. La biopsie musculaire a montré une légère désorganisation des fibres sans aucune atteinte mitochondriale. À l'âge de 14 ans, un électrorétinogramme a été pratiqué et a montré des réponses lentes. L'évolution de la maladie a été marquée par une altération de l'audition et de la vision à partir de l'âge de 17 ans mais sans nystagmus.

L'étude génétique a été réalisée par cartographie par homozygotie utilisant 400 marqueurs microsatellites (STR) couvrant l'ensemble du génome humain et a permis de montrer une

V- Le syndrome ATLD (ataxia-telangiectasia like disease)

Le syndrome ATLD est défini par une ataxie due aux mutations du gène *MRE11*. Le produit de ce gène est intimement lié à la protéine ATM, mutée dans l'ataxie-télangectasie. La protéine Mre11 fait partie du complexe ternaire MRN (Mre11-Rad50-Nbs1), dont l'activité est directement régulée par la protéine ATM. Les deux autres partenaires du complexe MRN sont Rad50 et Nbs1. Suite à l'identification de l'interaction d'ATM avec le complexe MRN, les gènes de ces trois protéines ont été rapidement analysés comme candidats de maladies apparentées à l'ataxie-télangectasie.

A- MRE11

Le gène *MRE11* fait 75 Kb et présente 19 exons [8]. Il code pour une protéine de 708 acides aminés (figure 2) qui fait partie du complexe MRN. Ce complexe joue un rôle important dans la réparation double brin de l'ADN (DSBs) essentiellement après exposition aux radiations ionisantes.

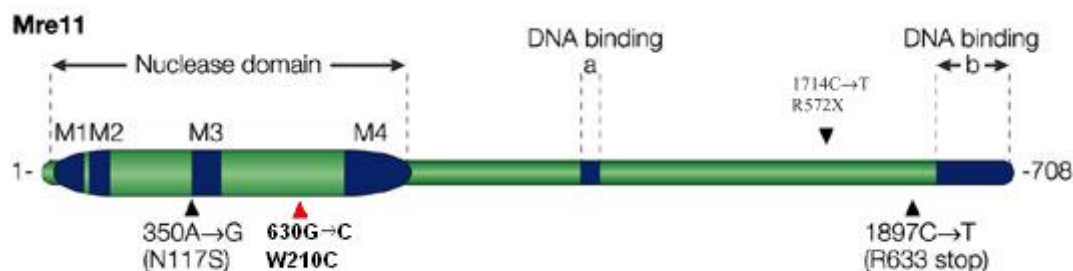


Figure 2 : la protéine Mre11

La protéine Mre11 interagit indépendamment avec NBS1 et RAD50 et peut interagir avec elle-même pour former des dimères ou de larges multimères [9]. Mre11 est douée de diverses activités enzymatiques. Tout d'abord cette protéine possède une activité exonucléase et coupe les nucléotides dans le sens 3'-5', avec une plus grande efficacité sur les duplex protubérants en 5' ou droits, que sur les protubérants en 3' [10]. Mre11 est également douée d'une activité endonucléase dépendante de l'ATP, qui permet d'ouvrir les structures en épingle à cheveux [11]. L'activité nucléase de Mre11 est dépendante de la présence d'ATP et elle est à la fois endo et exonucléasique au niveau d'ADN simple-brin, ou bien uniquement exonucléasique au niveau de substrats double-brin [12]. Cette protéine n'agit pas seule ; son activité est stimulée par les autres membres du complexe MRN, les protéines Rad50 et NBS1 [13]. Mre11 peut se

relocaliser au niveau des foyers de réparation indépendamment des ATM, ce qui laisse penser que Mre11 détecte les dommages d'ADN avant l'activation par les ATM [14]. Mre11 aurait également une activité hélicase qui permet l'ouverture des extrémités en épingle à cheveux.

B- Rad50

Cette protéine de 150 kDa est une hélicase capable de dérouler l'ADN double brin. Elle possède un domaine de liaison à l'ADN très important pour son activité [15]. Les résultats d'études structurales suggèrent que cette protéine lie les extrémités d'ADN de manière à les rapprocher, ce qui faciliterait l'étape ultime de leur ligation (figure 3) [16]. En outre, Rad50 est pourvue d'un domaine ATPase qui contrôle la liaison du complexe MRN à l'ADN [17].

C- Nbs1

Le gène *NBS1* est localisé sur le bras long du chromosome 8 en 8q21.3. Il code pour une protéine de 85 kDa appelée nibrine composée de trois régions fonctionnelles :

- à son extrémité N-terminale, des domaines FHA (*Forkhead-associated domain*) et BRCT (reconnaissance du domaine C-terminal de BRCA1),
- au niveau de sa région centrale, des motifs SQ, sites consensus de phosphorylation par les kinases ATM et ATR,
- en C-terminal, un domaine de liaison à Mre11 [18].

Nbs1 peut reconnaître H2AX phosphorylée, s'y fixer grâce à son domaine FHA/BRCT, et c'est sans doute ainsi qu'elle permet le recrutement du complexe MRN au niveau des sites de cassure.

Nbs1 détecte les sites endommagés indépendamment des ATM, grâce à sa liaison avec Mre11. Par la suite, les complexes MRN sont maintenus au niveau des sites de cassures en se fixant sur H2AX phosphorylé, ce processus étant, lui, dépendant des ATMs [19].

D'un autre côté, la protéine NBS1, quand elle est phosphorylée par ATM, stimule l'activité nucléasique de Mre11/Rad50 [19].

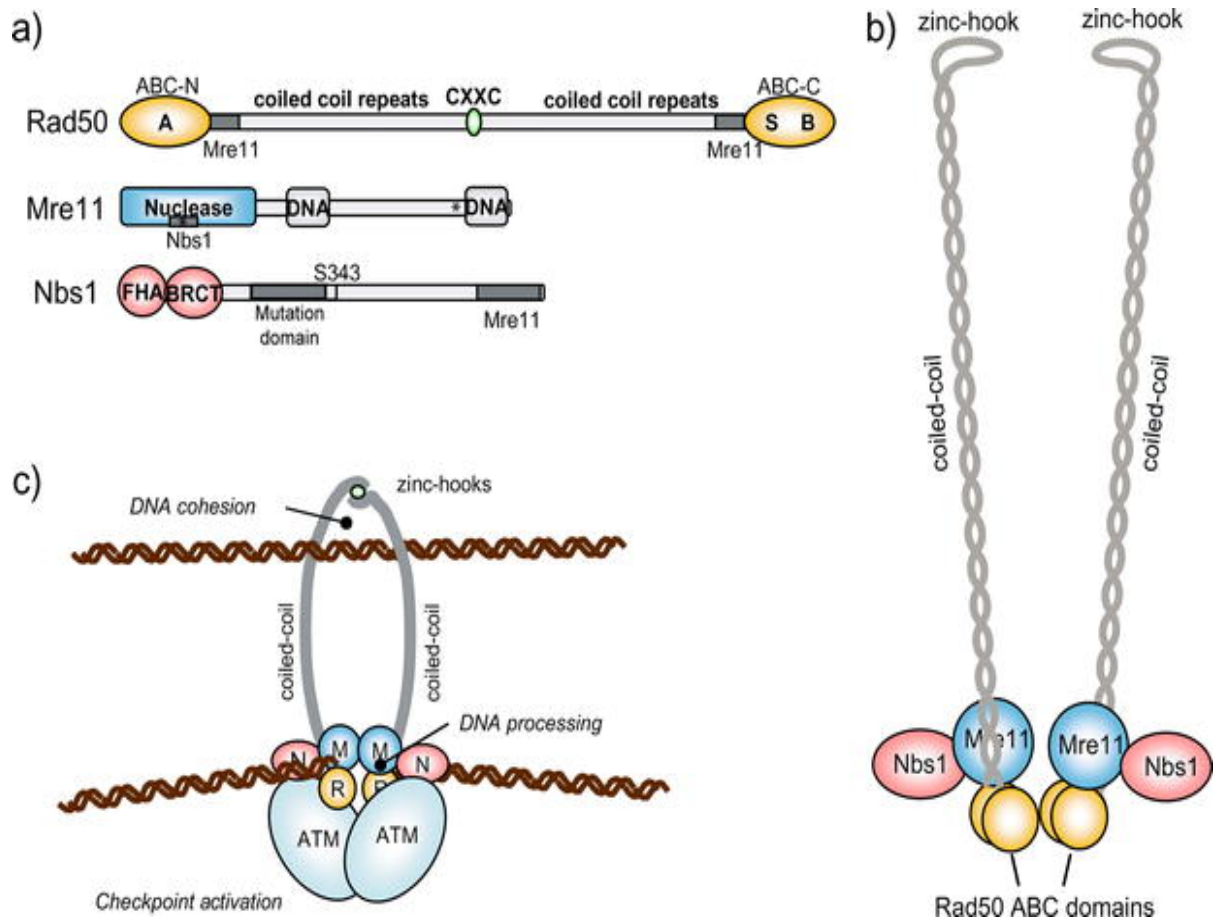


Figure 3 : Structures des protéines Mre11, Rad50 et Nbs1 et leur mode d'interaction lors de la réparation de l'ADN [20].

Lors de la réparation de l'ADN, le complexe MRN prend une forme bipolaire avec une tête et 2 longues queues :

- tête : + 2 domaines ABC de Rad50
 - + 2 Mre11 (contenant une activité nucléase)
 - + 2 Nbs1
- queue : disposition super-enroulé (Coiled-coil) de Rad50 qui se termine par un pont en crochet de zinc (hook/zinc/hook).

D- Rôle du complexe MRN

Que ce soit pour la réparation de l'ADN ou pour le contrôle du cycle cellulaire, le complexe MRN a besoin de la protéine ATM pour assurer ces 2 rôles. Cette interaction entre MRN et ATM est double puisque le complexe MRN en se fixant sur l'ADN lésé, recrute ATM qui lui-même va phosphoryler MRN pour lui permettre d'achever ses fonctions (figure 4) [14].

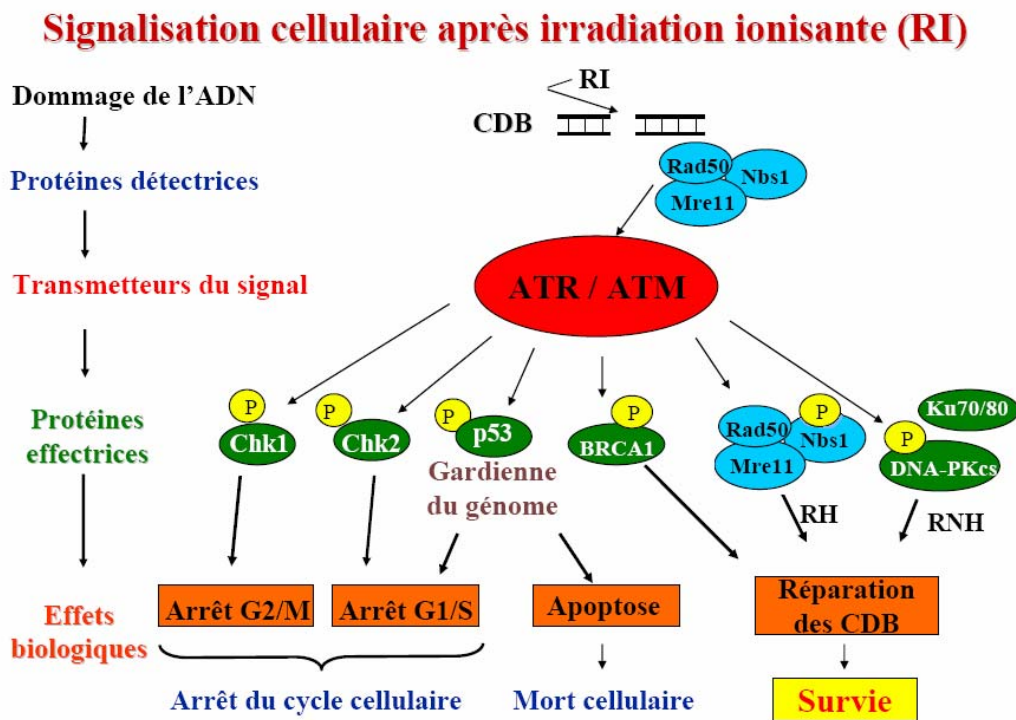


Figure 4 : Interaction de la protéine ATM avec les autres protéines de la réparation de l'ADN et du contrôle du cycle cellulaire.

Le complexe Mre11/Rad50/Nbs1 joue un rôle majeur dans différents processus cellulaires essentiellement dans la réparation des coupures double brin de l'ADN (CDB ou DSB) que ce soit par NHEJ ou par recombinaison homologue, mais aussi dans l'entretien des télomères ou encore dans l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire. Ce large éventail de fonctions peut s'expliquer par la présence de diverses activités, enzymatiques ou non, au sein du complexe MRN.

1- Rôle du complexe MRN dans la réparation de l'ADN

Le complexe MRN intervient dans la réparation double brin de l'ADN que ce soit par recombinaison homologue ou par jonction des extrémités non-homologues (NHEJ).

a. La recombinaison homologue (HR)

La recombinaison homologue est sans doute le moyen le plus sécuritaire de réparer une cassure double brin. C'est le principal mécanisme utilisé chez la levure et les bactéries. Il assure la conservation intégrale de l'information génétique. Il est basé sur l'échange et l'incursion de brins provenant du chromosome endommagé dans ceux d'un chromosome homologue intact. Il s'agit d'un processus complexe nécessitant l'action de plus d'une dizaine de protéines (A de la figure 5). Au départ, les kinases ATM/ATR ainsi que le complexe MRN (Mre11, Rad50 et Nbs1) sont recrutés au site du bris. Dans un second temps, de longues extrémités protubérantes 3' sont générées par des exonucléases digérant partiellement les brins 5'. Un filament formé de protéines Rad51 vient se mettre sur ces bouts protubérants simple brin suivi de l'arrivée des protéines Rad (Rad52, Rad54, Rad55, Rad57). Après une recherche de séquence homologue d'ADN dans le génome, l'une de ces extrémités libres effectue une incursion à travers le duplex d'ADN partenaire. Elle est alors rallongée par l'ADN polymérase en utilisant comme matrice la séquence homologue. La boucle alors créée s'agrandit suffisamment pour que le second fragment 3' puisse s'hybrider et être polymérisé à son tour. Des protéines hélicases de la famille RUVB-Like assureraient la migration de cette boucle. Une ligase permet ensuite de rassembler les brins qui ont été coupés [21].

b. La réparation par jonction des extrémités non-homologues (NHEJ)

La réparation par jonction des extrémités non-homologues n'a pas besoin d'ADN matriciel pour mener à bien la réparation de la cassure. Bien qu'utilisée chez les organismes inférieurs plus simples comme la levure et la bactérie, la NHEJ reste le principal mécanisme chez les mammifères [22]. Il s'agit d'une ligation d'extrémité à extrémité d'ADN. Ceci fait que les pertes de séquences et/ou les mutations introduites sont courantes, comparativement à la recombinaison homologue, et que cette réparation est par conséquent imparfaite. Cependant, elle peut aussi être un processus fiable. Ce mécanisme peut sembler périlleux pour la cellule, mais rappelons que les mammifères ont deux copies de chaque gène et que la grande majorité du génome humain est constitué de séquences non codantes. Dans le cas de la levure par contre, il s'agit d'un mécanisme de réparation rapide mis en œuvre quand il est impossible de

faire la réparation HR (par exemple lors des phases haploïdes, où il y a absence de séquence homologue).

Au début du processus, les protéines Ku (homodimère) et la kinase DNA-PK lient et protègent de la dégradation les deux extrémités de l'ADN sectionnées (B de la figure 5). Tout en les maintenant l'une près de l'autre, elles recrutent et activent par phosphorylation d'autres membres de la machinerie de réparation. Enfin, la ligase IV, lie les deux bouts pour reformer la double hélice [21].

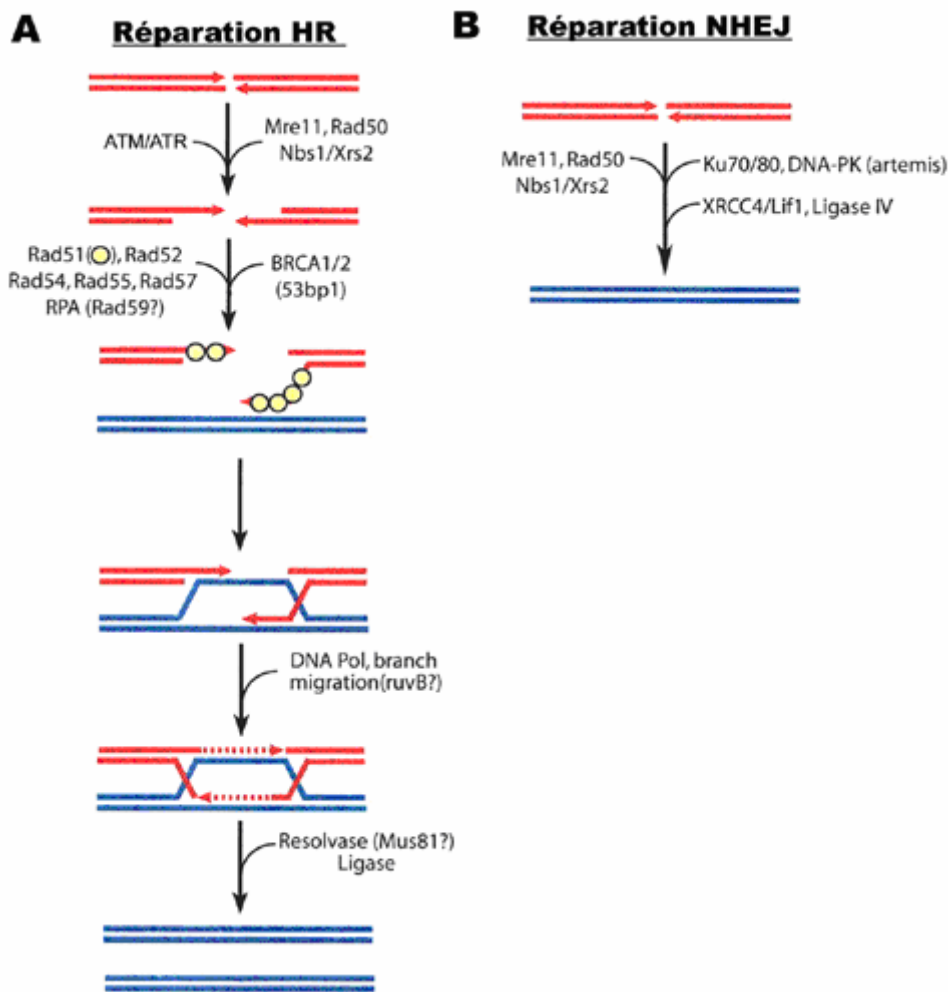


Figure 5 : Réparation des cassures double brin par HR et NHEJ (d'après Peterson and Côté) [21].

c- Implication du complexe MRN dans la réparation de l'ADN par recombinaison homologue

Le complexe MRN a au moins trois fonctions critiques. D'abord, le complexe est un facteur primaire d'identification des dommages double brin et des extrémités simple brin résultant des

fourches de réplication. En utilisant l'ATP, le complexe MRN se lie aux extrémités libres de l'ADN endommagé ou en réplication et induit un signal permettant l'activation directe de la kinase ATM [23]. En second lieu, l'activité nucléasique dépendante de l'ATP permet de dégrader les extrémités d'ADN mal répliquées et les structures en épingle à cheveux secondaires qui surgissent pendant la réplication [24]. Par la suite, le complexe MRN va assurer la liaison des extrémités de l'ADN l'une à l'autre ou aux chromatide sœur [25]. Cette fonction de liaison est aussi assurée par le complexe MRN lors des NHEJ, lors de la recombinaison homologue méiotique et lors de la formation des boucles T et des boucles D au niveau des télomères.

d- Implication du complexe MRN dans le processus de NHEJ

Chez *S.cerevisiae*, Mre11 et Rad50 sont des protéines essentielles pour joindre les extrémités libres des cassures double brin de l'ADN [26]. Ils interviennent dans la même cascade d'activation que Ku [27-29]. Chez les mammifères, l'implication du complexe MRN dans le NHEJ est remise en cause. En effet, des cellules NBS ne sont pas déficientes pour la réparation par NHEJ [30]. De plus, l'inactivation de *MRE11* dans des cellules DT40 chez le poulet a montré que Mre11 n'est pas épistasique de KU70, composant majeur de la réparation par NHEJ [31]. Pourtant, in vitro, Ku, DNA-PK et la ligase IV sont incapables à elles seules d'assurer une NHEJ et le complexe MRN s'annonce indispensable [32]. Ainsi, le rôle du complexe MRN dans la NHEJ n'est pas clairement établi chez les mammifères et de nouvelles données expérimentales seront nécessaires.

Le complexe MRN (Mre11/Rad10/Nbs1) est requis pour la réparation des coupures double brin de l'ADN (CDB) que ce soit par NHEJ ou par recombinaison homologue [33, 34]. Ce complexe est capable d'interagir avec Ku70 (NHEJ) et RPA (RH), il pourrait donc avoir un rôle clef dans la détermination de la voie de réparation [13].

2- MRN et le contrôle du cycle cellulaire

Les cellules mutées au niveau de *NBS1* vont poursuivre leur réplication alors même qu'elles ont subi une irradiation, ce qui indique un déficit au niveau du contrôle durant la phase S. Dans ces cellules, une réduction de l'induction de p53 et de ses effecteurs en aval a pu être observée [35]. Il en résulte une perte partielle du contrôle en G1/S. Le complexe MRN est également requis pour la phosphorylation et l'activation de Chk2 durant la phase G2 après induction des CDB. Dans les cellules mutées pour *NBS1*, le défaut d'activation de Chk2 est

associé à une incapacité de ces cellules à entrer en mitose après irradiation radio-ionisante. Le point de contrôle G2 est restauré lorsque Nbs1 est réintroduit dans les cellules, mais pas lorsqu'on réintroduit Nbs1 muté au niveau de son site de phosphorylation [36]. Ces études suggèrent que la phosphorylation de Nbs1 par ATM est importante pour le contrôle en phase G2.

En conclusion, le complexe MRN participe directement aux processus de réparation des DSB, par recombinaison homologue ou par NHEJ. L'implication de ce complexe dans divers processus de réparation peut s'expliquer par la capacité de MRN à rapprocher deux extrémités d'ADN entre elles, qu'elles proviennent du brin voisin ou bien de la chromatide soeur. Ce rapprochement des deux brins d'ADN constituerait une étape commune aux processus de NHEJ et de recombinaison homologue. Après irradiation, le complexe MRN participe indirectement à la réparation par son contrôle des étapes du cycle cellulaire.

L'introduction de coupure dans l'ADN mène à l'activation d'un certain nombre de systèmes qui identifient, signalent et réparent ces coupures. Les coupures double-brin d'ADN activent rapidement la kinase ATM qui va phosphoryler une série de substrats impliqués dans la réparation de l'ADN et l'activation de points de contrôle du cycle de cellules. Parmi ces substrats : Nbs1, qui fait partie du complexe MRN.

E- Les mutations des gènes du complexe MRN

Les mutations qui touchent les gènes *ATM*, *MRE11* ou *NBS1* sont associées à des syndromes caractérisés par une sensibilité accrue aux RI avec essentiellement une instabilité chromosomique, des défauts des point de contrôle du cycle des cellules et une prédisposition accrue aux cancers (non démontré pour ATLD) [37].

Ces mutations sont toujours hypomorphes et entraînent une perturbation de la protéine pour laquelle ils codent et non sa disparition totale qui serait rapidement létale au stade embryonnaire [38, 39].

Chacun de ces gènes, lorsqu'il est muté, est à l'origine d'un syndrome particulier. En plus des signes caractéristiques de la sensibilité aux RI, un certain nombre d'éléments spécifiques s'associent à chaque syndrome :

1- La mutation du gène *NBS1* entraîne le syndrome Nijmegen Breakage (NBS) [38]. Il comporte un retard statural, une microcéphalie, une dysmorphie faciale avec un front fuyant, un grand nez, des joues proéminentes et un micrognathisme. Un retard mental et une

hypofertilité sont généralement associés. Le déficit immunitaire se manifeste par des infections fréquentes surtout pulmonaires, urinaires et digestives. Un tiers des individus développeront une tumeur maligne d'origine lymphoïde. A l'inverse de l'ataxie télangiectasie, il n'existe ni télangiectasies ni ataxie apparaissant au cours de l'évolution de la maladie [40].

La biologie montre essentiellement un déficit de l'immunité cellulaire et humorale avec une agammaglobulinémie chez un tiers des patients et une diminution de la concentration des CD3 et CD4. La fragilité chromosomique se manifeste par des inversions et des translocations impliquant les chromosomes 7 et 14 qui sont retrouvées dans 10 à 50% des lymphocytes. Les cassures (breakages) impliquent les loci 7p13, 7q35, 14q11, et 14q32. Ces loci correspondent aux gènes des immunoglobulines et des récepteurs T lymphocytaires [41].

Chez la plupart des patients atteints de NBS, des mutations, de types délétion ou insertion ont été retrouvées dans la partie centrale du gène *NBS1*. Cependant, ces mutations conduisent à la formation de domaines C-terminaux par ré-initiation de la traduction en aval de ces mutations. L'incidence du syndrome Nijmegen Breakage est de 1/100 000 naissances dans les populations slaves avec un effet fondateur évident puisque la mutation 657del5 est retrouvée dans 100% des cas [38, 42].

2- Les mutations du gène *MRE11* sont à l'origine d'une maladie appelée ATLD (Ataxia Telangiectasia Like Disease). Elle associe une ataxie cérébelleuse progressive sans aucune télangiectasie ni déficit immunitaire ni élévation des taux d'alpha foetoprotéine ni développement de cancers d'où le terme d'ATLD. Le caryotype lymphocytaire montre un niveau accru de translocations impliquant surtout les chromosomes 7 et 14 dont le nombre augmente après exposition aux radiations ionisantes [39].

En la comparant à l'ataxie télangiectasie, cette maladie montre un tableau clinique plus modéré avec un âge de début tardif et une progression beaucoup plus lente. C'est une maladie très rare puisqu'avant notre étude, 6 patients seulement ont été décrits dans le monde, 4 de Grande Bretagne et 2 d'Italie. Ils présentaient 4 mutations différentes : 2 mutations non-sens et 2 faux-sens. Ces mutations sont :

- 1897 C > T (633 R > stop) [39].
- 1714 C > T (572 R > stop) [8].
- 350 A > G (117 N > S) [39].
- 1422 C > A, (481 T > K) [43].

Les mutations non-sens sont hypomorphes car elles n'enlèvent que l'extrémité du domaine C-terminal.

3- Les mutations du gène RAD50 : jusqu'à ce jour, aucune maladie n'a été décrite être associée à une mutation du gène *RAD50*.

Les Souris KO pour *MRE11*, *NBS1* ou *RAD50* présentent une létalité embryonnaire, ce qui démontre l'importance des protéines du complexe MRN pour le développement embryonnaire et fœtal et rend compte de l'impossibilité de trouver à l'état homozygote une mutation responsable d'une absence totale de la protéine qui serait incompatible avec la vie [44-46]. Par conséquent, les seules mutations viables pouvant toucher l'un de ces gènes ne peuvent être que hypomorphes.

VI- Les ataxies autosomiques récessives associées à une épilepsie

Les ataxies associées à l'épilepsie myoclonique sont habituellement incluses dans le groupe des épilepsies myocloniques progressives (PMEs ; Progressive myoclonus epilepsies). Les épilepsies myocloniques progressives sont un groupe hétérogène de maladies héréditaires définies par l'association de myoclonies, d'épilepsie et de détérioration neurologique progressive. Les PME diffèrent dans leurs tableaux cliniques, leurs étiologies et leurs pathogénies. Cinq pathologies différentes expliquent la majorité des PME, ce sont essentiellement la maladie d'Unverricht Lundborg et la maladie de Lafora, et accessoirement les lipofuscinoses ceroides neuronales (NCLs), l'épilepsie myoclonique avec des fibres rouges en loques (MERRF) et les sialidoses. D'un autre côté, une forme particulière d'épilepsie associée à une ataxie tardive de l'adolescent ou de l'adulte et due à des mutations dans le gène codant pour la polymérase gamma mitochondriale a été identifiée récemment chez un nombre important de patients.

A- Les épilepsies

La clinique de l'épilepsie ne peut être comprise sans une distinction préalable entre les termes « crise épileptique » et « épilepsie ».

La crise épileptique est une manifestation aiguë qui résulte d'une «décharge excessive » d'une population de neurones cérébraux et de son éventuel mode de propagation.

Le terme « épilepsie » désigne par contre une affection chronique d'étiologies diverses, caractérisée par la répétition des crises [5].

Les crises épileptiques se traduisent habituellement à l'électroencéphalogramme (EEG) par des anomalies dites paroxystiques dont les plus typiques sont les pointes-ondes ; mais il faut distinguer :

- les manifestations électroencéphalographiques, survenant pendant les crises, qui sont le plus souvent des anomalies diffuses ou localisées suivant le siège et la propagation de la décharge,
- des manifestations électroencéphalographiques intercritiques qui peuvent être des anomalies paroxystiques sans traduction clinique, mais aussi des anomalies lentes qui, quand elles sont focalisées, peuvent témoigner de l'existence d'une lésion cérébrale responsable des crises.

Les crises épileptiques sont classées en 3 groupes :

* **Les crises généralisées** : Elles résultent d'une décharge embrasant l'ensemble du cortex cérébral. La substance réticulée méso-diencephalique étant la structure déclenchant la décharge ou facilitant sa diffusion, ceci explique que les crises généralisées aient pu être nommées « centrencéphaliques ».

Leur séméiologie électroencéphalographique est faite de figures paroxystiques intéressant les deux hémisphères cérébraux, de manière diffuse et synchrone. Elles se manifestent par des troubles de la conscience et/ou des signes moteurs bilatéraux et symétriques sans début focal.

Les crises généralisées peuvent être convulsives ou non convulsives. Quand elles sont convulsives, elles peuvent être tonico-cloniques de type grand mal (avec une phase tonique se manifestant par une contracture de toute la musculature suivie d'une phase clonique avec des secousses musculaires généralisées brèves et une stertoreuse terminale avec un coma, une respiration ample et bruyante et émission d'urine), toniques pures, myocloniques massives bilatérales ou de spasme en flexion. Quand il s'agit de crises non convulsives, on parle d'absence.

* **Les crises partielles** : Encore appelées crises focales, elles résultent d'une décharge localisée de neurones du cortex et souvent à partir d'une lésion. Leurs signes dépendent du siège de la décharge et de son mode de propagation. Elles peuvent intéresser des zones cérébrales impliquées dans la motricité, la sensibilité, le contrôle végétatif ou le langage. Les crises partielles peuvent secondairement se généraliser.

* **Les crises unilatérales** : doivent être distinguées des crises focales motrices. Elles résultent d'une décharge intéressant un seul hémisphère cérébral et se manifestent, le plus souvent, par des clonies intéressant l'hémicorps opposé. Elles sont très particulières à l'enfant,

B- La maladie d'Unverricht-Lundborg

La maladie d'Unverricht-Lundborg également appelée myoclonus baltique ou myoclonus méditerranéen est une maladie à transmission autosomique récessive.

Cette maladie a été décrite pour la première fois en 1891 par Unverricht en Estonie et en 1903 par Lundborg en Suède [47, 48]. Bien qu'on la retrouve partout dans le monde, son incidence est plus importante en Finlande (1/20.000) et dans le bassin méditerranéen ainsi qu'aux Etats-Unis et au Canada [49].

Son diagnostic est basé sur les données cliniques, neurophysiologiques, anatomopathologiques et génétiques.

Les patients se présentent entre 6 et 18 ans avec des myoclonies sévères sensibles aux stimuli sensitifs. La maladie progresse lentement avec apparition d'ataxie. Pendant longtemps, les patients maintiennent des fonctions cognitives normales et le déclin intellectuel est très lent s'étalant sur une période de 10 à 20 ans. Les médicaments anti-épileptiques comme le valproate peuvent réduire la fréquence des crises mais, par la suite, apparaît une résistance à ces thérapeutiques [50].

Dès le début de la maladie, l'EEG montre un fond lent et désorganisé. Des multi-pointes généralisées de grande amplitude et de fréquence égale à 3-5 Hz sont associées aux myoclonies. Des ondes biphasiques concomitantes aux secousses myocloniques ont été décrites chez certains patients qui n'ont présenté aucune pointe dans leurs tracés EEG [51].

Le gène responsable de cette maladie a été localisé sur le locus 21q22.3 en 1991 par Lehesjoki et al. après l'étude de 12 familles finlandaises puis identifié en 1996 par Pennachio et al. qui a décrit une mutation touchant un site d'épissage et une mutation stop [52, 53]. Il s'agit du gène *EPM1* codant pour la cystatine B (Stéfin). La cystatine B est un inhibiteur intracellulaire des protéases appartenant à la famille des papaïnes qui sont des cystéine-protéases. De ce fait, elle protège la cellule contre la protéolyse endogène ou externe inadéquate. Ces protéases sont impliquées dans le déclenchement de l'apoptose [54]. La protéine peut former un dimère stabilisé par des forces noncovalentes, bloquant la papaïne et les cathepsines H, L et S et de façon moins importante B [55]. La protéine est suspectée jouer un rôle dans la protection contre les protéases échappées des lysosomes [54]. Les données expérimentales indiquent que les mutations dans ce gène sont responsables des défauts primaires chez les patients présentant l'épilepsie myoclonique progressive (EPM).

La pathophysiologie exacte de la maladie demeure inconnue. Vraisemblablement, les mutations de la cystatine B et la perte d'inhibition des protéases à cystéine, entraînent une perturbation des mécanismes de l'apoptose.

In vitro, un complexe multiprotéique interagissant avec la cystatine B a été identifié. La microscopie confocale immunofluorescente a montré que les mêmes protéines du complexe sont présentes dans les cellules à grains du cervelet embryonnaire et les cellules de Purkinje du cervelet de rat adulte [54]. Ceci démontre la possibilité que ce complexe multiprotéique associé à la cystatine B peut avoir une fonction cérébelleuse spécifique différente de sa fonction apoptotique.

La mutation la plus fréquemment associée à la maladie d'Unverricht-Lundborg, et ce parmi toutes les ethnies étudiées, est la répétition homozygote de 12 paires de base (dodecamer 5'-CCC-CGC-CCC-GCG – 3') dans la partie 5' non traduite du côté du promoteur. Les allèles normaux portent deux à trois copies de la répétition de 12 paires de base [56]. Chez les patients, ce nombre dépasse toujours 30 répétitions et peut même atteindre la centaine. Cette expansion représente environ 90% de l'ensemble des mutations dans le monde et 99% dans la population finlandaise [57]. Aucune corrélation n'a été retrouvée entre la taille de la répétition et l'âge du début ou la sévérité de la maladie [58]. Au moins six autres mutations ont été décrites dans le gène de la cystatine B, trois mutations touchant des sites d'épissage : 1925G>C, 2027G>A, et 2353A>G et 3 autres mutations exoniques 426G>C, 2388C>T, et 2400del/TC [53, 59, 60].

C- La maladie de Lafora

La maladie de Lafora a été décrite pour la première fois par Lafora et Gluelkin en 1911 [61]. C'est une forme autosomique récessive d'épilepsie myoclonique progressive avec un début pendant l'enfance ou l'adolescence. Les signes cliniques commencent habituellement entre 6 et 19 ans par des accès épileptiques. Les crises sont de type myocloniques, tonico-cloniques généralisés ou focaux occipitaux avec une cécité passagère et des hallucinations visuelles et des absences. Plusieurs patients ont montré des convulsions fébriles et non-fébriles isolées plutôt dans l'enfance. Le déficit intellectuel, la dysarthrie et l'ataxie apparaissent très tôt et la démence se développe graduellement. La plupart des patients meurent dans un délai de 10 ans [62].

Tôt dans la maladie de Lafora, l'EEG montre un fond désorganisé avec des décharges multiples de pointes et d'ondes. La photosensibilité est commune. Durant les mois suivants,

des anomalies épileptiformes multifocales principalement occipitales apparaissent en plus des crises généralisées. Les pointes et les ondes changent de fréquence en passant de 3 hertz à des fréquences plus rapides de 6 à 12 hertz [58].

La maladie de Lafora est caractérisée par une épilepsie, un myoclonus, une démence et la présence des corps de Lafora formés de polyglucosanes positifs à l'acide périodique de Schiff. Ces corps sont trouvés dans les cellules nerveuses, musculaires cardiaques et squelettiques, hépatiques, et dans les cellules des canaux des glandes sudoripares [58].

Dans 70% des cas, la maladie de Lafora est associée à des mutations dans le gène *EPMA* qui code pour une tyrosine phosphatase [63]. L'absence de laforine entraîne une augmentation de synthèse de glycogène, contribuant aux dépôts de polyglucosane observés dans la maladie [64]. Un gène additionnel, *NHLRC1* qui code pour une ligase de l'ubiquitin E3, a été récemment identifié en 6p22 [65]. On pense que NHLRC1 et EPMA agissent ensemble pour protéger les neurones contre l'accumulation des corps de polyglucosane en ciblant et en ubiquitinant des protéines faisant partie du complexe des corps de Lafora pour les dégrader.

Ganesh et al. ont inactivé le gène *EPMA* dans un modèle souris et ont démontré que la dégradation neuronale et l'apparition des corps de Lafora précèdent les troubles comportementaux, l'ataxie, les crises myocloniques spontanées, et l'activité épileptiforme à l'EEG [66].

D- Les lipofuscinoses ceroides neuronales (CLNs)

Les lipofuscinoses ceroides neuronales sont caractérisées par l'accumulation intracellulaire de lipopigment lysosomal dans le cerveau, le cervelet et d'autres tissus.

Chacune de ces formes est génétiquement différente. Elles ont toutes une transmission autosomique récessive à l'exception de la forme adulte qui peut avoir une transmission autosomique dominante.

Elles sont génétiquement classées de CLN1 à CLN8. Cette classification prend en considération l'âge d'apparition des premiers signes cliniques durant l'enfance précoce, l'enfance tardive, l'adolescence ou l'âge adulte. Ces différentes classes de CLN partagent des signes semblables tels que la rétinopathie avec perte de la vision, l'épilepsie, l'ataxie et la démence [67].

Les protéines codées par ces gènes sont localisées dans les lysosomes ou dans le reticulum endoplasmique. L'élément protéique principal du produit d'accumulation a été identifié comme étant la sous-unité C de l'ATP synthase mitochondriale [68].

E- L'épilepsie myoclonique avec des fibres rouges en loques (MERRF)

Le syndrome MERRF est une pathologie ayant une transmission maternelle. Il est caractérisé par l'apparition initiale de myoclonies pendant l'adolescence ou l'âge adulte, suivies d'épilepsie, d'ataxie, de faiblesse musculaire et de la perte progressive des capacités intellectuelles [69]. Sur les sections histologiques des biopsies musculaires on observe des fibres rouges « déchiquetées » indicatives de la prolifération et de l'accumulation de mitochondries sous le sarcolemme [70]. L'EEG montre des décharges de pointes et d'ondes généralisées de 2 à 5 hertz avec le fond qui se ralentit au fur et à mesure que la maladie progresse. Des décharges épileptiformes focales peuvent également être vues [71]. La maladie est provoquée par des mutations de l'ADN mitochondrial. La mutation la plus commune et qui représente 80% des cas de MERRF est la 8344A>G dans le gène du tRNAlys mitochondrial *MTTK* [72]. Des mutations dans d'autres gènes tRNA mitochondriaux tels que *MTTL1*, *MTTH*, *MTTS1* et *MTTF* ont été décrites et ainsi que dans le gène *ND5* codant pour une sous-unité du complexe I mitochondrial [73-77].

F- Les sialidoses

Les sialidoses sont des troubles rares de stockage lysosomal. Elles ont une transmission autosomique récessive. Deux sialidoses peuvent être responsables de PME :

- La sialidose de type I (cherry-red spot myoclonus syndrome) est provoquée par un déficit de la neuraminidase. Elle a un début juvénile ou adulte. Elle est responsable d'un myoclonus d'intention et d'action, d'épilepsies tonico-cloniques et d'une ataxie sans aucune détérioration mentale. Il s'y associe un déclin progressif de l'acuité visuelle et une tache rouge cerise caractéristique au fond d'œil [78]. Le gène responsable (*NEUI*) est situé sur le chromosome 6p21.3 [79]. Il code pour une sialidase responsable du transport vésiculaire endosomal et lysosomal. Plus de 39 mutations dans *NEUI* ont été décrites [80].
- La sialidose de type II est provoquée par un déficit en N-acétyl neuraminidase et en galactosialidase. L'âge de début est variable, allant de la période néonatale à la deuxième décennie. Les signes cliniques incluent une dysmorphie faciale, une opacification cornéenne, une hépatomégalie, une dysplasie squelettique, un retard scolaire et un myoclonus. L'EEG montre une activité de fond rapide de faible amplitude avec des décharges de 10 à 20 hertz liées au myoclonus [81]. Les résultats

de l'IRM sont normaux au début et montrent une atrophie cérébelleuse et cérébrale au fur et à mesure que la maladie progresse [82]. Le gène responsable des galactosialidoses est situé sur le chromosome 20. Il code pour la cathepsine A (PPCA) qui est une carboxypeptidase lysosomale. Cette protéine stabilise les beta-galactosidase et neuraminidase lysosomales et est déficiente dans les galactosialidoses [83].

G- La polymérase gamma (POLG)

POLG est un hétérodimère composé d'une sous-unité alpha qui fait 140 kDa et d'une sous-unité bêta de 41 kDa. La sous-unité alpha est codée par un gène nucléaire de 22 exons « *POLG1* » situé sur le chromosome 15q25. POLG fait partie d'un complexe multienzymatique localisé sur la membrane interne de la mitochondrie qui est indispensable pour la réplication de son ADN [84].

Des mutations dans *POLG1* ont été associées à plusieurs pathologies dont l'ophtalmoplegie externe progressive autosomique récessive ou dominante (PEO), le syndrome d'Alpers (récessif), le syndrome neuropathie sensitive ataxiante, dysarthrie et ophtalmoparésie (SANDO, récessif), le parkinsonisme, l'infertilité masculine et la ménopause précoce [85].

Les mutations de *POLG1* dans des formes particulières d'ataxies héréditaires associées à des épilepsies (SANDO) n'ont été identifiées que récemment. Ainsi S. Winterthun et al. ont rapporté trois familles ayant des mutations dans *POLG1* et présentant une ataxie associée à des migraines, une épilepsie myoclonique, une neuropathie et une ophtalmoplegie externe à début tardif. Les premières manifestations cliniques ont commencé à l'âge de 5-23 ans par des migraines ou une épilepsie. Toutes les deux peuvent être provoquées par le même mécanisme, à savoir des décharges épileptiques [86]. D'un autre côté, Van Goethem et al. ont décrit des patients homozygotes pour une mutation faux-sens à transmission récessive dans le gène de la polymérase gamma (*POLG1*). Elle est associée à une épilepsie, une neuropathie sensitive et une ataxie avec une diminution des fonctions cognitives, avec un âge moyen de début d'environ 17 ans [87].

RESULTATS

Au moment de commencer cette thèse, seuls 7 gènes responsables d'ataxie autosomique récessive non-métabolique étaient connus, mais ceux-ci ne rendaient compte que de la moitié environ des ataxies progressives de l'enfant, dont une partie importante peut être due à des causes génétiques. Dans le but d'améliorer le diagnostic de ces syndromes et d'essayer d'identifier des mécanismes pathologiques communs, il est nécessaire d'identifier un plus grand nombre de gènes directement responsables d'ataxie récessive dégénérative. Au cours de ma thèse j'ai principalement étudié 3 formes particulières d'ataxie. Dans le but de m'affranchir du problème de l'hétérogénéité génétique de ces maladies, ma stratégie a consisté à identifier des nouveaux loci à partir de grandes familles consanguines dont la liaison génétique permet de générer un LOD score supérieur ou égal à 3 pour chacune d'elle (cartographie par homozygotie). L'étape initiale consiste à génotyper 400 marqueurs multialléliques répartis sur l'ensemble du génome. Cette étape a été réalisée manuellement par ma collègue P. Bomont avant mon arrivée au laboratoire pour la première famille, et au Centre National de Génotypage (CNG, Evry) pour les autres familles.

A. Liaison génétique

En l'absence de piste fonctionnelle permettant de cibler un mécanisme ou une protéine particulière, la recherche du gène morbide d'une maladie autosomique récessive se réalise de manière indirecte, par clonage positionnel utilisant la stratégie de la cartographie par homozygotie.

1. La cartographie génétique par homozygotie

Le clonage positionnel consiste à localiser le gène morbide par liaison génétique. La cartographie génétique repose sur l'identification des marqueurs génétiques qui coségrègent avec la maladie lors de la méiose. La figure 6 montre le principe de la cartographie génétique par homozygotie dans le cas d'une maladie autosomique récessive, avec notion de consanguinité. Dans ce cas particulier, les enfants atteints ont hérité la même mutation, transmise aux deux parents à partir d'un ancêtre commun. On recherche la région pour laquelle les marqueurs polymorphiques sont homozygotes chez tous les enfants atteints et hétérozygotes chez les sains [88].

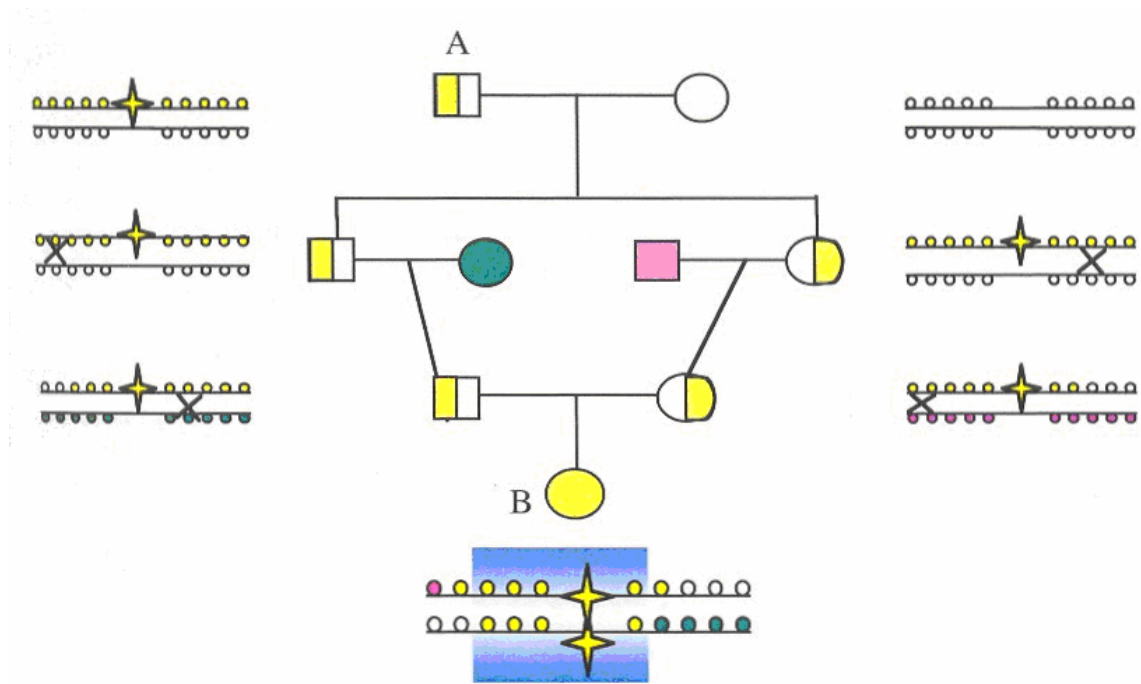


Figure 6 : Principe de la cartographie génétique par homozygotie

Dans cette famille, consanguine au premier degré (les parents de l'enfant atteint sont cousins), la mutation, représentée par une étoile jaune, est présente chez l'ancêtre (A) sur un de ses deux chromosomes. Cette mutation a été transmise dans les générations suivantes dans les deux branches de la famille. L'enfant atteint (B) a reçu de chacun de ses deux parents la même mutation.

Le principe de la cartographie génétique consiste à rechercher le gène morbide de manière indirecte en repérant l'environnement génétique associé à la mutation. Dans cet exemple, l'environnement de la mutation est jaune chez l'ancêtre A. Des recombinaisons méiotiques représentées ici par des croix, se produisent entre les deux chromosomes parentaux et génèrent, chez les descendants, des environnements différents. Ainsi, si l'on regarde l'enfant atteint B, les couleurs de ses deux chromosomes reflètent les événements de recombinaison qui ont eu lieu au cours des générations précédentes, et cela à partir de l'ancêtre A. La distance génétique est définie par la fréquence de recombinaison entre deux loci (deux loci recombinants entre eux à une fréquence de 1% sont définis comme étant séparés de 1 cM sur une carte génétique). Comme la fréquence de recombinaison augmente avec la distance génétique, la probabilité, d'observer des recombinaisons à proximité du gène morbide est faible. Ainsi, l'environnement proche du gène muté correspond à son environnement initial et cela sur chaque chromosome. La région est « homozygote », et l'approche est appelée cartographie génétique par homozygotie. Afin de repérer ces régions d' homozygotie, on teste des marqueurs polymorphiques spécifiques couvrant le génome entier (chaque rond représenté sur ce schéma correspond à un marqueur polymorphique).

2. Les marqueurs polymorphiques du génome

On utilise des marqueurs ADN polymorphiques pour les études de liaison génétique. Ces marqueurs doivent être suffisamment nombreux et espacés pour permettre une bonne couverture du génome. La première génération de marqueurs ADN, représentée par les polymorphismes de longueur de fragment de restriction (RFLP pour «restriction fragment length polymorphsim») était constituée de marqueurs bi-alléliques et ainsi peu informatifs. Elle a été remplacée par des marqueurs multialléliques plus polymorphiques. Au début les séquences répétées minisatellites ont été utilisées, puis les séquences microsatellites. Les marqueurs microsatellites sont constitués de répétitions di-, tri-, ou tétra-nucléotidiques. Les

répétitions (CA)_n représentent les marqueurs les plus fréquents sur le génome humain. L'identification de certains de ces marqueurs ainsi que leur cartographie a permis de développer une carte génétique comprenant 5264 microsatellites couvrant le génome entier [89].

3. Mesure statistique de la liaison : le LOD score

Le LOD score est la mesure statistique de la preuve de liaison. C'est le logarithme du rapport de la probabilité d'observer le résultat si le locus est lié (pour une fraction de recombinaison θ) par rapport à la probabilité d'observer le résultat en absence de liaison (c'est-à-dire pour une fraction de recombinaison égale à 0,5). En raison des tests multiples effectués pour analyser l'ensemble du génome, le seuil conventionnel de signification $p = 0,05$ nécessite des probabilités de 1000/1 chances 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 %.

B. Ataxie spinocérébelleuse avec cécité et surdité (SCABD)

(Gribaa M., Klur S., Bomont P., Gershoni-Barush R., Leheup B., Koenig M. European Journal of Human Genetics. 10 (supplement 1) - P0899 - May 2002).

Le locus associé à ce syndrome a été identifié dans notre laboratoire par Pascale Bomont au niveau du chromosome 6 en 6p21-23 sur une région couvrant 17 cM grâce à une grande famille arabe israélienne. Les deux patients de cette famille, un oncle et une nièce, sont atteints d'une ataxie récessive ayant débuté vers l'âge de 3 ans. Ultérieurement (vers 10 ans) une atrophie optique et une surdité se sont développées chez eux [7].

Du fait du tableau clinique variable et souvent incomplet du syndrome de Van Bogaert et Martin, nous avons inclus dans notre étude 48 familles consanguines et/ou multiplex présentant une ataxie héréditaire à transmission autosomique récessive qu'elle soit associée ou non à des troubles de la vision et de l'audition. Pour ces familles, 4 formes d'ataxie, à savoir l'ataxie de Friedreich, l'ataxie avec déficit en vitamine E et les formes d'ataxie avec apraxie oculomotrice, ont été éliminées.

L'étude de liaison de ces familles m'a permis de trouver 2 autres familles apparemment liées au locus 6p21-23 :

- La famille J1 est originaire du Liban, et résidant à Marseille. Elle nous a été adressée par le Pr J-P Azulay. Elle présente 2 enfants issus de parents consanguins qui sont atteints d'une ataxie majeure débutée à l'âge de 16 ans associée à des

ROT (réflexes ostéo-tendineux) faibles aux membres supérieurs et abolis aux membres inférieurs avec d'importants troubles de la sensibilité orthocinétique.

- La famille C est originaire de Turquie et résidant à Nancy. Elle nous a été adressée par le Pr B Leheup. C'est une famille consanguine avec 2 enfants atteints d'une ataxie majeure débutée avant l'âge de 10 ans. A cette ataxie sont associés une rétinopathie pigmentaire et des signes de démyélinisation.

La combinaison des régions d'homozygotie de ces 2 familles avec celle préalablement décrite par P. Bomont m'a permis de réduire la région en cause à 3,5 mégabases (Mb) entre les 2 marqueurs flanquants : D6S105 et D6S1660 (figure 7) dans la bande cytogénétique 6p22.1-22.2.

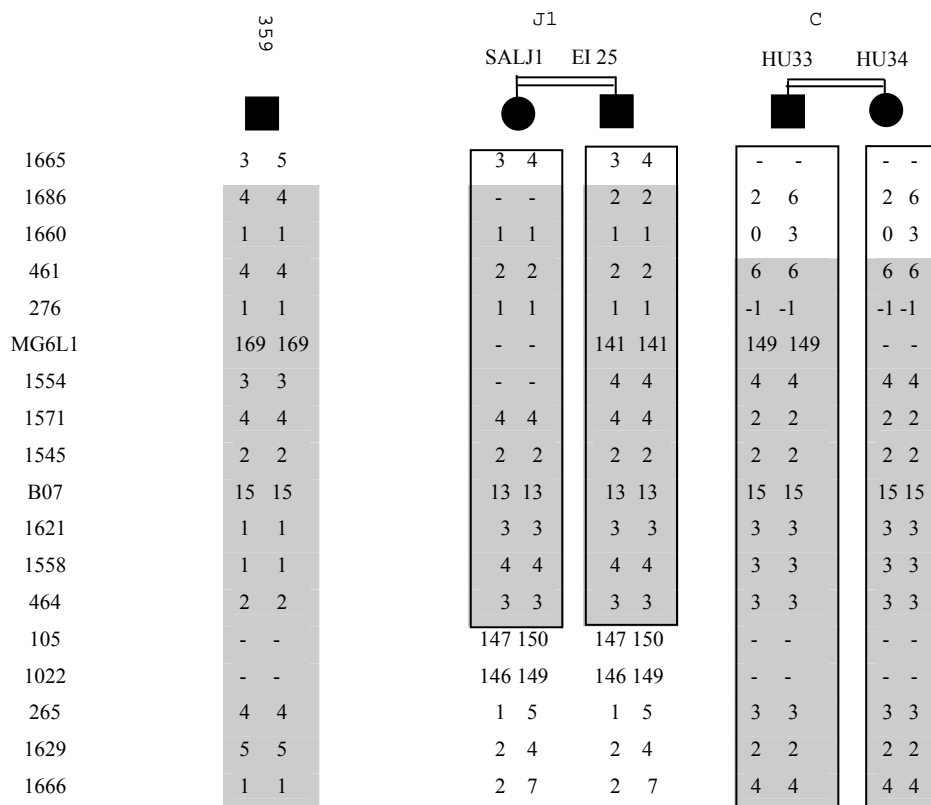


Figure 7 : Haplotype des 3 familles liées au locus 6p22.

Au départ, je ne disposais pour ces 2 familles que des prélèvements des enfants atteints. La région candidate de 3,5 Mb contenait 39 gènes de la famille des histones, qui n'ont pas été retenus comme candidats du fait de leur forte redondance, 4 gènes de protéines membranaires

de transport du phosphate, qui n'ont pas été retenus comme candidats du fait de leur expression rénale prédominante et 30 autres gènes. J'ai donc décidé avec ma collègue Clotilde Lagier-Tourenne de séquencer la totalité des 30 gènes potentiellement candidats de la région critique. Le séquençage de l'ensemble de leurs exons ne nous a pas permis de trouver des mutations susceptibles d'être la cause du syndrome SCABD (tableau II).

Tableau II : liste des gènes séquencés au niveau de la région 6p22.1-22.2

Gène	Position sur le chromosome	Changement non décrit auparavant
VMP	24 234 456	
DCDC2	24 386 337	Intronique C→T 77 pb après exon 7
MRS2L	24 511 160	
GPLD1	24 536 384	Intronique C→T, 71 pb après exon 5 Exonique 1215 C→T (Y405Y) (E14) Intronique G→T, 60 pb avant exon 26
ALDH5A1	24 603 203	Intronique G→A 21 pb après exon 8
KIAA0319	24 652 311	
TTRAP	24 758 184	
THEM2	24 775 253	
C6orf62	24 813 144	
GMNN	24 883 142	
C6orf32	24 947 575	Intronique A→G, 22 après exon 6
CMPNH	25 189 522	Exonique 182 C→T (P61L) (E3) Exonique 75A→G (G25G) (E2) Intronique A→T 68 pb après intron 2 Intronique A→G 157 pb après E1
LRRC16	25 387 634	Intronique C→A, 85 pb avant exon 12 Intronique C→T, 44 pb après exon 15
SCGN	25 760 407	
TRIM38	26 071 049	
HFE	26 195 427	Intronique G→A, 79 pb après exon 2 Exonique 183C→G (H63D) (E2) Intronique A→T, 96 pb avant exon 6
BTN3A2	26 484 651	Exonique 231C→T (N77N) (E 3) Intronique A→C, 39 pb après exon 3 Exonique 632G→A (R221K) (E4)
BTN2A2	26 490 333	
BTN3A1	26 510 515	Exonique 25T→C (F9L) (E2) Intronique G→A, 32 pb avant exon 5 Intronique T→C, 31 pb après exon 8 Intronique C→A 132 pb après exon 9 Intronique G→A, 61 pb après exon 10
BTN2A3	26 530 326	
BTN3A3	26 548 742	
BTN2A1	26 565 180	
BTN1A1	26 584 519	
HMG4	26 652 733	

ABT1	26 705 169	
ZNF322	26 743 498	Exonique 156C→G (F52L) (E1a) Exonique 338C→T (A113V) (E1a)
GUSBL1	26 952 700	Intronique A→G, 13 avant exon 2 Intronique G→A, 33 avant exon 2 Exonique 134G→A (R45R) (E2) Exonique 141C→T (Y47Y) (E2) Exonique 172C→G (P58A) (E2) Exonique 225C→A (R55R) (E2) Exonique 245A→G (Y82C) (E2) Exonique 251T→C (V84A) (E2) Intronique G→T 7 après exon 2
PRSS16	27 323 487	Exonique 811G→C (A271P) (E8)
FKSG83	27 400 519	Exonique A→G (Q→R) (E1)
ZNF184	27 526 579	Intronique C→T, 8 pb avant exon 3 Intronique C→G, 102 pb après exon 5

Ce résultat de séquençage négatif m'a conduit à reconsidérer la liaison des 2 familles J1 et C au locus 6p21-23.

Pour la famille C, j'ai pu obtenir l'ADN des 4 enfants sains ainsi que la généalogie précise sur la boucle de consanguinité. L'analyse de ces enfants a montré qu'ils ont reçu un haplotype hétérozygote différent de celui des enfants atteints (figure 8). De plus, les parents sont cousins « une fois éloignée » (intermédiaire entre le 1^{er} et le 2^{ème} degré, figure 8). L'ensemble de ces données permet de conclure que le LOD score en faveur de la liaison à cette région est de 2,6. Ceci est fortement en faveur de la liaison de cette famille au locus du 6p21-23. De plus, le tableau clinique des enfants atteints, avec un âge de début précoce et une rétinoopathie pigmentaire, ressemble beaucoup à celui de la première famille arabo-israélienne à partir de laquelle ce nouveau locus a été identifié.

Pour la famille J1, les parents sont cousins germains. Le LOD score en faveur de la liaison n'est « que » de 1,8. De plus les données cliniques sont un peu atypique par rapport aux deux autres familles. L'analyse des deux patients avec les nouvelles micropuces de génotypage à haute densité (10 000 SNP) a permis de retrouver au moins 2 autres régions d'homozygotie partagées entre les deux atteints et qui sont beaucoup plus grandes que celle trouvée dans la région du chromosome 6p. Un seul de ces nouveaux loci pourrait correspondre à un nouveau locus d'ataxie, nécessitant une exploration plus approfondie. Si cette hypothèse se confirme, la famille J1 est exclue du locus en 6p21-22 et l'intervalle critique inclut une grande région (10 Mb) plus centromérique contenue dans les bandes 6p21-22 et n'ayant pas encore été explorée.

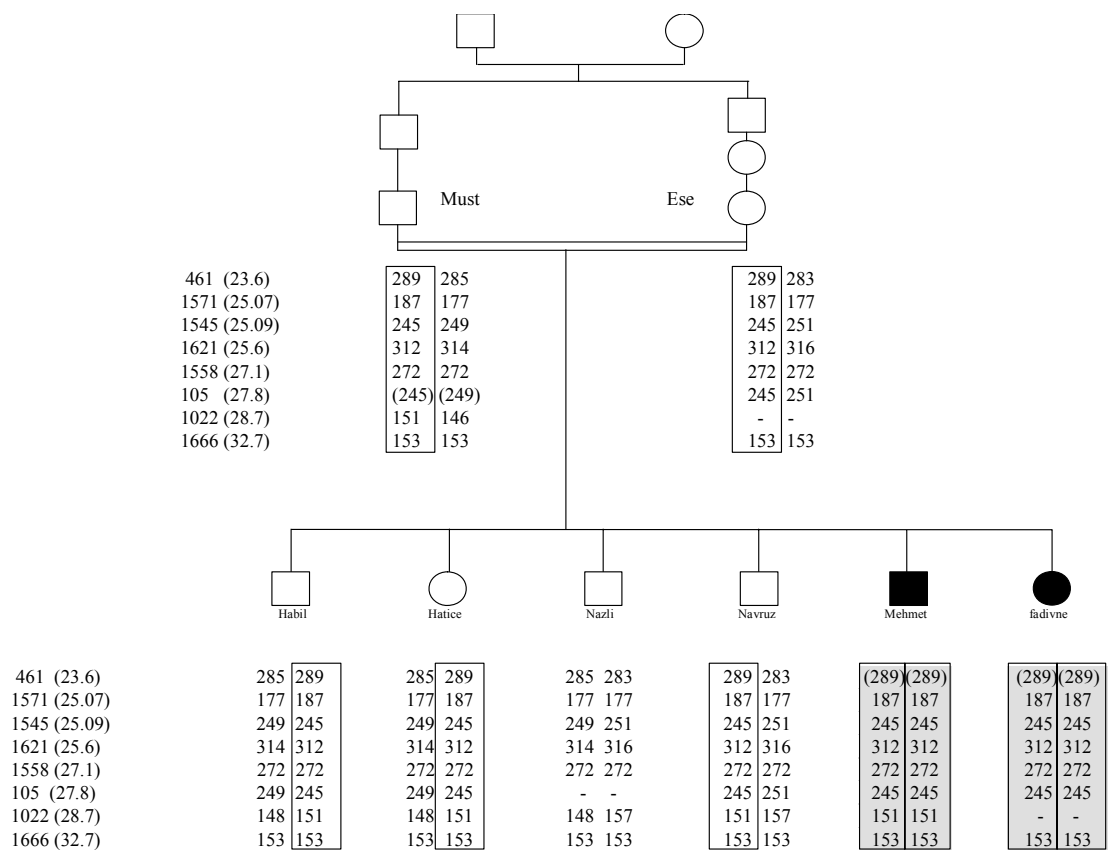


Figure 8 : Confirmation de la liaison de la famille C au locus du 6p21-22 après étude de l'haplotype des enfants sains.

La deuxième partie de ma thèse a consisté à l'étude de grandes familles consanguines provenant d'Arabie Saoudite. Les ADNs de 3 de ces familles ont été envoyés au CNG (Centre National de Génotypage) où un tour complet du génome humain leur a été réalisé, de façon automatisée, utilisant environ 400 marqueurs microsatellites espacés entre eux d'environ 10 Mb.

Les résultats nous ont été envoyés à l'état brut sous forme d'un tableau Excel contenant la liste des différents membres de chaque famille associés aux génotypes correspondants pour chaque marqueur. Je me suis donc chargé d'interpréter les données de liaison génétique, de localiser les régions possibles d'homozygotie, de les confirmer par l'étude d'un grand nombre de marqueurs dans ces régions, de délimiter précisément les intervalles liés et de rechercher des gènes candidats.

C- Première famille étudiée après un tour complet du génome humain

La première famille que j'ai étudiée est la famille F. C'est une famille consanguine originaire d'Arabie saoudite. Elle est composée de 5 enfants dont 3 sont atteints d'une ataxie associée à des myoclonies. Cependant, le neurologue ayant examiné les enfants pensait que le diagnostic de maladie d'Unverricht Lundborg n'était pas compatible parce que l'ataxie était clairement au premier plan du tableau clinique. L'analyse des résultats de génotypage des 400 marqueurs a révélé une seule région d'homozygotie partagée par les 3 atteints et située sur le chromosome 15. Elle intéresse 2 marqueurs successifs distants de 7 cM (Figure 9). La région du gène de la maladie d'Unverricht Lundborg n'était pas informative.

L'étude du locus sur le chromosome 15 avec d'autres marqueurs n'a pas permis de confirmer l'existence de la région d'homozygotie. De plus, j'ai étudié d'autres familles atteintes d'ataxie associée ou non à une épilepsie mais aucune ne s'est avérée être liée à ce locus du chromosome 15. Nous avons donc décidé de faire tester le gène de cystatine B (maladie d'Unverricht Lundborg) par le laboratoire du Dr E Leguern (Hôpital de la Salpêtrière) qui a identifié une expansion du dodecanucléotide CCCCCCGCG à l'état homozygote chez les patients de cette famille et celui d'une autre famille avec ataxie myoclonique originaire de la même région d'Arabie Saoudite.

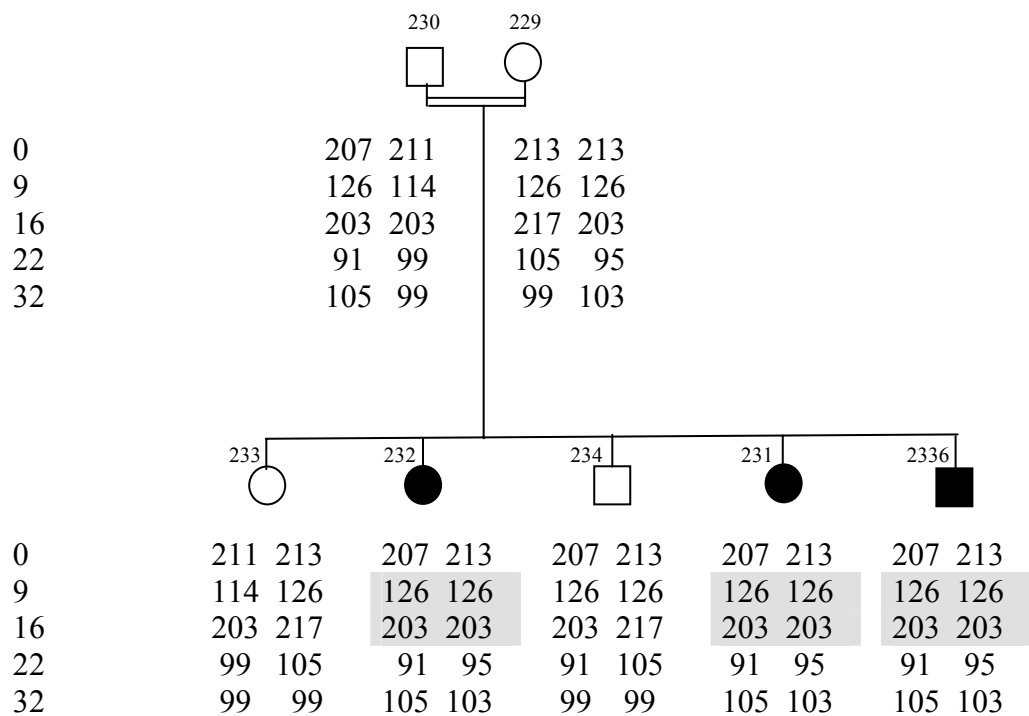


Figure 9 : Génotype des individus de la famille F. pour les marqueurs du chromosome 15. La distance séparant les marqueurs successifs est indiquée en cM. La liaison à ce locus n'a pas été confirmée.

D. Ataxia Telangiectasia-like disease (ATLD)

(Fernet M, Gribaa M, Salih MA, Seidahmed MZ, Hall J, Koenig M. Hum. Mol. Genet. 2005 Jan 15;14(2):307).

La deuxième famille que j'ai étudiée, la famille J2, est une grande famille consanguine originaire d'Arabie Saoudite avec 4 enfants sains et 4 atteints (dont deux jumeaux). Les résultats de génotypage du CNG ont démontré que les jumeaux étaient monozygotes.

Les patients présentent une ataxie progressive de début précoce associée à une apraxie oculomotrice et une dyskinésie faciale. Leurs réflexes ostéo-tendineux sont diminués. Sur le plan biologique les taux des immunoglobulines, de l'alpha-fetoprotéine, de l'antigène carcinoembryonnaire ainsi que des triglycérides et du cholestérol sont normaux (tableau 1 de la publication 1).

La sélection, à partir des données du CNG, des régions pour lesquelles au moins un marqueur était homozygote pour chacun des quatre individus atteints et hétérozygote pour le seul enfant sain disponible au moment de l'étude, m'a permis d'identifier une seule région. Il s'agit de la

région 11q22-q23 pour laquelle six marqueurs consécutifs (de D11S937 à D11S925, 39 Mb) étaient homozygotes chez tous les patients (Figure 1A de la publication 1) .

L'étude d'autres marqueurs microsatellite de cette région, en incluant trois enfants sains , a confirmé la liaison au locus 11q22-23. Il en résulte une région d'homozygotie pour au moins 14 marqueurs consécutifs qui est présente chez les 4 patients. Les enfants sains ont hérité d'un haplotype différent (figure 1A de la publication 1).

Le calcul du LOD score, en tenant compte de la boucle de consanguinité au premier degré, donne une valeur de 2,9 à une fraction de recombinaison $\theta = 0$, en faveur de la liaison.

L'étude de 30 familles consanguines additionnelles avec les mêmes marqueurs m'a permis de retrouver une deuxième famille, également d'Arabie Saoudite, liée à la même région. Les parents sont cousins germains. La famille comprend 3 enfants atteints et 3 sains. Les trois atteints étaient homozygotes pour au moins cinq marqueurs consécutifs et les trois enfants sains ont hérité d'un haplotype différent (figure 1B de la publication 1). La région d'homozygotie chez les atteints fait 22Mb et elle est située entre les 2 marqueurs flanquant D11S1761 et D11S898. Le calcul du LOD score donne une valeur de 2,77 à une fraction de recombinaison $\theta=0$, en faveur de la liaison.

Pour les patients de cette famille l'ataxie a commencé entre 15 et 20 mois d'âge. Le plus âgé d'entre eux a présenté des réflexes ostéo-tendineux vifs depuis l'âge de 2 ans.

Deux gènes connus d'ataxie récessive sont situés dans cette région :

- Le gène *ATM* (11q22.3) dont les mutations sont responsables de l'ataxie télangiectasie. C'est une affection qui comporte [90]:

- . Une ataxie cérébelleuse progressive commençant entre un et quatre ans
- . Des télangiectasies cutanéomuqueuses.
- . Des anomalies de l'immunité responsable d'infections fréquentes
- . Une apraxie oculomotrice
- . Une prédisposition aux cancers surtout les leucémies et les lymphomes
- . La concentration d'alpha-fetoprotéine sérique est élevée dans plus de 90% des cas
- . Le caryotype montre des cassures chromosomiques
- . Les cellules sont anormalement sensibles aux radiations ionisantes

- Le gène *MRE11* (11q22.2) dont les mutations sont responsables de l'ATLD (Ataxia Telangiectasia Like Disease). Les atteints présentent [8, 39, 43]:

- . Une dégénérescence cérébelleuse progressive
- . Pas de télangiectasies cutanéomuqueuses
- . Pas d'apraxie oculomotrice
- . Une radiosensibilité cellulaire et chromosomique accrue aux radiations ionisantes

Puisque ces patients ne présentaient aucun des signes majeurs de l'AT à savoir l'élévation de l'alpha-foetoprotéine et le déficit immunitaire, nous avons concentré nos efforts sur l'étude de *MRE11*.

Le séquençage des 20 exons ainsi que des régions introniques flanquant le gène *MRE11* a été effectué avec des amorces que j'ai moi-même choisi et mis au point.

Le séquençage de ce gène chez les patients des 2 familles m'a permis de trouver une transition de G en C en position 630 (630G>C) dans l'exon 7 (TGG > TGC), responsable du remplacement d'un tryptophane par une cystéine (W210C).

J'ai recherché cette mutation par DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) chez 192 individus contrôles indépendants d'origine arabe ou européenne, et je ne l'ai retrouvée chez aucun d'entre eux (figure 10). Curieusement, les haplotypes liés à la maladie dans les deux familles étaient totalement distincts, et ce même autour du gène *MRE11*. Bien que la mutation 630G>C soit très probablement le résultat d'un effet fondateur en Arabie Saoudite, l'étude des haplotypes suggère que cet effet fondateur est très ancien.

Le tryptophane à la position 210 est un résidu fortement conservé dans la protéine Mre11. Il est resté invariable de la levure aux mammifères (Figure 2 de la publication 1). Son remplacement par la cystéine, ce petit acide aminé polaire, est susceptible d'affecter la structure et la fonction de la protéine. De plus ce résidu est situé entre les motifs III et IV du domaine nucléase, dans le domaine N-terminal de la protéine, une région où une autre mutation faux-sens (N117S) avait été identifiée chez des patients atteints d'ATLD [39].

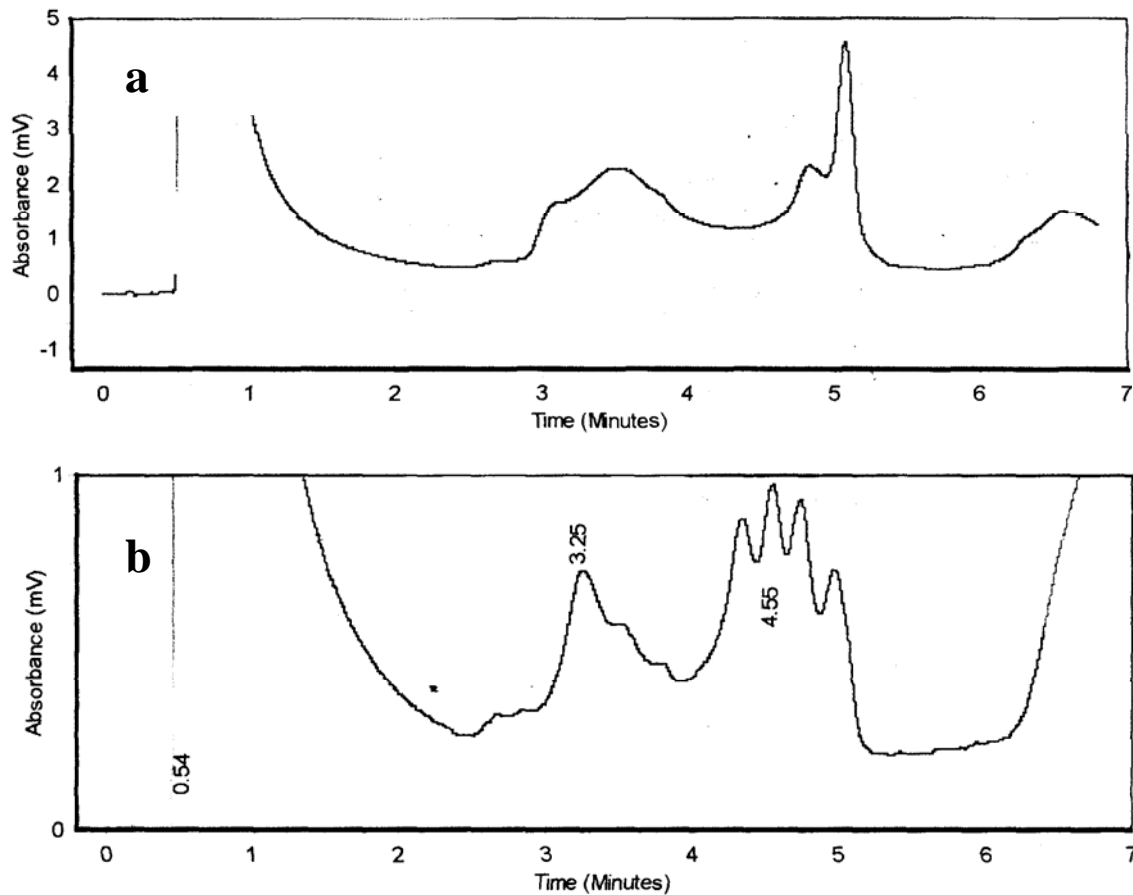


Figure 10 : Profil DHPLC (a) d'un sujet homozygote qui ne porte pas la mutation et (b) d'un des patients qui porte la mutation 630G > C.

Par séquençage direct de l'exon 7 du gène *MRE11*, la mutation 630G > C a été trouvée chez une troisième famille d'Arabie Saoudite présentant une ataxie associée à une apraxie oculaire. La ségrégation de cette mutation avec les enfants atteints (homozygote chez les trois patients et hétérozygote ou absente chez les quatre enfants sains) donne un LOD score de 2.9 en faveur de la liaison de cette mutation avec l'ataxie.

Toutes ces données suggèrent fortement que la variation W210C est la mutation responsable du tableau d'ATLD pour ces trois familles.

L'ensemble des données cliniques des 10 patients des trois familles a permis de préciser le tableau de cette entité rare et notamment la présence d'une apraxie oculomotrice très marquée et l'absence de prédisposition aux cancers. Une collaboration avec l'équipe du Dr. Janet Hall de l'agence internationale pour la recherche sur le cancer de Lyon a permis une étude fonctionnelle des conséquences de la mutation W210C dans les lignées de cellules fibroblastiques des patients. Cette étude a montré que cette mutation entraîne une perte partielle de la fonction de la protéine MRE11 en dépit d'une élévation de sa concentration

intracellulaire, vraisemblablement par un mécanisme de feed-back négatif, alors que les autres mutations ATLD précédemment décrites sont liées à une diminution de la protéine MRE11. Ce résultat indique qu'il n'est pas possible de dépister les patients ATLD par un dosage de Mre11 sur western blot, ce qui ne facilitera pas le dépistage de cette forme très rare d'ataxie.

E. Ataxie récessive associée à une épilepsie

(M Gribaa, M Salih, M Anheim, C Lagier-Tourenne, D H'mida, A Mohamed, S Elmalik, M Kabiraj, M Al-Rayess, M Almubarak, H Goebel, M Koenig; en préparation).

La troisième famille que j'ai étudiée est une grande famille (famille H) consanguine d'Arabie Saoudite comprenant 4 enfants atteints (âgés de 4 à 13 ans) et 3 sains.

Les quatre enfants atteints présentent un tableau clinique semblable. Le début est caractérisé par une épilepsie qui a commencé entre 9 et 12 mois. Elle est de type tonico-clonique généralisée pour les patients II1, II3 et II4 et partielle complexe pour II2. L'épilepsie n'a été contrôlée que chez le patient II3 par du phénobarbital, chez les 3 autres elle est restée persistante même après un double traitement fait de phénobarbital et de valproate. L'ataxie a été notée vers l'âge de deux à trois ans quand les enfants ont commencé à marcher. L'ataxie des membres est modérée mais la dysarthrie est importante pour les patients II1, II2 et II4 et modérée pour le patient II3. Les 4 patients présentent un retard psychomoteur à l'origine d'un retard scolaire. Les réflexes ostéo-tendineux sont diminués aux membres inférieurs et supérieurs. L'examen ophtalmologique a révélé un nystagmus sans apraxie. Aucun autre signe neurologique n'a été trouvé à part une réponse indifférente au réflexe cutané plantaire et une incontinence sphinctérienne pour le patient II4 jusqu'à l'âge de 10 ans. Les examens biologiques de routine et en particulier l'alpha-foetoprotéine, l'antigène carcino-embryonnaire, le cholestérol, les immunoglobulines sériques et l'albumine sont normaux. L'électroencéphalographie (EEG) était normale pour les patients II1 et II4 à l'âge 18 mois et 4 ans respectivement, sans être contrôlé plus tard. Le patient II2 a montré à 13 ans des décharges généralisées d'ondes et de pointes à 3 hertz avant, pendant et après les épreuves d'hyperventilation et de stimulation photonique intermittente. Le patient II3 a montré des paroxysmes occipitaux de 3-4 hertz, suggérant une épilepsie occipitale bénigne (figure 2 de la publication 2). L'imagerie par résonance magnétique (IRM) du cerveau a été faite seulement pour les patients II3 et II4 et a montré une hypoplasie cérébelleuse modérée du vermis et un signal anormal dans les zones terminales de myélinisation du lobe occipital (figure 3 de la publication 2). La biopsie musculaire du patient II3 a montré une variation modérée dans la

taille des fibres musculaires avec une vacuolisation dans quelques fibres, apparemment du système sarcotubulaire (figure 4 de la publication 2).

L'analyse à haute densité des régions sélectionnées à partir des données du CNG m'a permis d'identifier deux régions d'homozygotie partagées par les 4 enfants atteints :

- La première région est située sur le chromosome 3. Elle fait 28 Mb entre les 2 marqueurs flanquant D3S1582 et D3S3633. L'étude par d'autres marqueurs de la région a confirmé cette région d'homozygotie. Les 2 sœurs et le frère sains ont été prélevés à notre demande. L'analyse de leur ADN m'a permis d'écarter ce locus. En effet, la fille saine 4422 partage le même haplotype homozygote que ses frères et sœurs atteints. De plus le sujet atteint 3396 montre une recombinaison centromérique qui exclut le marqueur D3S1582 alors que le sujet sain 4422 est encore homozygote pour ce marqueur (figure 11).

- La deuxième région est située sur le chromosome 16. Comme pour le chromosome 3, l'analyse des données du CNG a montré que tous les enfants atteints sont homozygotes identiques pour au moins 2 marqueurs successifs : D16S515 et D16S516. L'analyse par d'autres marqueurs de la même région a confirmé cette région d'homozygotie. A l'inverse de ce que nous avons trouvé pour le chromosome 3, l'étude des 3 enfants sains montre une coségrégation de la région du chromosome 16 avec la maladie puisque aucun d'entre eux n'est homozygote ou identique aux enfants atteints (figure 1 de la publication 2).

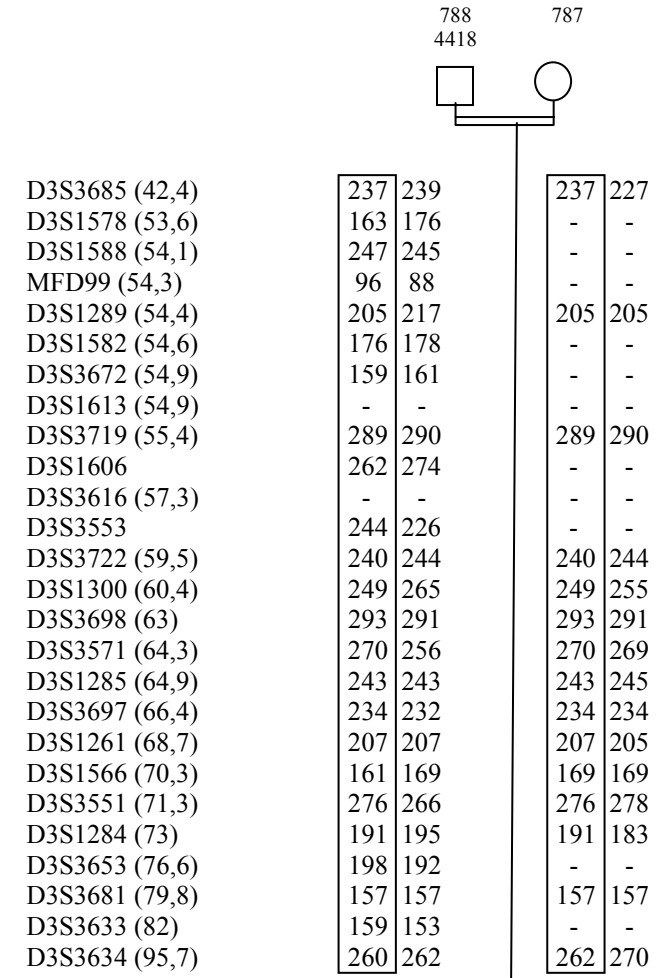
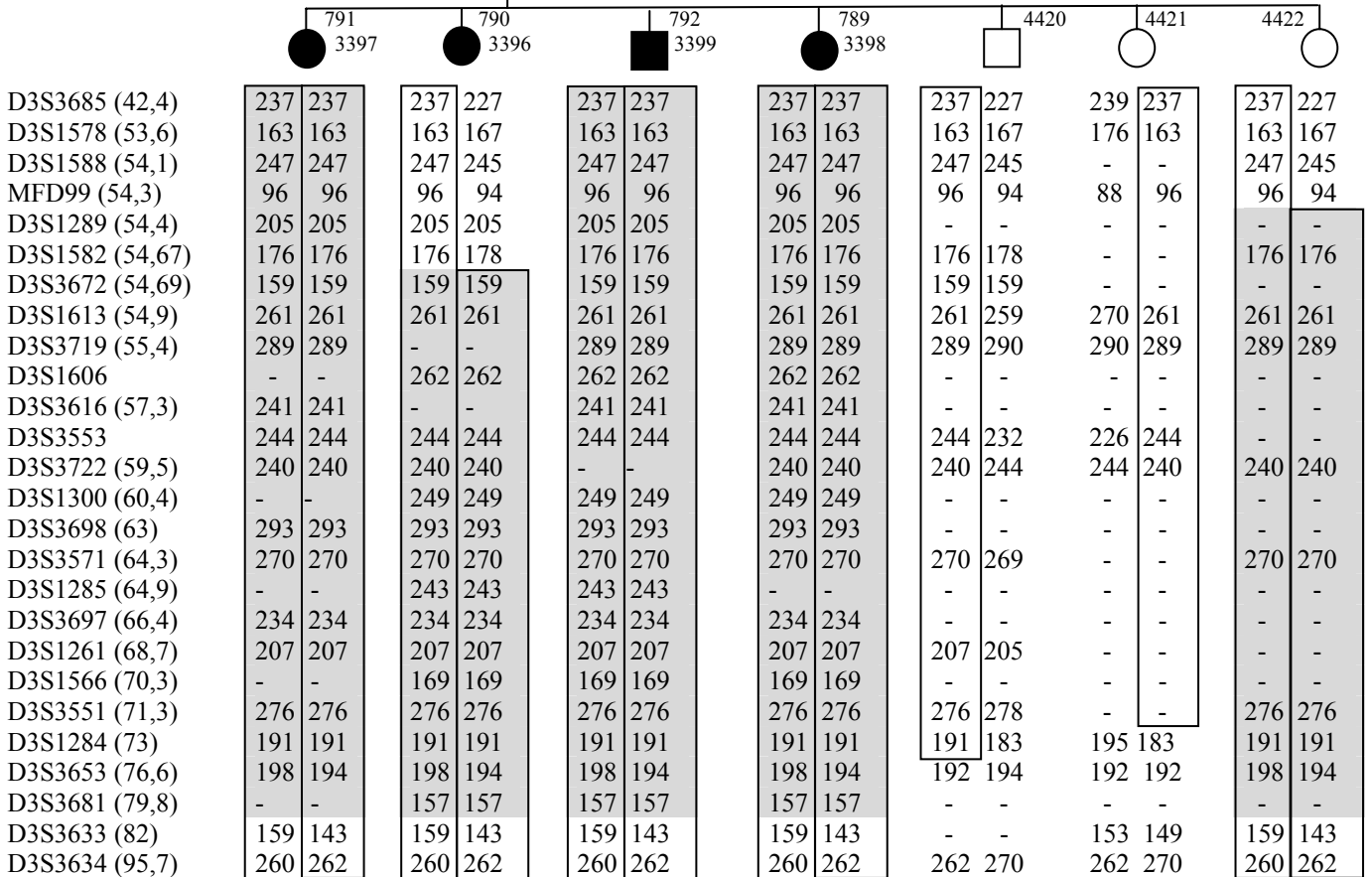


Figure 11 : Analyse de la liaison de la famille H. au chromosome 3. Les marqueurs sont indiqués du côté gauche et sont organisés de haut en bas du côté centromérique au côté télomérique. Pour chaque marqueur, la position sur le génome est indiquée entre parenthèses en Mégabases. Les haplotypes parentaux liés à la maladie sont encadrés. La région d'homozygotie par descendance est grisée



En conclusion, la région du chromosome 16q21-23 est la seule région compatible avec une ségrégation de la maladie de la famille H. Le LOD score en faveur de la liaison est de 3,3 et l'on peut donc considérer que la liaison de la maladie au locus 16q21-23 est démontrée. Ceci nous permet de tester une coségrégation au même locus pour des familles plus petites. Le fait de ne pas faire de tour du génome entier permet de considérer un LOD score plus faible comme suffisant pour démontrer ou suggérer une liaison à ce locus, car la correction statistique pour les tests multiples est moindre. Dans le but de tester la variabilité clinique éventuelle associée aux mutations de ce locus et afin de réduire la taille de l'intervalle critique, j'ai lancé l'étude d'autres familles consanguines ayant plus d'un enfant atteint et présentant une ataxie associée à d'autres signes cliniques. Ainsi 16 familles algériennes et 6 familles d'Arabie Saoudite ont été analysées utilisant les mêmes marqueurs du chromosome 16q21-23.

Une seule famille s'est avérée liée à ce locus. Il s'agit de la famille A. originaire d'Algérie. Elle est consanguine au premier degré et présente trois enfants ataxiques (1505, 1506 et 1507), trois enfants sains et un enfant atteint d'un syndrome de Down (1508). L'étude moléculaire a révélé une région d'homozygotie commune aux trois enfants ataxiques et distincte chez le seul enfant sain disponible pour l'analyse. Cette région est située entre les marqueurs D16S503 et D16S511 et couvre un intervalle de 18,1 Mb (figure 12). Le Lod score de la liaison de cette famille au locus 16q21-23 est de 2,5. Il n'est toutefois pas possible d'exclure une liaison à un autre locus chez cette famille pour laquelle un tour entier du génome n'a pas été effectué.

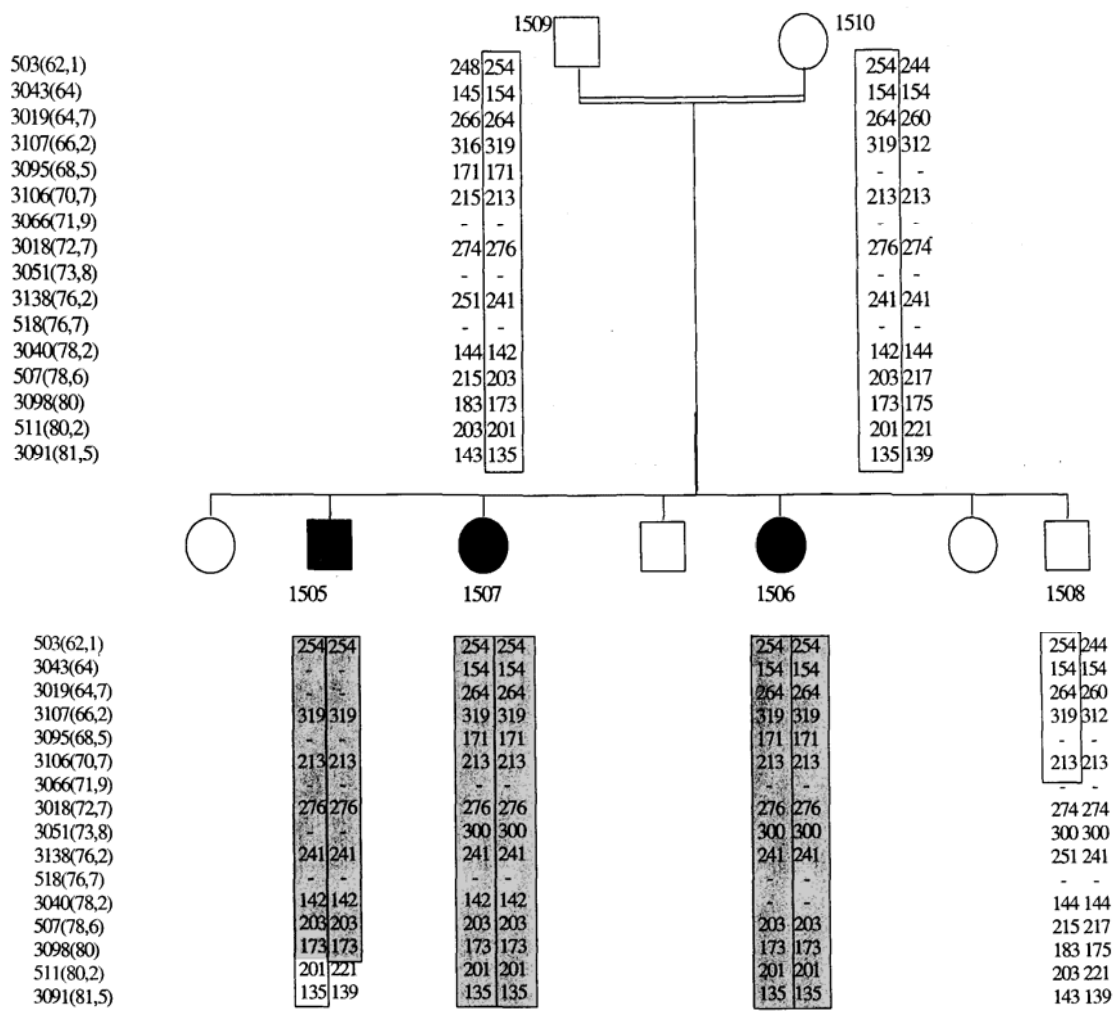


Figure 12 : Etude de liaison de la famille A. au chromosome 16
 Les enfants atteints 1505, 1506 et 1507 sont homozygotes pour 12 marqueurs consécutifs

Le tableau clinique des patients de la famille A est très homogène. Il est dominé par un retard de la marche devenue possible uniquement à un âge variant de 3 à 4 ans. Le syndrome cérébelleux associe une ataxie responsable d'une instabilité à la marche et une dysmétrie des membres supérieurs. Une neuropathie sensitivo-motrice des membres inférieurs à l'origine d'une abolition des réflexes ostéo-tendineux achilléens et des ulcérations des pieds est également présente. Une étude électromyographique et une biopsie nerveuse ont confirmé le caractère axonal de cette neuropathie. Les individus 1505 et 1506 présentent également un retard mental. En raison du syndrome cérébelleux sévère, les enfants 1507 et 1506 ont été confinés en fauteuil roulant à partir de 30 ans et de 10 ans respectivement. Les patients n'ont pas d'épilepsie.

L'étude des multiples gènes situés dans le locus 16q21-23 a révélé que le gène *GAN1* qui code pour la gigaxonine responsable de la neuropathie à axones géants était situé dans cet intervalle [91]. Or le tableau clinique présenté par les sujets atteints de la famille A. est compatible avec celui de la neuropathie à axones géants. Ainsi, avec la collaboration du Dr. Mathieu Anheim qui a effectué son stage de DEA dans notre laboratoire, nous avons procédé au séquençage des 11 exons du gène *GAN1* chez les individus 1506, 1507, 1509 et 1510 de la famille A. ainsi que chez les sujets 3397 et 4418 de la famille H. Aucune mutation n'a été décelée chez l'ensemble de ces patients ce qui permet d'exclure le diagnostic de neuropathie à axones géants pour les familles A. et H.

Nous ne pouvons pas décider pour l'instant si la famille A présente une forme mineure de la maladie présente dans la famille H ou si l'ataxie dans ces deux familles est due à des mutations dans deux gènes différents. Dans le cadre de cette dernière hypothèse, seule la liaison de la famille H au locus 16q21-23 reste établie.

L'association ataxie, épilepsie et retard mental a été très souvent trouvée en relation avec des gènes directement ou indirectement impliqués dans le fonctionnement mitochondrial. Il en est de même pour un certain nombre d'ataxies associées à une neuropathie sensitive périphérique. Ainsi, en regardant les 183 gènes situés dans notre région d'intérêt, 5 codent pour une protéine mitochondriale. Ce sont :

- la thymidine kinase 2
- Le cytochrome b5 (membrane externe de la mitochondrie)

- la protéine TAT
- la dihydroorotate dehydrogenase isoform 1
- la glycine cleavage system protein H (aminomethyl)

Ces gènes représentent des candidats sérieux pour la recherche de mutations responsables de notre forme particulière d'ataxie avec épilepsie.

En 2005, le gène *GPR56* a été pour la première fois incriminé dans un syndrome particulier comprenant un syndrome cérébelleux avec une ataxie associée à un retard mental, une épilepsie, un syndrome pyramidal, un strabisme et des polymicrogyries frontopariétales bilatérales à l'IRM [92]. Ce tableau clinique ressemble fortement à celui de notre famille H sauf que nos patients ne présentent pas de polymicrogyrie évidente. Le gène *GPR56* se trouve sur le chromosome 16 au niveau du locus 16q12-21. Il est situé en dehors de notre région critique du côté centromérique. De plus l'étude par mes collègues M. Anheim et D. H'mida de marqueurs entourant ce gène pour la famille H. a révélé l'absence d'homozygotie par descendance à leur niveau excluant définitivement ce gène de notre étude.

DISCUSSION

Le clonage positionnel permet d'isoler un gène sans connaître la protéine pour laquelle il code [93]. Cette approche est également appelée "génétique inverse" par opposition à l'approche par la génétique moléculaire classique qui identifie au préalable le défaut biochimique. Le clonage positionnel fait intervenir deux étapes: la localisation du locus morbide par cartographie génétique et la recherche de gènes candidats dans l'intervalle défini par la cartographie.

La cartographie génétique permet d'ordonner des marqueurs polymorphes sur les chromosomes humains en se basant sur les événements de recombinaison [94, 95]. Plus deux loci sont éloignés sur un même chromosome, plus la probabilité de recombinaison méiotique entre ceux-ci est importante. Les microsatellites ont été les marqueurs génétiques les plus utilisés pour la construction de carte génétique. Il s'agit de répétitions en tandem de petits motifs (1 à 5 nucléotides) hautement représentées dans le génome des eucaryotes [96]. De nos jours, et avec l'achèvement du projet de séquençage du génome humain, les SNP (Single Nucleotide Polymorphism) ont pris le devant et constituent un moyen plus rapide et plus efficace pour les études de liaison génétique.

Les études de liaison génétique permettent de lier un gène morbide à une région génomique donnée en montrant une ségrégation de la maladie avec certains allèles des marqueurs de cette région pour une famille présentant plusieurs individus atteints. Ceci s'explique par une localisation du gène muté à proximité de ces marqueurs empêchant toute recombinaison et entraînant une transmission en bloc de toute la région.

La cartographie par homozygotie est une variante de la technique de liaison génétique. Ainsi, un enfant issu de mariage consanguin et atteint d'une maladie génétique récessive serait homozygote par descendance pour une région de plusieurs cM contenant le locus de la maladie [88]. La recherche d'une région dont l'homozygotie par descendance est conservée chez différents patients, constitue une stratégie efficace pour l'identification de gènes de maladies récessives.

Cette approche a déjà permis d'identifier un grand nombre de nouveaux gènes de maladies qui n'auraient pu être identifiées par d'autres techniques, car aucune piste physiopathologique n'était disponible pour permettre l'utilisation d'approche plus directe. Ainsi, dans notre laboratoire, au moins 5 gènes, dont les gènes de l'ataxie de Friedrich, de la neuropathie à

axones géants, des ataxies avec apraxie oculomotrice I et II et de l'ataxie avec déficit en vitamine E, ont été identifiés par cette stratégie et un seul, le gène de l'ataxie avec déficit en vitamine E, aurait pu être identifié par clonage fonctionnel [91, 97-100].

C'est pour cela que j'ai choisi une approche par cartographie par homozygotie pour la recherche de gènes responsables de nouvelles formes d'ataxies autosomiques récessives en me basant sur l'étude de grandes familles consanguines dont plusieurs de leurs membres sont atteints.

I- Réduction de la taille du locus 6p21-23

Les ataxies spinocérébelleuses héréditaires constituent un groupe de maladies neurologiques dégénératives dont la complexité clinique et génétique commence tout récemment à s'éclaircir. Le locus 6p21-23 correspond à une ataxie autosomique récessive de début précoce associée à une atteinte visuelle et à une dégénérescence cochléaire (syndrome de Van Bogaert et Martin) [6].

En recensant l'ensemble des familles que nous avons pu obtenir de plusieurs centres de neurologie et de neuropédiatrie et essentiellement d'Algérie et d'Arabie Saoudite, nous nous sommes rendu compte de la rareté de celles qui présentent en plus de l'ataxie, une atteinte rétinienne (à l'origine d'un trouble visuel) ou cochléaire (à l'origine d'un trouble auditif) ou les 2 à la fois. Cette rareté pourrait être expliquée par l'importance du gène en cause qui pourrait être un gène essentiel. Il est également possible que les mutations qui touchent ce gène soient hypomorphes n'entraînant pas une absence totale de la protéine, comme c'est le cas pour les syndromes ATLD ou NBS, qui sont extrêmement rares pour cette raison.

L'étude d'une série de grandes familles ataxiques dont le tableau clinique associe ou non une atteinte auditive et/ou rétinienne n'a permis de retenir que 2 d'entre elles dont une a été écartée par la suite par absence de mutation dans tous les gènes candidats séquencés.

Ainsi la seule famille probablement liée au 6p22 (famille C) présente un tableau clinique semblable à celui de la famille Arabo-Israélienne et comporte essentiellement une atteinte rétinienne précoce. Ceci permet de dire que l'association trouble visuel et ataxie est un critère clinique important pour le syndrome de Van Bogaert et Martin. Malheureusement, en raison

du décès prématuré de la soeur la plus âgée, il est difficile de se prononcer sur la surdité qui peut aussi être un critère obligatoire mais de survenue tardive.

Les autres familles qui présentent une ataxie associée à un trouble visuel ou auditif et qui ne sont pas liées au locus du 6p22, témoignent d'une hétérogénéité génétique évidente et devront faire l'objet d'un tour complet du génome humain à la recherche d'autres loci pour lesquels elles seraient liées. Cette approche est actuellement possible pour les petites familles consanguines et est en cours dans notre laboratoire en utilisant le polymorphisme des SNPs avec la technique des puces de génotypage.

En raison de l'impossibilité de réduire encore plus la région d'intérêt par manque d'autres familles liées à ce locus, je me suis lancé dans le séquençage des gènes qu'il contient. J'ai commencé par les gènes mitochondriaux puisque cette trilogie : ataxie + atteinte rétinienne + atteinte auditive a été souvent rapportée dans les syndromes par mutation de gènes mitochondriaux [101]. Un bon candidat dans la région du 6p22 est le gène MRS2L. Son séquençage a révélé quelques polymorphismes mais pas de mutations. Ainsi je me suis attaqué, avec l'aide des Dr. Clotilde Lagier-Tourenne et Mathieu Anheim à l'analyse des 30 autres gènes mais sans succès ; aucune mutation tronquante n'a pu être décelée. De plus aucun gène ne portait une mutation faux-sens dans chacune des trois familles liées, ce qui aurait pu être compatible avec l'hypothèse de mutations hypomorphes exclusives.

Ceci peut être expliqué par 2 hypothèses :

- La zone d'intérêt est plus grande et le gène en cause est situé ailleurs. Ceci implique que la famille J1 n'est pas liée à ce locus et ne peut pas être utilisée pour réduire l'intervalle. Ainsi, le locus SCABD est défini actuellement par un intervalle de 13 Mb avec un côté centromérique de 10 Mb non encore exploré.

- Les mutations en cause sont effectivement localisées dans un des gènes que j'ai déjà séquencé mais ailleurs que les exons et les parties introniques flanquantes. Ainsi, ces mutations pourraient se situer dans le promoteur ou en plein milieu des introns créant un nouveau site d'épissage ou perturbant un site enhancer ou silencer d'épissage [102-105]. Ceci pourrait être vérifié par l'étude de l'ARNm transcrit de ces gènes dont l'un aurait une taille différente de la taille normale.

II- Identification de 3 nouvelles familles atteintes d'ATLD et présentant la même nouvelle mutation au niveau du gène *MRE11*

L'ATLD est une maladie très rare, avec seulement six patients décrits précédemment, quatre au Royaume Uni et deux en Italie. La présentation clinique de ces patients est semblable à celle de l'ataxie télangiectasie sur le plan neurologique.

Deux gènes distincts, codant pour des protéines impliquées dans une même voie, sont responsables des deux désordres : *ATM* pour l'AT et *MRE11* pour ATLD.

Parmi les six patients ATLD décrits précédemment, deux portent une mutation non-sens homozygote dans le gène *MRE11*, entraînant l'expression d'une protéine tronquée dans sa partie C terminale avec absence des 76 derniers acides aminés. Les quatre autres patients sont hétérozygotes composites, avec au moins une mutation faux-sens permettant l'expression de la totalité de la protéine Mre11 et montrant un phénotype moins sévère [8, 39, 43].

Les nouveaux patients atteints d'ATLD que j'ai identifié dans ce travail, appartiennent à trois familles Arabes Saoudiennes distinctes et portent une mutation homozygote dans le gène *MRE11* (630G >C, W210C). Ces patients présentent une ataxie à début précoce et lentement progressive associée à une apraxie oculomotrice. Ils représentent la plus grande série de patients ATLD identifiés jusqu'à maintenant, nous permettant de mieux préciser le tableau clinique de cette maladie. L'âge de début est presque semblable à celui de l'AT, mais la progression de la maladie est plus lente.

Il est important de signaler que plusieurs éléments clinico-biologiques sont absents dans l'ATLD par rapport à l'AT. Il s'agit essentiellement des télangiectasies, du déficit immunitaire, des niveaux élevés d'AFP, et des niveaux réduits d'immunoglobuline (tableau III).

Les observations cliniques de nos patients, ainsi que celles des cas précédemment rapportés, montrent que l'ATLD n'est associée ni à des infections pulmonaires récurrentes puisqu'il n'y a pas de déficit immunitaire, ni à la susceptibilité aux tumeurs lymphoïdes ou des carcinomes épithéliomateux, ce qui est important pour l'évaluation du pronostic. En effet, dans le cas d'AT l'atteinte des voies respiratoires est fréquente et favorisée par l'encombrement bronchique, l'expectoration étant plus difficile en raison du déficit neurologique [90]. La prédisposition aux cancers est importante puisque avant l'âge de 12 ans, 10% des enfants porteurs de la maladie ont déjà développé une néoplasie. Le plus souvent, il s'agit

d'hémopathies lymphoïdes malignes avec un phénotype cellulaire T (leucémies aiguës lymphoblastoïdes, lymphomes) [106]. Après l'âge de 15 ans, l'incidence de tumeurs épithéliales (estomac, foie, utérus, ovaire et tissu mammaire) augmente [107]. L'hypersensibilité aux radiations ionisantes expose ces enfants à des toxicités thérapeutiques parfois mortelles et rend la conduite du traitement délicate [108]. La chimiothérapie est difficile à appliquer car, outre l'hypersensibilité des cellules à certains produits, l'hypoplasie médullaire induite par le traitement augmente les risques infectieux liés au déficit immunitaire [109].

Mre11 fait partie du complexe MRN comprenant également *Nbs1* et *Rad50*. Ainsi, il est étonnant que les mutations de *MRE11* provoquent un syndrome qui ressemble plus à l'AT qu'au syndrome Nijmegen breakage (NBS) secondaire à des mutations du gène *NBS1*. En effet, en considérant l'étude clinique des 6 patients atteints d'ATLD décrits précédemment, on remarque que NBS et ATLD sont tout à fait distincts bien qu'il y ait quelques similitudes. NBS est caractérisé par une microcéphalie, un retard de croissance, un déficit immunitaire et une prédisposition aux tumeurs (tableau III) [110]. Cette différence s'estompe avec la description de nos patients puisque quatre sur huit d'entre eux présentent une microcéphalie. Ceci rapproche l'ATLD de NBS et démontre que la distinction antérieure est potentiellement due au nombre insuffisant de cas décrits, et ne reflète pas l'importance de la variabilité allélique liée à ce syndrome.

Néanmoins, les trois désordres, ATLD, NBS et AT, sont associés à un plus grand niveau de translocations chromosomiques impliquant les chromosomes 7 et 14 et une hypersensibilité aux rayonnements ionisants au niveau cellulaire avec un taux élevé de cassures chromosomiques et une survie cellulaire diminuée. Ces derniers éléments communs rappellent que ces 3 maladies sont bien causées par l'atteinte de 3 protéines impliquées dans les mêmes voies de signalisation [38, 39, 111].

Par ailleurs, et en plus de la microcéphalie, nos patients n'ont pas de translocations chromosomiques au niveau de leur caryotype. On peut se demander si ces différences entre nos patients et ceux préalablement décrits sont spécifiques à la mutation W210C ou reflètent un large spectre clinique et biologique de l'ATLD. La découverte d'autres mutations de ce gène devrait permettre de mettre en place une corrélation génotype/phénotype dépendant du siège de la mutation dans l'un des domaines fonctionnels de ce gène.

Malgré le nombre de plus en plus important de patients atteints d'ATLD rapporté actuellement (16 au total), il n'est pas possible de trancher définitivement sur la prédisposition réelle de ce syndrome aux cancers. En effet, la plus part des patients sont relativement jeunes et l'évolution peut s'avérer plus défavorable chez ceux-ci que chez les patients plus âgés. Cependant, Il est important de noter que les souris transgéniques portant la mutation homozygote R633Stop n'ont développé aucun cancer [112].

Tableau III : Comparaison des signes cliniques entre l'ataxie télangiectasie (AT), l'ataxia-télangiectasia-like disorder (ATLD) (y compris notre série) et le syndrome Nijmegen breakage (NBS) (adapté d'après Taylor et al 2004) [113].

Éléments cliniques	AT	ATLD	NBS
Ataxie	+	+	—
Télangiectasie	+	—	—
Dysarthrie	+	+	—
Mouvements anormaux des yeux	+	+	—
Niveau élevé de l'AFP	+	—	—
Niveau réduit d'immunoglobulines	+	—	+
Infections pulmonaires	+	—	+
Translocations chromosomiques 7,14	+	+	+
Tumeurs lymphoïdes	+	—	+
autre types de tumeurs	+	—	+
Anomalies de la peau	+	—	+
Microcéphalie	—	+	+
Intelligence normale	+	+	+ / —
Malformations congénitales	+	—	+

+ : présence, — : absence.

Les conséquences cellulaires du changement de cet acide aminé à la position 210, située dans le domaine nucléase de la protéine Mre11, a été analysé par M. Fernet (Lyon) dans des cultures de fibroblaste établies à partir de deux individus atteints provenant des familles 1 et 2 (lignées FD107 et FD108). Cette étude a permis de déterminer les répercussions de la mutation W210C sur le complexe MRN (Mre11, Nbs1 et Rad50) et la réponse cellulaire au rayonnement ionisant.

Ces 2 lignées (FD107 et FD108) ont surtout montré :

- des niveaux plus élevés des protéines Mre11 et Rad50 par rapport à ceux des cellules normales. Ceci peut être dû à une augmentation de la $\frac{1}{2}$ vie de ces 2 protéines par altération de leurs voies de dégradation.

- une absence de formation de foyers de réparation de l'ADN après exposition à 8 Gy de radiations ionisantes, ce qui confirme l'altération fonctionnelle de la protéine Mre11 dans ces cellules et affirme encore une fois l'importance de Mre11 dans la réparation double brin de l'ADN.
- une interaction possible de cette protéine mutée avec Rad50 mais pas avec Nbs1 : cette mutation toucherait le domaine d'interaction de Mre11 avec Nbs1.
- un défaut de phosphorylation d'ATM avec absence d'activation de sa fonction kinase.

Cette étude a montré que cette mutation entraîne une perte partielle de la fonction de la protéine Mre11 en dépit d'une élévation de sa concentration intracellulaire, alors que les autres mutations ATLD sont liées à une diminution de la protéine Mre11. Ce résultat indique qu'il n'est pas possible de repérer les patients ATLD par un dosage de Mre11 sur western blot, ce qui ne facilitera pas le dépistage de cette forme très rare d'ataxie.

III- Identification d'une nouvelle forme clinico-biologique d'ataxie associée à une épilepsie et étude de sa liaison génétique

Les épilepsies myocloniques progressives (PME pour Progressive Myoclonic Epilepsy) et les ataxies myocloniques progressives (PMA pour progressive myoclonic ataxia) partagent les mêmes causes. Cependant, les PMA ont toujours été considérées comme variants cliniques des PME et n'ont jamais eu une caractérisation précise et une classification propre. Ainsi, la majorité des patients atteints de PME peuvent avoir un diagnostic spécifique identifié après un certain nombre d'années d'évolution, par contre ceci peut être plus difficile chez les patients atteints de PMA.

Cinq causes expliquent la plupart des PME/PMA : La maladie d'Unverricht-Lundborg (UL), l'épilepsie myoclonique avec des fibres rouges en loque (MERRF), la maladie de Lafora, les lipofuscinoses ceroides neuronales et les sialidoses. D'un autre côté, des formes particulières d'épilepsies associées à des ataxies de l'adolescent ou de l'adulte ont été identifiées dans le cadre du syndrome SANDO et sont dues à des mutations dans le gène codant pour la polymérase Gamma mitochondriale.

Chacune de ces pathologies présente un mode de transmission et un tableau clinique, biologique, radiologique et anatomopathologique particulier permettant de le distinguer des

autres souvent sans ambiguïté. Du point de vue moléculaire, ces pathologies sont causées par l'atteinte de gènes dont la plus part sont aujourd'hui identifiés et dont l'analyse a permis, pour certains d'entre eux, de comprendre leur physiopathologie.

La famille H que j'ai étudiée, est une grande famille consanguine d'Arabie Saoudite comprenant 4 enfants atteints (âgés de 4 à 13 ans) et 3 sains. Ces enfants présentent une épilepsie précoce associée à une ataxie, un nystagmus latéral et un retard psychomoteur. L'IRM montre de légères anomalies du cervelet et un signal anormal dans les zones terminales de myélinisation du lobe occipital. La biopsie musculaire d'un des patients montre dans certaines fibres musculaires une vacuolisation touchant apparemment le système sarcotubulaire.

Ce tableau clinique présente quelques similitudes avec les autres PME mais ne concorde avec aucune d'entre elles (tableau IV). Ceci a été confirmé par l'étude génétique de cette famille qui m'a permis de la lier au locus 16q21-q23, situé entre les marqueurs D16S516 et D16S515 et définissant un intervalle de 19 Mb.

Aucun gène d'épilepsie myoclonique connu n'est présent dans cet intervalle.

La biopsie musculaire du patient II3 a montré une vacuolisation du système sarcotubulaire. La biopsie musculaire des autres enfants atteints de cette famille n'a pas pu être obtenue. Il n'est donc pas possible de conclure si cette vacuolisation est caractéristique de la maladie qui affecte cette famille, comme le sont les corps de Lafora, les fibres rouges en loque et les lipopigments autofluorescents dans la maladie de Lafora, MERRF et CLN, respectivement.

Les caractéristiques phénotypiques des patients de cette famille, telles que l'âge de début, l'EEG, la biopsie musculaire et l'IRM permettent de définir une nouvelle entité clinicobiologique. L'identification d'autres familles avec un phénotype semblable et liées au même locus devrait nous permettre de raffiner la localisation du gène responsable et d'entamer la recherche de mutations dans les gènes candidats.

Tableau IV : Comparaison entre les principaux traits cliniques des syndromes d'épilepsie myoclonique progressive de l'enfant, de l'adolescent et de l'adulte avec ceux de nos patients (modifié d'après Delgado-Escueta A.V. et al.) [58].

Maladie (Localisation chromosomique)	Age de début (années)	Crises épileptiques à l'installation de la maladie	Signes d'atteinte neurologique					Neuropathologie	Distribution géographique	Age de décès
			Visuelle	Cérébelleuse	Voie pyramidale	Voie extrapyramidale	Démence			
Maladie d'Unverricht Lundborg (21q22.3)	6-15	Crises myocloniques incluant la face Photosensibilité élevée aggravée par la phénytoïne.	Non	Ataxie, Tremblement intentionnel, Dysarthrie aggravés par la phénytoïne.	Atteinte tardive	Rarement atteinte	Déclin cognitif progressif dans 15-20 ans	Changements vésiculaires des glandes sudoripares	Europe du Nord, USA, Canada, Pays méditerranéens 1/20000 naissances en Finlande.	50-60
Maladie de Lafora (80% en 6q24)	10-18	crises tonico- cloniques sensibles aux stimulations sensitives	Crises occipitales avec hallucinations visuelles	Atteinte tardive	fréquente	Rare	Régression scolaire rapidement progressive dans 25% des cas	inclusions cytoplasmiques PAS+ dans les biopsies cutanées, musculaire, hépatique et cérébrale.	Pays méditerranéens, Moyen orient, Afrique du nord, Inde, Pakistan.	20-25 (souvent 10 ans après l'installation de la maladie).
Lipofuscine cerioïde neuronale juvénile : maladie de Spielmeyer-Vogt (CLN3) (16p12)	4-10	Apparition des crises épileptiques 1-4 ans après installation de la maladie : myoclonies faciales, convulsions généralisées et absences. Sensibles aux stimuli	Perte de la vision centrale et conduit à la rétinite pigmentaire et la cécité	peu marquée	fréquente	fréquente	Rapidement progressive	Vacuoles lymphocytaires, inclusions curvilignes à la biopsie cutanée.	Pays Scandinaves, 1% des suédois ont la CLN3.	Adolescence tardive (20 ans)

Lipofuscinose céroïde neuronale de l'adulte (Maladie de Kufs)	11-50	Crises épileptiques d'apparition tardive de type grand mal sensibles aux stimulations sensitives	Non	fréquente	fréquente	Athétose et dyskinésie fréquentes.	Lentement progressive	Granules osmiophiles à la biopsie cérébrale. Dépôts de lipofuscine à la biopsie hépatique	Ubiquitaire	10 ans après l'installation de maladie
l'épilepsie myoclonique avec des fibres rouges en loque (MERRF)	3-65	Crises épileptiques généralisées ou partielles Photosensibles	Atrophie optique rare	possible	Dysarthrie, ataxie.	Non	Evolution progressive.	Fibres rouges en loque à la biopsie musculaire, Atteinte de la chaîne respiratoire mitochondriale par mutation A>Ghétéroplasmique à la position 8.344	Ubiquitaire	3-30 ans après l'installation de maladie
Sialidose Type I (20), Type II (10pter, q23 et 22)	8-15	Crises épileptiques généralisées Pas de photosensibilité.	Troubles visuels	Ataxie et Myoclonies faciales	Atteinte	Non atteinte	Présente.	Augmentation des oligosaccharides urinaires Déficit en neuraminidase au niveau des fibroblastes et des lymphocytes.	Fréquente en Italie	10-40 ans après l'installation de maladie
Nos patients (16q21-23)	(9 à 12 mois)	Tonico-clonique généralisées ou Partielles complexes	nystagmus	Ataxie 2 à 3 ans après le début. + Dysarthrie	Réponse indifférente au réflexe cutané plantaire	Non atteinte	Retard psychomoteur à l'origine d'un retard scolaire	Vacuolisation dans certaines fibres musculaires appartenant au système sarcotubulaire	Arabie Saoudite	Non connu

IV- Importance des données cliniques dans les études de liaison génétique

L'étude de la famille F, sur laquelle j'ai passé 6 mois de ma thèse, m'a fait comprendre l'importance des données cliniques pour chaque patient ainsi que les informations relatives à chaque membre d'une famille qu'il soit atteint ou non atteint et sa position exacte dans l'arbre généalogique. Ceci pour 2 raisons essentielles :

- Plusieurs atteints dans une même famille peuvent avoir des pathologies différentes mais avec parfois des points communs qui peuvent induire un diagnostic erroné. Seul un examen clinique bien établi et des examens complémentaires bien orientés et interprétés peuvent résoudre ce problème en écartant de l'étude le(les) enfant(s) qui présente(nt) un tableau clinique différent du tableau familial prédominant. Ceux-ci doivent alors être considérés comme « sains » dans l'étude de liaison et devront hériter, dans l'hypothèse d'une liaison génétique, d'un haplotype différent de celui des atteints.
- Certains enfants, ne présentant aucun signe clinique de la maladie, peuvent être considérés à tort comme « sains » parce qu'ils n'ont pas encore atteint l'âge de début habituel de cette maladie. Ces enfants peuvent, malheureusement, développer la maladie par la suite. De plus, même les enfants ayant atteint l'âge de début habituel de la maladie et qui n'ont encore développé aucun signe clinique, ne sont pas forcément « sains » au sens génétique du terme et peuvent développer la maladie tardivement, en tenant compte de l'hétérogénéité phénotypique associée des formes variables plus ou moins atténuées. Dans tous ces cas, ces enfants (mineurs ou majeurs) doivent être exclus préalablement de l'étude génétique, afin de ne pas être confronté à une situation de diagnostic présymptomatique qui serait contraire aux règles éthiques qui gouvernent ce type d'étude.

Par ailleurs, les études de liaison génétique basées sur les marqueurs microsatellites espacés de 10 Mb ou plus, présentent un certain nombre de pièges potentiels pour l'étude des familles consanguines. En effet, si la consanguinité est éloignée, des recombinaisons cumulées peuvent avoir lieu entre le gène responsable de la maladie et les marqueurs informatifs les plus proches utilisés, entraînant la méconnaissance de certaines régions d'homozygotie par descendance liées à la maladie. C'est ce piège qui nous a fait initialement méconnaître le locus EPM1 pour la famille F. Pour remédier à ce problème, il faut utiliser en première intention des cartes de marqueurs plus denses. Actuellement, la technique de génotypage par puces utilisant les SNPs, est en train de révolutionner ce domaine, étant donné la progression spectaculaire de la densité des SNP analysables par puce (passage de 10.000, puis 50.000,

250.000 et bientôt 1 million de SNP) et la diminution (un peu moins spectaculaire, quoique très intéressante) des coûts par individu analysé. Cette approche pourrait à terme devenir un outil intéressant pour le diagnostic de patients issus de familles consanguines.

MATERIEL ET METHODES

A- Génotypage :

1- Tour du génome entier au Centre National de Génotypage (CNG)

Un criblage du génome entier a été effectué au CNG en utilisant une série de marqueurs microsatellites développée et commercialisée par PE Applied Biosystems (ABI Linkage Mapping Set version 2, Medium density set 10, MD-10). Cette série comprend 400 marqueurs microsatellites sélectionnés sur la carte de liaison chez l'homme fournie par le Généthon, avec un intervalle moyen de 10 cM entre 2 marqueurs successifs, et un index d'hétérogénéité moyen des marqueurs de 75%. Un protocole de PCR-multiplex permet la co-amplification de 6 de ces marqueurs dans une seule réaction. Pour chaque couple d'amorces d'un marqueur microsatellite, une amorce est marquée avec l'un des trois colorants fluorescents (FAMTM, HEXTM, NEDTM) afin de regrouper les produits de PCR avant la séparation sur le séquenceur automatique. Un quatrième colorant fluorescent (ET-ROXTM 400, Amersham Biosciences) est utilisé comme marqueur de taille. Les produits de PCR sont réalisés avec 20ng d'ADN et le volume total du produit de PCR est de 10 µL. Les PCR sont effectuées avec le système GeneAmp PCR 9700 à 384 puits (Applied Biosystems). Les fragments de PCR obtenus sont mélangés et purifiés sur une plaque de 96 puits Multiscreen TM3 en utilisant du Sephadex G50. Les fragments marqués et purifiés sont séparés selon leur taille à l'aide d'un séquenceur à 96 capillaires Amersham Biosciences MegaBACE 1000 et il est ainsi possible d'en déduire le génotype de chaque individu pour chaque marqueur et donc les régions d'homozygotie partagées par ces individus.

2- Tour du génome entier dans notre laboratoire

Le tour du génome a été réalisé par le même kit utilisé au CNG.

Les produits d'amplification sont mélangés à un marqueur de taille (Genescan 400 Rox Size Standard d'Applied Biosystems). Le tout est dénaturé et migré soit sur le séquenceur ABI Prism 377 (migration verticale entre 2 plaques de verre) soit sur le séquenceur ABI Prism 3100 (migration dans des capillaires) (Applied Biosystems).

Au cours de leur migration, les fragments amplifiés et marqués par diverses molécules fluorescentes, vont traverser une fenêtre de lecture où ils seront excités par un LASER. Ces molécules vont émettre alors des longueurs d'ondes séparées par un système optique de prismes et captées par une caméra CCD.

L'existence de plusieurs molécules fluorescentes (fluorochromes) émettant dans des longueurs d'ondes différentes après excitation au LAZER, nous permet de migrer à la fois plus d'un microsatellite marqué chacun par un fluorochrome différent.

Les résultats de la migration seront analysés par le logiciel GeneScan Analysis (Applied Biosystems). La taille des fragments amplifiés est calculée par comparaison à la taille des fragments du marqueur de taille utilisé. Ensuite, l'interprétation se fait par le logiciel Genotyper (Applied Biosystems) qui permet la détermination des différents allèles du marqueur.

Une fois la liaison pour un locus donné est suspectée, des microsatellites CA/TG additionnels, de la région candidate, sont examinés.

3- Confirmation par l'étude d'autres marqueurs

a. Méthode radioactive

Au début de ma thèse j'ai étudié ces microsatellites par une méthode radioactive. Ainsi, avant l'amplification je réalisais un marquage radioactif d'une des amorces au p32. Durant la PCR, j'utilisais une température d'hybridation inférieure de 2° C au-dessous du Tm le plus bas des deux amorces. Les produits de PCR ont été séparés sur un gel de polyacrylamide de 6% dénaturant, et révélés par autoradiographie.

b. TP-PCR (Triple Primers PCR) fluorescente

Après j'ai étudié ces microsatellites par fluorescence sur un analyseur génétique (séquenceur). Devant le coût d'utilisation d'une amorce spécifique marquée, différente pour chaque microsatellite, une technique a été mise au point permettant d'utiliser la même amorce marquée dite « universelle » associée aux 2 amorces non fluorescentes spécifiques de chaque microsatellite: c'est ce qu'on appelle la TP-PCR (Triple Primers PCR) [114].

Cette technique utilise 3 amorces au lieu de 2 (figure 13) :

- Une amorce sens classique
- Une amorce antisens à laquelle on ajoute une queue de séquence universelle (qui n'est complémentaire à aucune région dans le génome humain)
- Une amorce universelle complémentaire uniquement à la queue de l'amorce antisens, dont la séquence est la suivante : 5' - TAC GCA TCC CAG TTT GAG ACG - 3'.

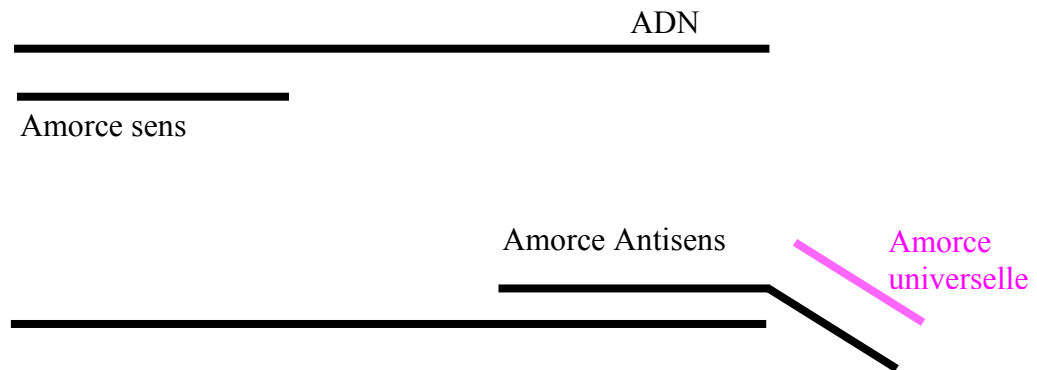


Figure 13 : Amplification d'un microsatellite à l'aide de trois amorces (TP-PCR):

- . Les amorces sens et antisens sont spécifiques du microsatellite à amplifier
- . L'amorce antisens possède une queue universelle complémentaire à l'amorce universelle fluorescente.

Lors de la réaction d'amplification, on utilise des quantités 10 fois supérieures de l'amorce sens et de l'amorce universelle par rapport à l'amorce antisens (avec queue). Ceci est à l'origine d'un épuisement rapide de la quantité de cette dernière amorce. Dans les cycles suivants, l'amorce universelle va prendre la relève en utilisant la queue de l'amorce antisens comme matrice et va assurer le reste de l'amplification. Comme cette amorce universelle présente une queue fluorescente, on obtient à la fin un fragment fluorescent dont la taille est supérieure de 21 pb par rapport à la taille prévu pour le microsatellite. Ces 21 pb correspondent à la taille de la queue universelle.

Les fragments amplifiés sont migrés sur les mêmes séquenceurs (ABI Prism 377 et 3100) et interprétés avec les mêmes logiciels.

4. Génotypage par des SNP utilisant des puces à oligonucléotides

La puce de génotypage de l'ADN dont les versions les plus récentes combinent plus de 500.000 marqueurs polymorphes de type SNP répartis de manière uniforme dans le génome humain, offre la possibilité de faire le tour complet du génome avec une très forte densité de marquage (distance physique médiane de 5,8 kb entre les SNP) et une analyse extrêmement

rapide en comparaison avec l'analyse des microsatellites. Elle ne nécessite que 250 ng d'ADN génomique par puce.

L'ADN est digéré par une enzyme de restriction et lié à des adaptateurs. Une amorce générique reconnaissant la séquence des adaptateurs est utilisée pour amplifier sélectivement les fragments de la PCR dans un certain intervalle de tailles. L'ADN amplifié est fragmenté, marqué et hybridé sur la puce (Affymetrix).

B- Séquençage :

La réaction de séquençage utilise la technique de Sanger. Il s'agit de bloquer de façon aléatoire, lors d'une réaction de PCR, l'ADN néo-synthétisé donnant des fragments de tailles différentes. Ce blocage est réalisé par les ddNTP (didésoxyriboNucléoside Tri-Phosphate).

Pratiquement, on réalise une réaction de PCR classique pour amplifier le fragment d'ADN qu'on veut séquencer. Ce fragment est alors purifié pour éliminer les amorces et les dNTPs non incorporés. Cette purification est réalisée par des colonnes ; les NucleoSpin® Extract. Ces colonnes contiennent une membrane de silice qui retient uniquement l'ADN.

Sur ce produit de purification on réalise la réaction de séquence. C'est une amplification asymétrique de l'amplicon déjà purifié avec une seule amorce et des 4 ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) dont chacun est marqué par un fluorochrome émettant une couleur différente lors de l'excitation par le LASER. Ainsi chacun de ces ddNTP va donner de façon aléatoire des fragments de tailles différentes et correspond aux 4 couleurs spécifiques.

La réaction de séquence est effectuée par le kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems).

Le produit de la PCR séquence est purifié par précipitation à l'éthanol. Le culot obtenu est repris dans la formamide, dénaturé à la température puis migré dans du POP 6 par un séquenceur capillaire (ABI Prism 3100).

Les résultats obtenus sont traités par le logiciel SeqScape v2.0 (Applied Biosystems).

C- Calcul du Lod Score

Les calculs du Lod Score ont été réalisés avec le logiciel MLINK de la collection FASTLINK. Il s'agit d'un calcul à deux points intégrant les boucles de consanguinité. L'homozygotie a été prise en compte en considérant que tout haplotype non recombinant est un locus à part. L'ordre des marqueurs et les distances physiques ont été obtenus à partir du

site Internet de l'UCSC (<http://genome.ucsc.edu>). Le Lod Score a été calculé en assumant que les familles étudiées ont des pathologies autosomiques récessives.

D- DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography)

La technique DHPLC détecte des mutations ou des variations de séquence par la mise en évidence des hétéroduplex. Les hétéroduplex sont formés par le ré-appariement après dénaturation de brins correspondant aux allèles normal et variant.

Ainsi, Les fragments amplifiés sont dénaturés et renaturés (réchauffement à 95°C pendant 2 minutes puis refroidissement lent à température ambiante) pour permettre la formation optimale d'hétéroduplex.

Les duplex obtenus sont analysés par DHPLC à l'aide de l'appareil Wave de Transgenomics. C'est un système automatisé permettant l'analyse de 96 échantillons à la fois. Il utilise les charges négatives des ions phosphate de l'ADN. Le Triéthylammonium Acétate (TEAA), molécule pont chargée positivement, va permettre de relier l'ADN négatif à la colonne de l'appareil elle-même négative.

L'adjonction d'Acétonitrile en concentration croissante réduit l'interaction du TEAA avec la colonne permettant sa libération. Cette libération dépend de la stabilité de l'ADN auquel elle est rattaché : un ADN dont les 2 brins sont complémentaires à 100 % sera plus stable et libéré tardivement par rapport à un ADN présentant un hétéroduplex. Ceci permet de montrer une différence de profil entre un fragment provenant d'un sujet homozygote d'un fragment provenant d'un sujet hétérozygote. Etant donné que la mutation que je cherche se trouve à l'état homozygote, et pour obtenir un hétéroduplex, j'ai dû mélanger le produit d'amplification des patients présentant cette mutation avec le produit d'amplification provenant d'un sujet qui ne la présente pas.

CONCLUSION

Dans notre beau domaine des sciences de la vie et de la santé, et comme le dit toujours mon directeur de thèse Mr. le Professeur Michel KOENIG, tous nos efforts ont pour objectif d'aider les patients et les familles objet de nos études :

- soit en leur proposant un diagnostic génétique correct leur permettant de mieux étiqueter leur maladie aboutissant à une prise en charge adéquate et un éventuel diagnostic prénatal pour les apparentés.
- soit en essayant de comprendre la physiopathologie de leur affection par l'étude des interactions moléculaires qui entrent en jeu dans leur pathogénie. Ceci nous permettrait de proposer des moyens thérapeutiques les malades ou améliorer la symptomatologie (traitements symptomatiques).

Mon travail de recherche de gènes responsables de nouvelles formes d'ataxies autosomiques récessives, représente un des maillons initiaux de la démarche vers la compréhension de ces pathologies. En effet, une fois le gène trouvé, l'étude de la comparer à des protéines connues et de préciser son rôle exact et ses interactions moléculaires. Des essais thérapeutiques pourront alors être initiés en utilisant des substrats de substitution comme la vitamine E dans l'a bêtalipoprotéïnémie et l'ataxie par déficit isolé en vitamine E ou des molécules situées dans les mêmes voies d'interaction et qui permettront soit de corriger l'erreur soit de diminuer les dégâts engendrés par celle-ci comme c'est le cas des antioxydants membranaires pour le traitement de l'ataxie de Friedreich.

Dans ce cadre, j'ai établi le diagnostic génétique pour 3 familles atteintes d'ATLD, une forme très rare d'ataxie récessive, en identifiant l'anomalie génétique responsable de leur pathologie, et j'ai assuré un grand pas vers l'identification de 2 gènes dont les mutations seraient à l'origine du syndrome SCABD et de la nouvelle forme d'ataxie associée à une épilepsie que nous venons d'individualiser.

PUBLICATIONS

PUBLICATIONS 1

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Identification and functional consequences of a novel *MRE11* mutation affecting 10 Saudi Arabian patients with the ataxia telangiectasia-like disorder

Marie Fernet, **Moez Gribaa**, Mustafa A.M. Salih, Mohamed Zein Seidahmed, Janet Hall et Michel Koenig

Human Molecular Genetics, 2005, Vol.14, Pages 307-318

Pages 307 à 318:

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : <http://hmg.oxfordjournals.org/cgi/content/full/14/2/307>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

PUBLICATIONS 2
(Manuscrit en préparation)

A new form of childhood onset, autosomal recessive spinocerebellar ataxia and epilepsy is localised at 16q21-q23.3

M Gribaa,^{1,10,12} M Salih,² M Anheim,^{1,10,11} C Lagier-Tourenne,^{1,10,11} D H'mida,^{1,10,12} N Drouot,^{1,10} A Mohamed,³ S Elmalik,⁴ M Kabiraj,⁵ M Al-Rayess,⁶ M Almubarak,⁷ C Bétard,⁸ H Goebel,⁹ M Koenig^{1,10,11}

1. Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Department of Molecular Pathology, CNRS/INSERM/Université Louis Pasteur, Illkirch, France.
2. Division of Pediatric Neurology, Department of Pediatrics, College of Medicine, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia.
3. Department of Pediatrics, King Fahad Hofuf Hospital, Saudi Arabia.
4. Department of Physiology, College of Medicine, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia.
5. Division of Clinical Neurophysiology, Department of Neuroscience, Armed Forces Hospital, Riyadh, Saudi Arabia.
6. Department of Pathology, College of Medicine, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia.
7. Department of Physiology, College of Medicine, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia.
8. Centre National de Génotypage, Evry, France.
9. Department of Neuropathology, Johannes Gutenberg-University Medical Center, Mainz, Germany.
10. Collège de France, chaire de génétique humaine, Illkirch, France.
11. Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France.
12. Service de Cytogénétique et de Biologie de la Reproduction. Hôpital Farhat Hached. Sousse – Tunisie.

To whom correspondence should be addressed : MK, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 1 rue Laurent Fries BP10142, 67404 Illkirch cedex, France. Tel : +33 3 8865 3399, fax : +33 3 8865 3246, e-mail : mkoenig@igbmc.u-strasbg.fr

Abstract

Childhood ataxias are a complex set of inherited disorders. Ataxias associated with generalized tonic-clonic (GTC) epilepsy are usually included with the progressive myoclonus epilepsies (PME). Five disease entities, Unverricht Lundborg disease, Lafora's disease, neuronal ceroid lipofuscinoses (NCLs), myoclonic epilepsy with ragged red fibers (MERRF) and sialidoses, account for the majority of PME cases. Two rare forms of ataxia plus epilepsy, sensory ataxic neuropathy, dysarthria and ophthalmoparesis (SANDO) and infantile onset spinocerebellar ataxia (IOSCA) were described recently and found to be caused by nuclearly encoded mitochondrial proteins. We report here a large consanguineous family from Saudi Arabia with four affected children presenting with generalized tonic-clonic (GTC) epilepsy, ataxia and mental retardation, but neither myoclonus nor mental deterioration. MRI and muscle biopsy of one patient revealed, respectively, posterior white matter hyperintensities, and vacuolisation of the sarcotubular system. We localized the defective gene by homozygosity mapping to a 19 Mb interval in 16q21-q23 between markers D16S3091 and D16S3050. Linkage studies in this region will allow to test for homogeneity of this novel ataxia-epilepsy entity.

Introduction

Autosomal recessive cerebellar ataxias are a heterogeneous group of rare neurological disorders involving both central and peripheral nervous system and, in some cases, other systems and organs. Autosomal recessive neurodegenerative ataxias are classified according to the major site of degeneration, which can be the cerebellum or the spinal cord. A third group of disorders involves concurrent cerebellar degeneration and sensorimotor peripheral neuropathy [1]. A few of these ataxias are genetically and molecularly characterized and the pathogenesis is a 'loss of function' of cellular proteins involved in metabolic homeostasis, DNA repair, chaperone function or of unknown function [2].

Prominent clinical features are signs of cerebellar ataxia, such as uncoordinated gait and uncontrolled co-ordination of hands, speech, and eye movements. Other signs, such as retinal, cardiac, muscle and/or other neurological involvement are less common. The clinical picture is often associated with a large variation in age at onset and disease progression.

The ataxias associated with myoclonus, epilepsy and progressive neurological deterioration are usually included with the progressive myoclonus epilepsies (PME). Progressive myoclonus epilepsies (PMEs) are a heterogeneous group of inherited disorders which combine generalized tonic-clonic (GTC) or massive myoclonic jerks, localized myoclonus which may be spontaneous or stimulus-induced, and various degrees of neurological and mental deterioration [3]. PME cases differ in clinical features, aetiology and pathogenesis. Five disease entities, Unverricht-Lundborg disease, Lafora's disease, neuronal ceroid lipofuscinoses (NCLs), myoclonic epilepsy with ragged red fibers (MERRF) and sialidoses, account for the majority of PME cases.

The development of positional cloning strategies based on homozygosity mapping of consanguineous families and on the development of the human genome project allowed to find new rare forms of recessive ataxias. In these consanguineous families, affected individuals are likely to have inherited both copies of the mutated gene from a common ancestor and are thus identical by descent (IBD) not only at the trait locus but also at neighbouring marker loci.

We describe here the assignment of a new disease locus to a 19 Mb interval on chromosome 16q21-q23.3 in a consanguineous Saudi-Arabian family with childhood onset, slowly progressive autosomal recessive spinocerebellar ataxia associated with epilepsy and mental retardation.

Materials and methods

Patients

The study includes 4 children who were referred to the Division of Pediatric Neurology at King Khalid University Hospital, Riyadh, Saudi Arabia for the evaluation of psychomotor retardation and epilepsy. Age at referral ranged from 4 to 13 years. The parents are cousins and originate from a village in the Eastern Province of Saudi Arabia. Neurological examinations and follow-up (spanning 6 years) were performed by one of us (MS). 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 from affected patients and their unaffected parents and siblings (Fig 1). Blood sampling was performed with the approval of the local ethical committee. Muscle biopsy was obtained from the vastus lateralis of Patient II3 at the age of 12 years.

Pathology

Muscle was frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen. Cryostat sections of 10 μm were prepared for histological and histochemical examination using standardized methods [4, 5]. Stains used included hematoxylin and eosin (H&E), modified Gomori trichrome, myofibrillary ATPase at routine (9.4), reversed (4.3) and intermediate (4.6) pH; NADH-tetrazolium reductase (NADH-TR), succinic dehydrogenase (SDH); periodic acid-schiff (PAS), with and without diastase; and sudan black. Another portion of muscle was fixed in 2% glutaraldehyde solution in cacodylate buffer and processed for electron microscopy (EM).

Genotyping

For the whole genome screen, 400 fluorescently labeled microsatellite markers selected from the Genethon human linkage map with an average spacing of 10 cM and an average heterozygosity of 75%, were tested [6]. This linkage Mapping Set was developed and commercialized by Applied Biosystems (ABI Linkage Mapping Set version 2, medium density set MD10). Additional CA/TG microsatellite markers from the Genethon human linkage map were amplified with a universal fluoresceinated primer [6]. They were amplified using 100 ng of genomic DNA in 25 μl PCR reactions containing 5 μl PCR Buffer, 1.5 mM MgCl_2 , 20 mM primer pair mix, and 1U AmpliTaq DNA polymerase (Promega). Amplification conditions were 5 min at 95°C followed by 35 cycles of 30 s at 95°C; 30 s at 55°C; and 30 s at 72°C; and a final extension for 20 min at 72°C.

PCR products were pooled in panels and loaded on an ABI 3100 automated DNA analyzer. Data were analyzed using the GeneScan software (Applied Biosystems).

Linkage analysis

Two-point analyses including the consanguinity loop were performed using the MLINK program of the FASTLINK package. Homozygosity information was taken into account by considering the non-recombinant haplotype as a single locus [7]. Marker order and physical distances were obtained from the UCSC Genome Browser. LOD scores were calculated assuming ataxia in this family is an autosomal recessive disorder and assuming a gene frequency of 0.001 that certainly represents an upper limit for this rare condition.

Results

Clinical and laboratory features of the patients are reported in Table I. The four affected siblings presented with a similar clinical picture. The onset was defined by the appearance of epilepsy at ages ranging between 9 and 12 months. Ataxia was first noticed when the children started to walk, which was delayed till the age of two to three years. The epilepsy was of GTC type in all patients. Seizures were controlled in patient II3 by phenobarbitone, which has been initiated following his first afebrile seizure at the age of 9 months. For patient II4, they were relatively well controlled on valproate and phenobarbitone, and occurred once every 10 months. Patient II1 continued to have GTC seizures during sleep (about once / month) despite adequate therapy with valproate. Also seizures were not controlled in her younger sibling (II2) with combined phenobarbitone and valproate therapy (occurring once or twice a week). The 4 patients also presented with psychomotor delay and learning disabilities. Deep tendon reflexes were diminished in both upper and lower limbs. Limb ataxia was moderate but patients II1, II2 and II4 had severe dysarthria whereas patient II3 had moderate dysarthria. Ophthalmic examination revealed nystagmus on lateral gaze without apraxia. No other neurological signs or symptoms were found except equivocal plantar response and absence of sphincter control in patient II4 at 10 years of age. Routine laboratory examinations and alpha-fetoprotein levels were normal. Electroencephalography (EEG) was normal for patients II1 and II4 at age 18 months and 4 years respectively, but was not investigated subsequently. Patient II2 showed, at 13 years, several bursts of discharges of spikes, multiple spikes and slow waves at 4-5 Hz without clinical manifestation (Fig 2). The frequency of the generalized discharges was exaggerated by hyperventilation. The background was 9-10 Hz and no photosensitivity was demonstrated. Patient II3 had 3-4 Hz occipital paroxysms, suggestive of benign occipital epilepsy with fixation-off sensitivity. Brain magnetic resonance imaging (MRI) was done only for patients II3 and II4 and showed mild cerebellar vermis atrophy (Fig 3). In addition, Patient II3 had abnormal signal

intensity involving the terminal zone of myelination. Nerve conduction studies (NCS) were normal in all patients. Two patients (II1 and II3) had electromyography (EMG) which also revealed normal results. Muscle biopsy of patient II3 (Fig 4) showed mild variation in myofiber size but no evidence of myofiber necrosis, basophilic fibers, interstitial fibrosis or inflammatory infiltrates. There was no evidence of ragged-red fibers or nemaline rods. The normal mosaic pattern was preserved with no specific fiber type atrophy, hypertrophy or grouping. The most conspicuous finding was the presence of irregular vacuolar changes in several fibers. On EM, these appeared along the longitudinal axis of the myofibrils indicating vacuolation of the sarcotubular system.

A total of 400 markers of the ABI PRISM Linkage Mapping Set were tested with this family. Given the close consanguinity of the parents and the close spacing of the markers, we selected the regions for which at least one marker was homozygous in all four affected individuals and we analysed flanking markers to test for homozygosity by descent. Two regions, one on chromosome 3 and one on chromosome 16 appeared to be homozygous for more than 10 consecutive markers. The three healthy siblings were sampled subsequently and allowed to eliminate linkage at chromosome 3 since subject II7 was homozygous for the same alleles as his affected brother and sisters at this locus (not shown).

On chromosome 16q21-q23, the consecutive markers D16S516 and D16S515 of the ABI PRISM Linkage Mapping Set were homozygous in all patients. The study of a dense set of microsatellite markers from this region confirmed linkage at this locus, since the four patients were homozygous for at least 18 consecutive markers and the healthy siblings were heterozygous for 17 of these markers (Fig 1). LOD score calculation, including the consanguinity loop, gave a value of 3.3 at a recombination fraction θ of 0, demonstrating linkage between the disease and the 16q21-23 haplotype. On the telomeric side, a paternal recombination in patient II4 excluded marker D16S3091 from linkage. On the other side, marker D16S3050 and further centromeric markers were heterozygous in all patients, indicating the occurrence of an ancestral recombination. The recombinant markers define a 19 Mb interval containing the gene defective in this syndrome. The set of 16q21-23 microsatellite markers was tested in one consanguineous Algerian family having ataxia associated with epilepsy. Linkage to 16q21-23 was excluded since the three patients did not share the same haplotypes and were not homozygous at this locus.

Discussion

The present study reports the identification of a new locus on chromosome 16q21-q23.3 for an autosomal recessive ataxia associated with epilepsy and

psychomotor retardation. The identification of this locus was based on homozygosity of patients in a consanguineous family, leading to a LOD score in favor of linkage of 3.3. Consistently, this was the only locus that showed linkage with the disease in this family.

The four patients share stereotyped clinical features. Clinical presentation started between 9 months and 1 year of age with seizures partially controlled by medical treatment. Later, psychomotor delay and mental retardation associated with limbs ataxia, dysarthria and nystagmus appeared in all four patients. These clinical features may suggest the diagnosis of Unverricht-Lundborg disease (UL). Indeed, tonic-clonic seizures occur in about 50% of UL patients and myoclonic seizures in the other half [8]. The myoclonus events are stimulus sensitive provoked by light, physical exertion and stress. They may be focal or multifocal [9]. Disease onset is usually between 6 to 13 years and the progression is slow since patients maintain normal cognitive functions for a long time with slow intellectual decline occurring after 10 to 20 years, together with signs of cerebellar ataxia such as incoordination, intention tremor, and dysarthria [10]. The EEG usually shows photosensitivity, abnormal slow background, generalized high-amplitude multispikes, 3 to 5 Hz spike waves or polyspike and wave complexes [11]. It is noteworthy that EEG revealed a normal background activity in the patients of the present family. MRI of the brain may be normal or may reveal bulk reduction of the basis pontis, medulla, and cerebellar hemispheres, and less often, cerebral atrophy [12]. We therefore concluded that the patients of our family presented with a variant clinical picture in all aspects.

The most common genetic defect associated with Unverricht-Lundborg disease is homozygosity for a 12-base pair (dodecamer CCGCCCGCG) repeat in the promoter region of the cystatin B gene located on chromosome 21 and coding for an anti-protease [13]. Another locus has recently been identified at chromosome 12p11-q13 in a family with eight affected individuals presenting with myoclonic or tonic-clonic seizures, ataxia but without progressive dementia [14]. Lieuallen et al. identified 7 genes with consistently increased transcript levels in neurologic tissues from cystatin B deficient knockout mice: cathepsin S, C1q B-chain of complement, beta-2-microglobulin, glial fibrillary acidic protein, apolipoprotein D, fibronectin-1 and metallothionein II [15]. None of these genes is located on 16q21-q23.3 which has been linked to the disease in the present family.

Lafora disease (EPM2A) is a form of progressive myoclonic epilepsy with onset in late childhood or adolescence. It usually starts between 6 and 19 years of age with the appearance of epileptic seizures which are either myoclonic, generalized tonic-clonic, or focal occipital types. Seizures are followed by a decline in the intellectual functions and severe motor and coordination

dysfunction. Diagnosis is made by the presence of intracellular polyglucosan inclusions (Lafora bodies) shown in biopsies of the skin, striated muscle, liver, brain, and/or bone. Patients have progressive neurologic deterioration, which leads to death at an early age [16]. EEG shows trains of photic sensitive high-voltage, usually bilaterally synchronous spike-wave and polyspike-wave complexes interrupting a disorganized slow background [17].

It appears that Lafora disease starts later than in our patients and is more rapidly progressive. Moreover, EEG and muscle biopsy findings were different in the present family from those described in Lafora disease. Ganesh et al disrupted the EPM2A gene in a mouse model and demonstrated that neuronal degeneration and Lafora inclusion bodies predate the onset of impaired behavioral responses, ataxia, spontaneous myoclonic seizures, and EEG epileptiform activity [18]. In 70% of cases, Lafora disease is associated with mutations in the EPM2A gene, which encodes a protein tyrosine phosphatase [19]. An additional gene, NHLRC1 which encodes a putative E3 ubiquitin ligase, has recently been identified [20]. NHLRC1 and EPM2A are thought to act together to protect neurons against polyglucosan accumulation by binding to and targeting proteins for degradation.

Myoclonic epilepsy with ragged red fibers (MERRF) syndrome is a maternally inherited disease characterized by myoclonus as the first symptom, beginning during teenage or adult years followed by generalized epilepsy, ataxia, weakness, and loss of intellectual capacities. Ragged-red fibers are observed in histological sections of muscle biopsy indicative of proliferation and subsarcolemmal accumulation of mitochondria [21]. In patients with MERRF, the EEG shows generalized spike-and-wave discharges at 2–5 Hz, with background slowing that progresses as the disease advances. Focal epileptiform discharges can also be seen [22]. The disease is caused by mutations in mitochondrial DNA. The most common mutation that accounts for 80% of the MERRF cases is 8344A>G in the tRNA^{lys} gene MTTK [23]. Mutations in other mitochondrial tRNA genes such as MTTL1, MTTH, MTTS1, MTTF, and in the complex I gene ND5 have also been found [24-28].

The neuronal ceroid lipofuscinoses (NCL; CLN) are a clinically and genetically heterogeneous group of neurodegenerative disorders, mostly inherited as autosomal recessive and affect mainly children and, occasionally, adults. They are characterized by the intracellular accumulation of autofluorescent lipopigment storage material in brain, cerebellum and other tissues. These disorders, genetically classified as CLN1 to CLN8, share similar signs such as retinopathy with loss of vision, epilepsy, ataxia and dementia. They were classified according to the clinical onset of symptoms as infantile, late-infantile, juvenile and adult forms [29]. The proteins encoded by these genes are localized

either in lysosomes or in the endoplasmic reticulum. The major protein component of the accumulated material was identified as subunit c of mitochondrial ATP synthase [30]. CLN1 is particularly interesting since age at onset ranges from 8 to 18 months. However, this is followed by rapid mental deterioration and ataxia. Myoclonic jerks appear during the second year of life and there is progressive microcephaly. Blindness, due to optic atrophy and macular and retinal changes, is a feature of the disease [30]. There is also progressive slowing of the EEG and loss of amplitude leading to an isoelectric tracing during the third year of life [31, 32]. The disease also produces a marked degree of brain atrophy as revealed by MRI [33]. The evolution of the disease, EEG and MRI features differ from those found in our family.

Sialidosis is a rare lysosomal storage disorder with autosomal recessive inheritance. Two sialidoses result in PME. Sialidose type I (cherry-red spot myoclonus syndrome) is caused by deficiency of neuraminidase. It has a juvenile or adult onset and produces a rather pure intention and action myoclonus, tonic-clonic seizures, ataxia and absence of mental deterioration. There is gradual visual failure and a characteristic cherry-red spot in the fundus [34]. Sialidose type II is caused by a deficiency of both N-acetyl neuraminidase and galactosialidase. The time of onset varies from the neonatal period to the second decade of life. Clinical features include coarse facial features, corneal clouding, hepatomegaly, skeletal dysplasia, learning disability and myoclonus. EEG background shows low-voltage fast activity and trains of 10–20 Hz associated with massive myoclonus [35]. MRI findings range from normal in the early stages to cerebellar and cerebral atrophy as the disease progresses [36].

Recently, Van Goethem et al [37] described patients homozygous for a recessive missense mutation in the polymerase gamma gene (POLG) who also presented with seizure, sensory ataxic neuropathy and decreased cognitive function starting at 17 years of age. This clinical picture overlaps with the MERRF syndrome. POLG is a heterodimer composed of a 140-kDa alpha subunit and a 41-kDa beta subunit. It is part of a multienzymatic complex located within the mitochondria. Mutations in POLG have been found associated with autosomal recessive or dominant progressive external ophthalmoplegia (PEO), Alpers syndrome, the syndrome of sensory ataxia, neuropathy, dysarthria and ophthalmoparesis (SANDO), Parkinsonism and male infertility [38]. Winterthun et al [39] reported three families having point mutations in POLG who presented with ataxia plus additional features of headache, epilepsy, myoclonus, neuropathy, and late onset progressive external ophthalmoplegia. The first manifestation, beginning at 5-23 years, is headache or seizures. Both may be caused by the same mechanism, namely epileptic discharge.

It appears that the association of epilepsy, ataxia and mental retardation is often found in the case of mitochondrial or lysosomal dysfunction. Muscle biopsy of patient II3 showed sarcotubular system vacuolization but no structural changes in mitochondria or the lysosomes. It is noteworthy that sarcotubular system vacuolization has been observed in miscellaneous cases of myopathy including hypokalemic periodic paralysis channelopathy [40]. It may also be seen in conditions where focal necrosis has recently occurred, or as an artifact when there is acute focal swelling following ingress of sodium into a fiber [41]. Nevertheless, neurophysiologic testing revealed no features of myotonia, myopathy or neuropathy in the present family. Biopsies from other siblings could not be obtained. It is therefore not possible to conclude whether this finding is a characteristic feature of the disease affecting this family, like Lafora bodies, ragged-red fibers and autofluorescent lipopigments are in Lafora disease, MERRF and CLN, respectively.

In conclusion, the patients of this family present with an autosomal recessive disorder with a clinical picture similar to PME diseases. Age at onset, absence of myoclonus and dementia, spikes, multispikes and slow waves on EEG, leukodystrophic changes and images of muscle vacuoles, as well as linkage analysis excluded these disorders and allowed us to define a new clinical entity related to the 16q21-q23.3 locus. The identification of other families with a similar phenotype and linked to the same interval should allow to reduce the size of this locus and to search for mutations in candidate genes located in the critical interval.

Acknowledgements

We are indebted to S. Vicaire, E. Troesch, and I. Colas for excellent technical help. Studies were supported by funds from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (PHRC régional), the Agence Nationale pour la Recherche–Maladies Rares (ANR-MRAR) and the College de France. M. G. was supported by an exchange program fellowship “Charcot” from the French Ministry of Foreign Affairs (MAE) and D. H. by the Tunisian Ministry of Health.

References

- [1] Koenig M. Rare forms of autosomal recessive neurodegenerative ataxia. *Seminars in pediatric neurology*. 2003 Sep;10(3):183-92.
- [2] Di Donato S, Gellera C, Mariotti C. The complex clinical and genetic classification of inherited ataxias. II. Autosomal recessive ataxias. *Neurol Sci*. 2001 Jun;22(3):219-28.
- [3] Classification of progressive myoclonus epilepsies and related disorders. Marseille Consensus Group. *Annals of neurology*. 1990 Jul;28(1):113-6.
- [4] Dubowitz V. *Muscle Biopsy. A Practical Approach*. London: Bailliere Tindall 1985.
- [5] Pearse A. *Histochemistry. Theoretical and Applied*. Edinburgh: Churchill Livingstone 1985.
- [6] Lagier-Tourenne C, Tranebaerg L, Chaigne D, Gribaa M, Dollfus H, Silvestri G, et al. Homozygosity mapping of Marinesco-Sjogren syndrome to 5q31. *Eur J Hum Genet*. 2003 Oct;11(10):770-8.
- [7] Ben Hamida C, Doerflinger N, Belal S, Linder C, Reutenauer L, Dib C, et al. Localization of Friedreich ataxia phenotype with selective vitamin E deficiency to chromosome 8q by homozygosity mapping. *Nature genetics*. 1993 Oct;5(2):195-200.
- [8] Koskiniemi M, Donner M, Majuri H, Haltia M, Norio R. Progressive myoclonus epilepsy. A clinical and histopathological study. *Acta neurologica Scandinavica*. 1974;50(3):307-32.
- [9] Norio R, Koskiniemi M. Progressive myoclonus epilepsy: genetic and nosological aspects with special reference to 107 Finnish patients. *Clinical genetics*. 1979 May;15(5):382-98.
- [10] Lalioti MD, Antonarakis SE, Scott HS. The epilepsy, the protease inhibitor and the dodecamer: progressive myoclonus epilepsy, cystatin b and a 12-mer repeat expansion. *Cytogenetic and genome research*. 2003;100(1-4):213-23.
- [11] Koskiniemi M, Toivakka E, Donner M. Progressive myoclonus epilepsy. Electroencephalographical findings. *Acta neurologica Scandinavica*. 1974;50(3):333-59.
- [12] Mascalchi M, Michelucci R, Cosottini M, Tessa C, Lolli F, Riguzzi P, et al. Brainstem involvement in Unverricht-Lundborg disease (EPM1): An MRI and (1)H MRS study. *Neurology*. 2002 Jun 11;58(11):1686-9.
- [13] Lalioti MD, Scott HS, Genton P, Grid D, Ouazzani R, M'Rabet A, et al. A PCR amplification method reveals instability of the dodecamer repeat in progressive myoclonus epilepsy (EPM1) and no correlation between the size of the repeat and age at onset. *American journal of human genetics*. 1998 Apr;62(4):842-7.
- [14] Berkovic SF, Mazarib A, Walid S, Neufeld MY, Manelis J, Nevo Y, et al. A new clinical and molecular form of Unverricht-Lundborg disease localized by homozygosity mapping. *Brain*. 2005 Mar;128(Pt 3):652-8.
- [15] Lieuallen K, Pennacchio LA, Park M, Myers RM, Lennon GG. Cystatin B-deficient mice have increased expression of apoptosis and glial activation genes. *Human molecular genetics*. 2001 Sep 1;10(18):1867-71.
- [16] Minassian BA. Lafora's disease: towards a clinical, pathologic, and molecular synthesis. *Pediatric neurology*. 2001 Jul;25(1):21-9.
- [17] Delgado-Escueta AV, Ganesh S, Yamakawa K. Advances in the genetics of progressive myoclonus epilepsy. *American journal of medical genetics*. 2001 Summer;106(2):129-38.
- [18] Ganesh S, Delgado-Escueta AV, Sakamoto T, Avila MR, Machado-Salas J, Hoshii Y, et al. Targeted disruption of the Epm2a gene causes formation of Lafora inclusion bodies, neurodegeneration, ataxia, myoclonus epilepsy and impaired behavioral response in mice. *Human molecular genetics*. 2002 May 15;11(11):1251-62.

- [19] Minassian BA, Lee JR, Herbrick JA, Huizenga J, Soder S, Mungall AJ, et al. Mutations in a gene encoding a novel protein tyrosine phosphatase cause progressive myoclonus epilepsy. *Nature genetics*. 1998 Oct;20(2):171-4.
- [20] Chan EM, Young EJ, Ianzano L, Munteanu I, Zhao X, Christopoulos CC, et al. Mutations in NHLRC1 cause progressive myoclonus epilepsy. *Nature genetics*. 2003 Oct;35(2):125-7.
- [21] Fukuhara N, Tokiguchi S, Shirakawa K, Tsubaki T. Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibres (mitochondrial abnormalities): disease entity or a syndrome? Light- and electron-microscopic studies of two cases and review of literature. *Journal of the neurological sciences*. 1980 Jul;47(1):117-33.
- [22] So N, Berkovic S, Andermann F, Kuzniecky R, Gendron D, Quesney LF. Myoclonus epilepsy and ragged-red fibres (MERRF). 2. Electrophysiological studies and comparison with other progressive myoclonus epilepsies. *Brain*. 1989 Oct;112 (Pt 5):1261-76.
- [23] Shoffner JM, Lott MT, Lezza AM, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC. Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell*. 1990 Jun 15;61(6):931-7.
- [24] Moraes CT, Ciacci F, Bonilla E, Jansen C, Hirano M, Rao N, et al. Two novel pathogenic mitochondrial DNA mutations affecting organelle number and protein synthesis. Is the tRNA(Leu(UUR)) gene an etiologic hot spot? *The Journal of clinical investigation*. 1993 Dec;92(6):2906-15.
- [25] Melone MA, Tessa A, Petrini S, Lus G, Sampaolo S, di Fede G, et al. Revelation of a new mitochondrial DNA mutation (G12147A) in a MELAS/MERFF phenotype. *Archives of neurology*. 2004 Feb;61(2):269-72.
- [26] Nakamura M, Nakano S, Goto Y, Ozawa M, Nagahama Y, Fukuyama H, et al. A novel point mutation in the mitochondrial tRNA(Ser(UCN)) gene detected in a family with MERRF/MELAS overlap syndrome. *Biochemical and biophysical research communications*. 1995 Sep 5;214(1):86-93.
- [27] Mancuso M, Filosto M, Mootha VK, Rocchi A, Pistolesi S, Murri L, et al. A novel mitochondrial tRNAPhe mutation causes MERRF syndrome. *Neurology*. 2004 Jun 8;62(11):2119-21.
- [28] Naini AB, Lu J, Kaufmann P, Bernstein RA, Mancuso M, Bonilla E, et al. Novel mitochondrial DNA ND5 mutation in a patient with clinical features of MELAS and MERRF. *Archives of neurology*. 2005 Mar;62(3):473-6.
- [29] Mole SE, Williams RE, Goebel HH. Correlations between genotype, ultrastructural morphology and clinical phenotype in the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Neurogenetics*. 2005 Sep;6(3):107-26.
- [30] Seehafer SS, Pearce DA. You say lipofuscin, we say ceroid: defining autofluorescent storage material. *Neurobiology of aging*. 2006 Apr;27(4):576-88.
- [31] Santavuori P, Haltia M, Rapola J, Raitta C. Infantile type of so-called neuronal ceroid-lipofuscinosis. 1. A clinical study of 15 patients. *J Neurol Sci*. 1973 Mar;18(3):257-67.
- [32] Santavuori P. Neuronal ceroid-lipofuscinoses in childhood. *Brain Dev*. 1988;10(2):80-3.
- [33] Vanhanen SL, Raininko R, Santavuori P, Autti T, Haltia M. MRI evaluation of the brain in infantile neuronal ceroid-lipofuscinosis. Part 1: Postmortem MRI with histopathologic correlation. *J Child Neurol*. 1995 Nov;10(6):438-43.
- [34] Rapin I, Goldfischer S, Katzman R, Engel J, Jr., O'Brien JS. The cherry-red spot--myoclonus syndrome. *Annals of neurology*. 1978 Mar;3(3):234-42.
- [35] Engel J, Jr., Rapin I, Giblin DR. Electrophysiological studies in two patients with cherry red spot--myoclonus syndrome. *Epilepsia*. 1977 Mar;18(1):73-87.

- [36] Palmeri S, Villanova M, Malandrini A, van Diggelen OP, Huijmans JG, Ceuterick C, et al. Type I sialidosis: a clinical, biochemical and neuroradiological study. *European neurology*. 2000;43(2):88-94.
- [37] Van Goethem G, Mercelis R, Lofgren A, Seneca S, Ceuterick C, Martin JJ, et al. Patient homozygous for a recessive POLG mutation presents with features of MERRF. *Neurology*. 2003 Dec 23;61(12):1811-3.
- [38] Longley MJ, Graziewicz MA, Bienstock RJ, Copeland WC. Consequences of mutations in human DNA polymerase gamma. *Gene*. 2005 Jul 18;354:125-31.
- [39] Winterthun S, Ferrari G, He L, Taylor RW, Zeviani M, Turnbull DM, et al. Autosomal recessive mitochondrial ataxic syndrome due to mitochondrial polymerase gamma mutations. *Neurology*. 2005 Apr 12;64(7):1204-8.
- [40] Carpenter S, Karpati G. *Pathology of Skeletal Muscle*: New York: Oxford University Press 2001.
- [41] Carpenter S. *Disorders of Voluntary Muscle*. Cambridge: Cambridge University Press 2001.

Figure 1

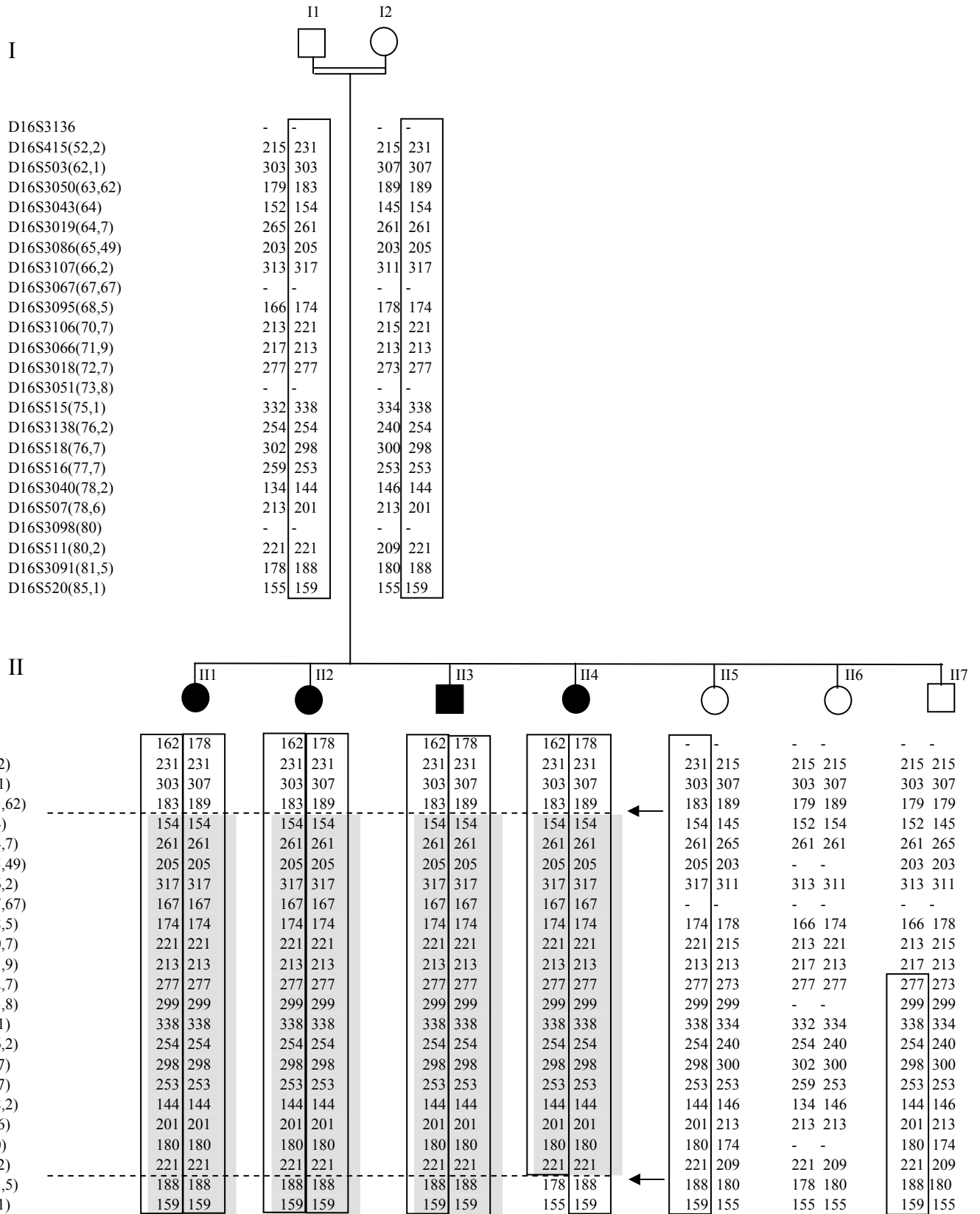


Figure 2

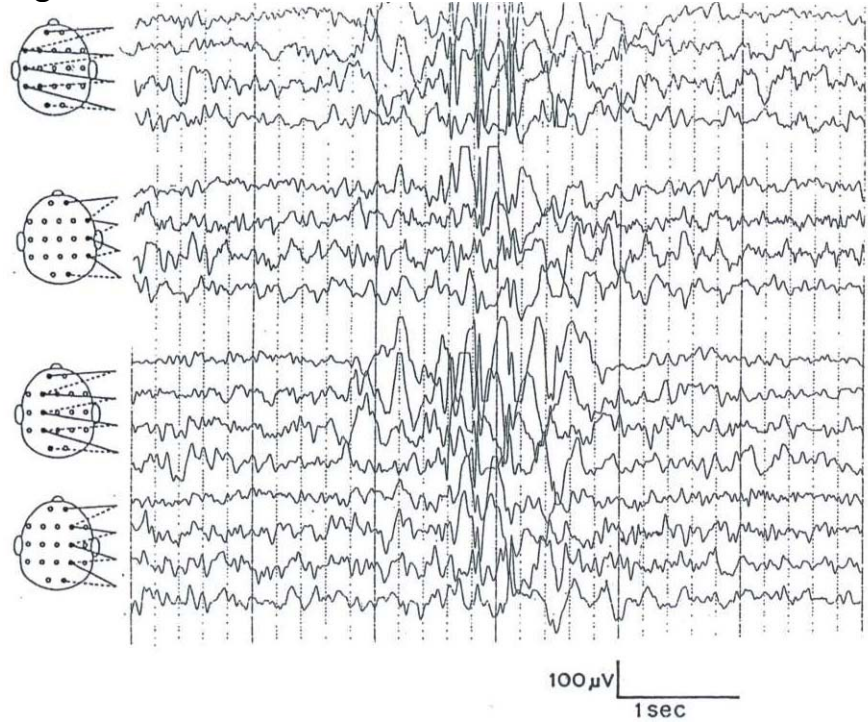


Figure 3

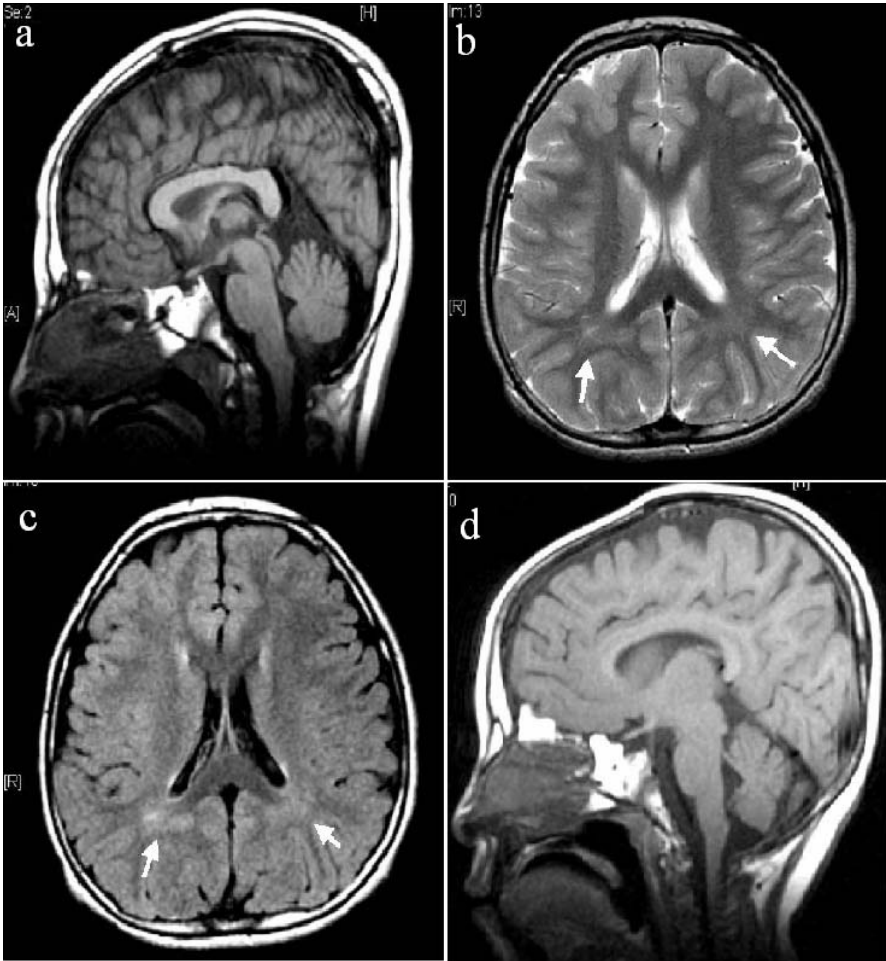
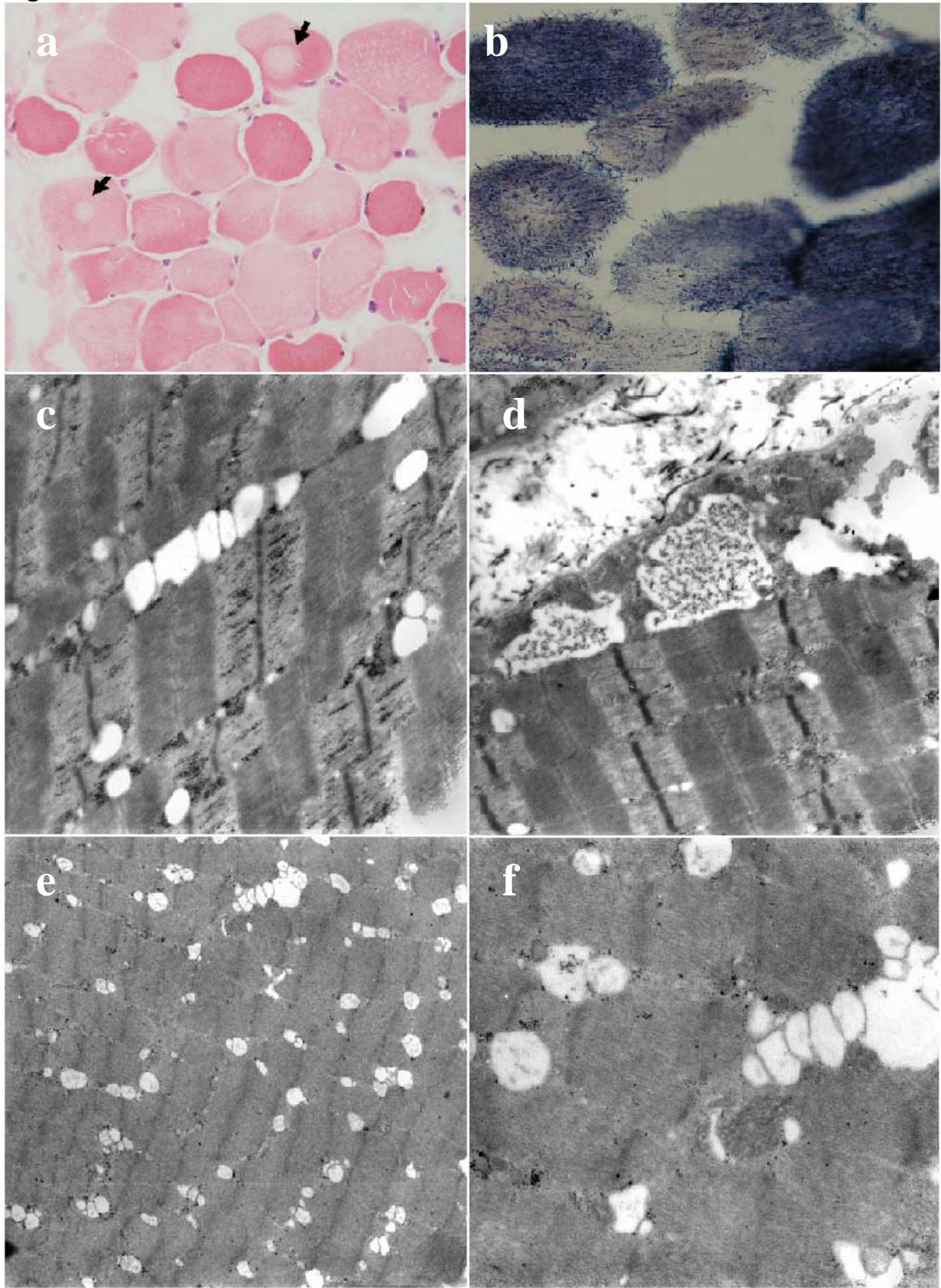


Figure 4



Legend to Figures

Figure 1: Pedigree of the family with autosomal recessive ataxia and epilepsy. Markers are indicated on the left and are organized from top to bottom in centromeric to telomeric order. The marker order is based on the UCSC Assembly of Human Genome browser (May 2004 update). For each marker, the position on the genome is indicated between brackets in megabases. Parental haplotypes linked with the disease are boxed. The region of homozygosity by descent is highlighted in grey. Dotted lines indicate the centromeric and telomeric boundaries of our locus defined, respectively, by a paternal recombination in patient II.4 and heterozygosity in patients due to an ancestral recombination (arrows).

Figure 2: Sleep/sedated EEG of Patient II2 at the age of 13 years. The background is 9-10Hz in addition to a mixture of beta and theta activity. There is a burst of generalized discharges of spikes, multiple spikes and slow waves at 4 to 5 Hz, with greater voltage on the left. The discharges lasted for more than a second without clinical manifestation.

Figure 3: Patient II3 (aged 12 years). a) Saggital T1-weighted brain MR image showing mild cerebellar atrophy, b) axial T2-weighted image and c) axial FLAIR image demonstrating asymmetry in the appearance of the terminal zone of myelination posterior to the lateral ventricle trigones with the right side showing more hyperintense signal that extends toward the subcortical white matter (arrows). d) Saggital T1-weighted MR images of Patient II4 (aged 4 years) showing mild cerebellar atrophy and normal corpus callosum.

Figure 4: Muscle biopsy from the vastus lateralis of Patient II3. a) Histology (H&E, x200) revealed mild variation in myofiber size and the presence of vacuolar changes in a few fibers (arrows). b) The intermyofibrillar sarcoplasmic architecture also showed focal decreased staining (arrows, NADH-TR, x400). c) Electron microscopy delineated the vacuoles which appeared scattered along the longitudinal axis of the myofibrils (magnification x30,000). d) Subsarcolemmal vacuoles of irregular shape containing loosely arranged glycogen granules were also seen (magnification x24,000). e) The vacuoles appear scattered or in small groups, empty or containing some hazy material of unknown type (magnification x12,000). f) Enlarged area showing the grouped vacuoles being delineated by membranes (magnification x37,500).

Table I: Clinical and biochemical features of family H.

	II1	II2	II3	II4
Sex	Female	Female	Male	Female
Age (years)	19	18	16	10
Family history	Siblings	Siblings	Siblings	Siblings
Age at onset of first sign	Epilepsy at 1 year	Epilepsy at 9 months	Epilepsy at 9 months	Epilepsy at 9 months
Delayed motor development	Delayed, walked at 2 years	Delayed, walked at 3 years	Delayed, walked at 2 years	Delayed, walked at 3 years
Delayed learning abilities	Delayed, talked at > 3 years	Delayed, talked at 3 years	Delayed, talked at 2 years	Delayed. Jargon speech
Unsteadiness (age at onset)	Yes (since walking)	Yes (since walking)	Yes (since walking)	Yes (since walking)
Dysarthria (age at onset)	Yes (since talking)	Yes (since talking)	Yes (since talking)	Yes (Jargon speech)
Cerebellar ataxia: Upper limbs Lower limbs Gait Dysarthria	Moderate Moderate Moderate Severe (Scanning speech)	Moderate Moderate Moderate Severe (Scanning speech)	Mild Mild Mild Moderate	Mild Moderate Moderate Severe(Jargon)
Disability stage*	2	2	2	3
Reflexes (upper and lower limbs)	Diminished	Diminished	Diminished	Diminished
Plantar reflex	Flexor	Flexor	Flexor	Indifferent (equivocal)
Motor deficit	None	None	None	None
Muscle wasting	None	None	None	None
Fasciculations	No	No	No	No
Sensory deficit (superficial sensory loss)	No	No	No	No
Skeletal abnormalities	None	None	None	None
Scoliosis	None	None	None	None
Pes cavus	None	None	None	None
Facial dysmorphism	No	No	No	No
Sphincter disturbances	None	None	None	Still incontinent
Extrapyramidal symptoms	None	None	None	None
Ophthalmological signs	No abnormality	No abnormality	No abnormality	No abnormality
Observation				
Movement	Nystagmus (on lateral gaze). No ocular apraxia	Nystagmus (on lateral gaze). No ocular apraxia	Nystagmus (on lateral gaze). No ocular apraxia	Nystagmus (on lateral gaze). No ocular apraxia
Mental status (onset)	Mental retardation (since early childhood)	Mental retardation (since early childhood)	Mental retardation (since early childhood)	Mental retardation (since early childhood)
Other signs (details)	Epilepsy since 1 year	Epilepsy since 9 months	Epilepsy since 9 months	Epilepsy since 9 months
Cerebellar gait score*	1	1	1	2

Adiadocho-score❖	8 times	10 times	9 times	NA
Modified Ashworth Scale⚡	0	0	0	0
Ambulatory Score⚡	0	0	0	Na
PATA test: dyarthria evaluation⚡	Scanning speech	Scanning speech	10 times	Scanning (Jargon speech)
Alpha-fetoprotein	N	N	N	N
Carcinoembryonic antigen	N	N	N	N
Cholesterol (mmol/L) (N=3.2 – 5.2)	3.5	4.3	3.1	5.3
Immunoglobulins g/L				
IgG (8<N<18 g/l)	22.16	-	N	N
IgM (0.5<N<2.4 g/L)	N	-	N	N
IgA (0.9<N<4.5)	8.34	-	5.03	N
IgE	N	-	N	N
Serum amino-acid profile (by tandem MS)	N	N	N	N
Serum copper	N	N	N	N
Thyroid function tests (T3 and TSH)	N	N	-	-
Very long chain fatty acids and phytanic acid	-	-	N	N
Ceruloplasmin	-	-	N	N
EEG	N(at 18 months)	Generalized spike-wave discharges (at 13 y)	Occipital paroxysms (at 12y)	N(at 4y)
NCS (motor and sensory)	N	N	N	N
EMG	N	-	N	-
MRI brain	-	-	Mild cerebellar vermis atrophy. Abnormal terminal zone of myelination	Mild cerebellar vermis atrophy.

Abbreviations: N = normal; NA = not ascertained (could not be ascertained); - = not done; EEG = electroencephalography; EMG = electromyography; MRI = magnetic resonance imaging; MS = mass spectrometry; NCS = nerve conduction studies; TSH= thyroid stimulating hormone..

*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.).

COMMUNICATION LIEE AU TRAVAIL DE THESE

Gribaa M., Klur S., Bomont P., Gershoni-Barush R., Leheup B., Koenig M.
New families with ataxia and hearing and visual impairment (van Bogaert-
Martin syndrome) linked to 6p21-23 and refined genetic localisation. European
Journal of Human Genetics. 10 (supplement 1) - P0899 - May 2002

New families with ataxia and hearing and visual impairment (van Bogaert-Martin syndrome) linked to 6p21-23 and refined genetic localisation

M. Gribaa¹, S. Klur¹, P. Bomont¹, R. Gershoni-Barush², B. Leheup³, J. Pouget⁴, M. Koenig¹;

⁽¹⁾ IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire), Strasbourg, FRANCE,

⁽²⁾ Rambam Medical Center - Faculty of Medicine - Department of Human Genetics, Haifa, ISRAEL.

⁽³⁾ CHU - Service de Médecine Infantile 3 et de Génétique Clinique, Nancy, FRANCE.

⁽⁴⁾ Service de Neurologie. Hôpital de la Timone, CHU Marseille.

INTRODUCTION

The hereditary ataxias are a heterogeneous group of genetic disorders characterized by cerebellar symptoms (such as uncoordinated gait, poor coordination of hands, speech and eye movements) in association with other neurological and non neurological features (1). They represent 10% of genetic disorders affecting the central nervous-system (2).

Autosomal recessive ataxias, are neurodegenerative disorders that affect the cerebellum and/or the spinocerebellar tracts and the posterior columns of the spinal cord (3). Their clinical course ranges from benign or non-progressive to rapidly lethal. Since the primary biochemical defect is unknown in most of these disorders, a clinical classification based on the age of onset, associated clinical features and evolution has been proposed (4, 5).

Van Bogaert-Martin syndrome is an early onset autosomal recessive ataxia associated to optical atrophy and cochlear degeneration (6).

The locus corresponding to this syndrome has been identified by P. BOMONT and al. in a region spanning 17 cM between the markers D6S1678 and D6S291 (Fig. 1) by the study of large Arabic consanguineous family living in Israel, (3).

In this family, an uncle and a niece were affected by an early onset ataxia, which started at the age of 3 years by an uncoordinated gait. At the age of 27 years, the uncle presented deafness and Fundus examination revealed bilateral optic atrophy. The niece showed at age of 17 years impaired hearing and vision without nystagmus.

Our objectives were to identify new families linked to 6p21-23 in order to better define the related phenotype, to narrow down the critical interval and to eventually search for the defective gene.

SUBJECTS AND METHODS

We have analysed by homozygosity mapping a set of patients belonging to 21 consanguineous families and presenting a recessive ataxia.

Because the variability of the clinical features of the Van Bogaert-Martin syndrome are not yet well defined, we included in our study all kind of ataxia with or without hearing and vision impairment and for which we initially excluded the diagnosis of Friedreich ataxia, ataxia with vitamin E deficiency and ataxia linked to 9q34 (with elevated alpha-foetoprotein).

For the different members of these families, we first analysed 8 polymorphic markers of the 6p21-23 region. Patients who presented at least 5 successive homozygous markers were further analysed with additional markers.

The scan of this region was performed with the ABI 377 DNA sequencer (PE Applied Biosystems) using 3 primers, including a tailed primer and a universal fluorescent labelled primer (7) for the amplification of microsatellite markers (CA/TG) (Fig. 2). The data were analysed using ABI PRISM GeneScan Analysis Software and Genotyper Software.

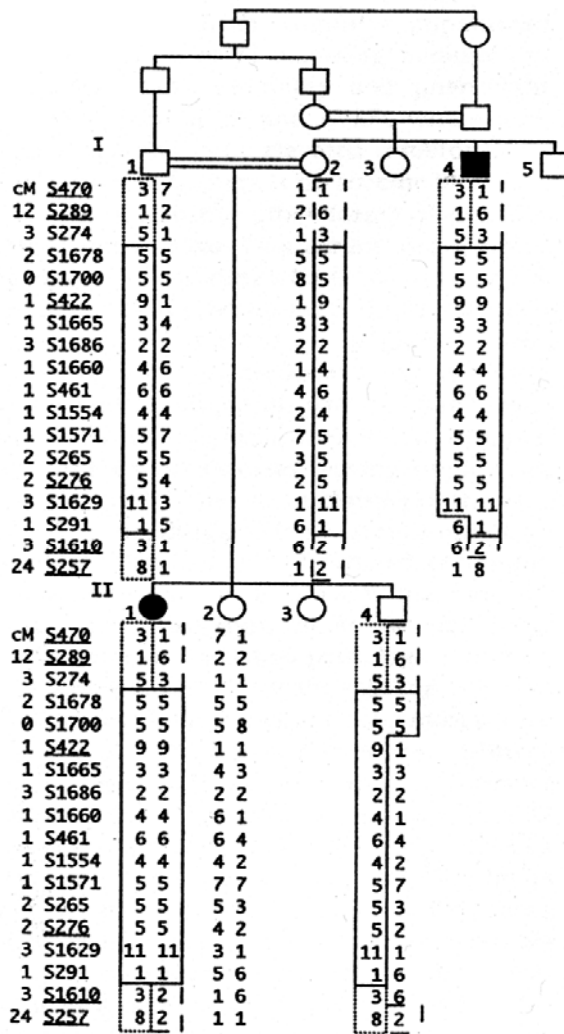


Fig. 1: Allele segregation of linked and flanking markers in the Arabic Israeli family (3).

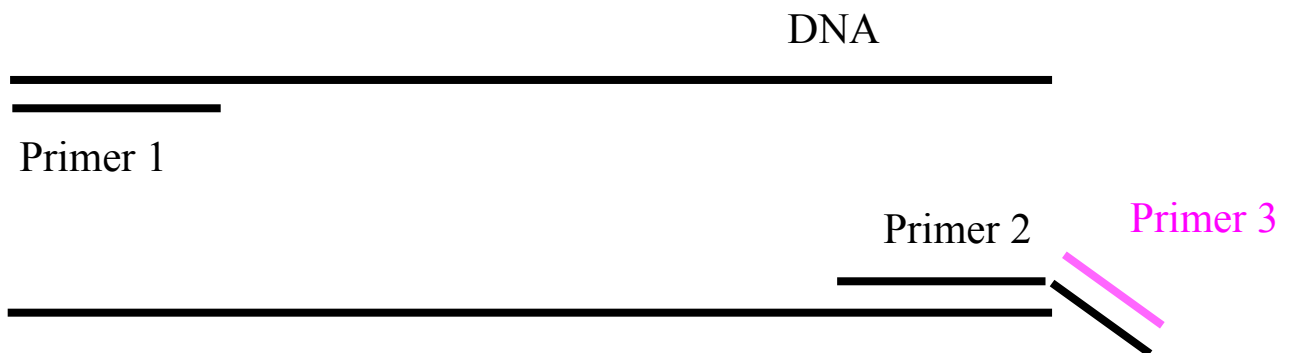


Fig. 2 : Amplification of microsatellite using three primers :
 . Primers 1 and 2 are specific for the locus
 . Primer 2 has an universal tail, that is complementary to the fluorescent primer 3.

RESULTS AND DISCUSSION

Three families were revealed extensive homozygosity, indicating homozygosity by descent (Fig. 3):

* J. family: is originating from Lebanon. It consists of 2 children, born from consanguineous parents, who are affected by a major ataxia which begun before the age of 16 years, associated with weak tendon reflexes in the upper limbs and abolished tendon reflexes in the lower limbs. There was an important perturbation of orthocinetec sensitivity.

* C. family: is originating from Turkey. It is a consanguineous family having 2 children affected by a major ataxia:

. The girl was born with cleft palate and coloboma of the left iris. She started walking with delay (3 years) and had delayed speech (5 years). At the age of 9 years, she developed an uncoordinated gait with very sharp reflexes and progressive neurological worsening. Typical retinitis pigmentosa aspect was found on fundus examination. EMG revealed a moderate reduction of motor conduction velocity.

. The younger boy had a normal development of walking and language skills, but he had school difficulties with understanding and attention deficit. At the age of 9 years, he started to have frequent falls associated with cerebellar and pyramidal signs. Fundus examintion revealed a turgescent macula surrounded by depigmented lesions. EMG revealed marked reduction of motor conduction velocity.

* Patient 370 originates from Israel. He belongs to a consanguineous family. He presents ataxia and sensorimotor neuropathy.

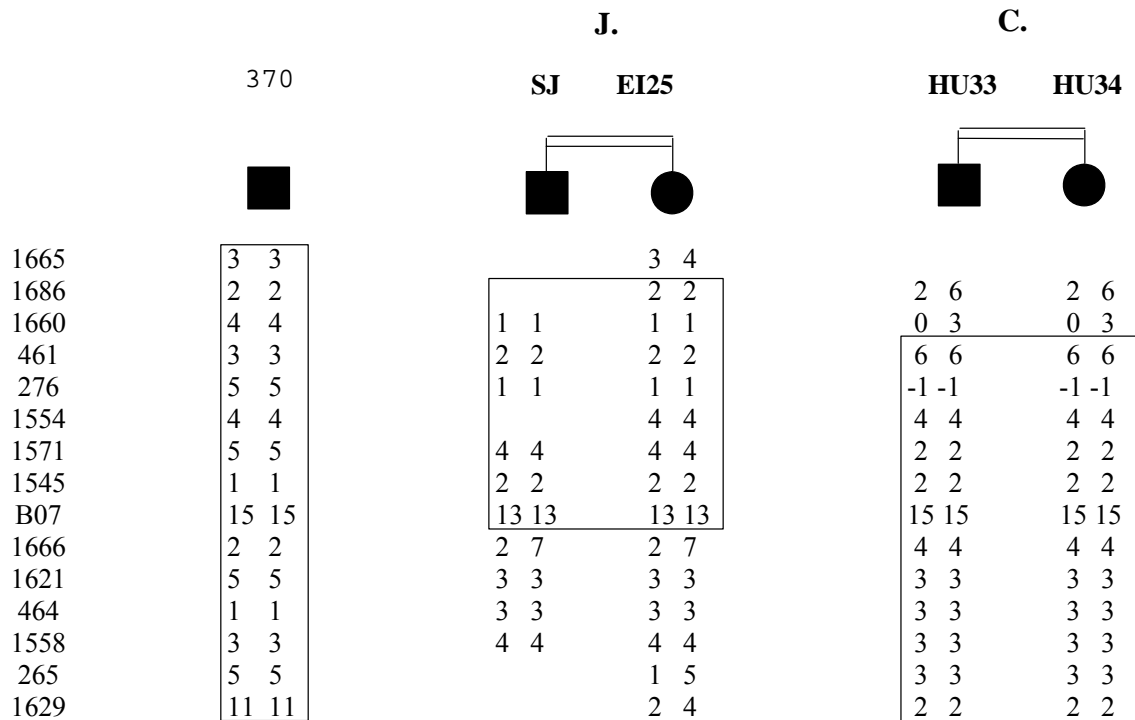


Fig. 3 : Haplotypes of the families that are homozygous for more than 5 markers of the 6p21-23 locus

The available partial sequence of the human genome in this critical interval of 3 Mb contains a minimum of 30 genes. Some of them could be good candidates for the syndrome of Van Bogaert and Martin.

We started the analysis of these genes by direct sequencing of their different exons, in search of mutations that could lead to a loss of functions.

In the meantime, other families will be analysed for the same interval in order to further restrict the critical interval and minimise the number of genes in the interval.

CONCLUSION

Spinocerebellar ataxias comprise a group of inherited degenerative neurological diseases whose clinical and genetic complexity started being unravelled only recently. The 6p21-23 locus corresponds to an early onset autosomal recessive ataxia associated with optic atrophy and cochlear degeneration (Van Bogaert-Martin syndrome) (6).

We have shown here that isolated families with autosomal recessive ataxia have permitted us, by homozygosity mapping, to refine the length of this locus from 17 to 3 cM. The identification of linkage to 6p22 for family C. allows to conclude that association of ataxia and visual decline is an important clinical criteria for this syndrome. Unfortunately, due to the premature death of the older sister, it will be difficult to assess whether deafness is later obligatory feature or not.

The identification of the defective gene will bring new lights on the physiopathological mechanisms of recessive ataxia and may allow to propose new therapeutic approaches, such as antioxidants if the defective gene is involved in mitochondrial functions for example.

REFERENCES

- (1) Megarbane A, Delague V, Ruchoux MM, Rizkallah E, Maurage CA, Viollet L, Rouaix-Emery N, Urtizbera A. *New autosomal recessive cerebellar ataxia disorder in a large inbred Lebanese family*. Am J Med Genet 2001 Jun 15;101(2):135-41.
- (2) Moreira MC, Barbot C, Tachi N, Kozuka N, Mendonca P, Barros J, Coutinho P, Sequeiros J, Koenig M. *Homozygosity mapping of Portuguese and Japanese forms of ataxia-oculomotor apraxia to 9p13, and evidence for genetic heterogeneity*. Am J Hum Genet 2001 Feb;68(2):501-8.
- (3) Bomont P, Watanabe M, Gershoni-Barush R, Shizuka M, Tanaka M, Sugano J, Guiraud-Chaumeil C, Koenig M. *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 2000 Dec;8(12):986-90.
- (4) Campanella G, Filla A, De-Michele G. *Classification of hereditary ataxias. A critical overview*. Acta Neurol Napoli 1992; 14: 408-419.
- (5) Harding AE. *Classification of the hereditary ataxias and paraplegias*. Lancet i 1983: 1151-1155.
- (6) van Bogaert L, Martin L. *Optic and cochleovestibular degenerations in the hereditary ataxias. I. Clinico-pathological and genetic aspects*. Brain. 1974 Mar;97(1):15-40.
- (7) Warner JP, Barron LH, Goudie D, Kelly K, Dow D, Fitzpatrick DR, Brock DJ. *A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR*. J Med Genet 1996 Dec;33(12):1022-6.

REFERENCES

1. Koenig, M., *Rare forms of autosomal recessive neurodegenerative ataxia*. Semin Pediatr Neurol, 2003. **10**(3): p. 183-92.
2. Kim, J.Y., et al., *Molecular analysis of Spinocerebellar ataxias in Koreans: frequencies and reference ranges of SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, and SCA7*. Mol Cells, 2001. **12**(3): p. 336-41.
3. Sasaki, H., I. Yabe, and K. Tashiro, *The hereditary spinocerebellar ataxias in Japan*. Cytogenet Genome Res, 2003. **100**(1-4): p. 198-205.
4. Di Donato, S., C. Gellera, and C. Mariotti, *The complex clinical and genetic classification of inherited ataxias. II. Autosomal recessive ataxias*. Neurol Sci, 2001. **22**(3): p. 219-28.
5. Gil, R., *Neurologie pour le praticien*, ed. SIMEP. 1989.
6. van Bogaert, L. and L. Martin, *Optic and cochleovestibular degenerations in the hereditary ataxias. I. Clinico-pathological and genetic aspects*. Brain, 1974. **97**(1): p. 15-40.
7. Bomont, P., et al., *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, 2000. **8**(12): p. 986-90.
8. Pitts, S.A., et al., *hMRE11: genomic structure and a null mutation identified in a transcript protected from nonsense-mediated mRNA decay*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(11): p. 1155-62.
9. Paull, T.T. and M. Gellert, *A mechanistic basis for Mre11-directed DNA joining at microhomologies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6409-14.
10. Paull, T.T. and M. Gellert, *The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks*. Mol Cell, 1998. **1**(7): p. 969-79.
11. Uziel, T., et al., *Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage*. Embo J, 2003. **22**(20): p. 5612-21.
12. Arthur, L.M., et al., *Structural and functional analysis of Mre11-3*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(6): p. 1886-93.
13. Paull, T.T. and M. Gellert, *Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex*. Genes Dev, 1999. **13**(10): p. 1276-88.
14. Lee, J.H. and T.T. Paull, *ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex*. Science, 2005. **308**(5721): p. 551-4.

15. Dolganov, G.M., et al., *Human Rad50 is physically associated with human Mre11: identification of a conserved multiprotein complex implicated in recombinational DNA repair*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(9): p. 4832-41.
16. de Jager, M., et al., *Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends*. Mol Cell, 2001. **8**(5): p. 1129-35.
17. Connelly, J.C., E.S. de Leau, and D.R. Leach, *Nucleolytic processing of a protein-bound DNA end by the E. coli SbcCD (MR) complex*. DNA Repair (Amst), 2003. **2**(7): p. 795-807.
18. Kobayashi, J., et al., *NBS1 and its functional role in the DNA damage response*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**(8-9): p. 855-61.
19. Kobayashi, J., et al., *NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain*. Curr Biol, 2002. **12**(21): p. 1846-51.
20. Assenmacher, N. and K.P. Hopfner, *MRE11/RAD50/NBS1: complex activities*. Chromosoma, 2004. **113**(4): p. 157-66.
21. Peterson, C.L. and J. Cote, *Cellular machineries for chromosomal DNA repair*. Genes Dev, 2004. **18**(6): p. 602-16.
22. Pitcher, R.S., T.E. Wilson, and A.J. Doherty, *New insights into NHEJ repair processes in prokaryotes*. Cell Cycle, 2005. **4**(5): p. 675-8.
23. de Jager, M., et al., *DNA end-binding specificity of human Rad50/Mre11 is influenced by ATP*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(20): p. 4425-31.
24. Lee, J.H., et al., *Regulation of Mre11/Rad50 by Nbs1: effects on nucleotide-dependent DNA binding and association with ataxia-telangiectasia-like disorder mutant complexes*. J Biol Chem, 2003. **278**(46): p. 45171-81.
25. Trujillo, K.M., et al., *Yeast xrs2 binds DNA and helps target rad50 and mre11 to DNA ends*. J Biol Chem, 2003. **278**(49): p. 48957-64.
26. Moore, J.K. and J.E. Haber, *Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(5): p. 2164-73.
27. Boulton, S.J. and S.P. Jackson, *Saccharomyces cerevisiae Ku70 potentiates illegitimate DNA double-strand break repair and serves as a barrier to error-prone DNA repair pathways*. Embo J, 1996. **15**(18): p. 5093-103.
28. Milne, G.T., et al., *Mutations in two Ku homologs define a DNA end-joining repair pathway in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(8): p. 4189-98.
29. Dudasova, Z., A. Dudas, and M. Chovanec, *Non-homologous end-joining factors of Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Rev, 2004. **28**(5): p. 581-601.
30. Harfst, E., et al., *Normal V(D)J recombination in cells from patients with Nijmegen breakage syndrome*. Mol Immunol, 2000. **37**(15): p. 915-29.

31. Yamaguchi-Iwai, Y., et al., *Mre11 is essential for the maintenance of chromosomal DNA in vertebrate cells*. *Embo J*, 1999. **18**(23): p. 6619-29.
32. Huang, J. and W.S. Dynan, *Reconstitution of the mammalian DNA double-strand break end-joining reaction reveals a requirement for an Mre11/Rad50/NBS1-containing fraction*. *Nucleic Acids Res*, 2002. **30**(3): p. 667-74.
33. Paques, F. and J.E. Haber, *Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999. **63**(2): p. 349-404.
34. D'Amours, D. and S.P. Jackson, *The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. **3**(5): p. 317-27.
35. Jongmans, W., et al., *Nijmegen breakage syndrome cells fail to induce the p53-mediated DNA damage response following exposure to ionizing radiation*. *Mol Cell Biol*, 1997. **17**(9): p. 5016-22.
36. Buscemi, G., et al., *Chk2 activation dependence on Nbs1 after DNA damage*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(15): p. 5214-22.
37. Tauchi, H., et al., *Nijmegen breakage syndrome gene, NBS1, and molecular links to factors for genome stability*. *Oncogene*, 2002. **21**(58): p. 8967-80.
38. Varon, R., et al., *Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome*. *Cell*, 1998. **93**(3): p. 467-76.
39. Stewart, G.S., et al., *The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder*. *Cell*, 1999. **99**(6): p. 577-87.
40. Chrzanowska, K.H.K., W. J.; Krajewska-Walasek, M.; Bialecka, M.; Gutkowska, A.; Goryluk-Kozakiewicz, B.; Michalkiewicz, J.; Stachowski, J.; Gregorek, H.; Lyson-Wojciechowska, G.; Janowicz, W.; Jozwiak, S., *Eleven Polish patients with microcephaly, immunodeficiency and chromosomal instability: the Nijmegen breakage syndrome*. *Am. J. Med. Genet*, 1995. **57**: p. 462-471.
41. van der Burgt, I.C., K. H.; Smeets, D.; Weemaes, C, *Nijmegen breakage syndrome*. *J. Med. Genet*, 1996. **33**: p. 153-156.
42. Matsuura, S., et al., *Positional cloning of the gene for Nijmegen breakage syndrome*. *Nat Genet*, 1998. **19**(2): p. 179-81.
43. Delia, D., et al., *MRE11 mutations and impaired ATM-dependent responses in an Italian family with ataxia-telangiectasia-like disorder*. *Hum Mol Genet*, 2004. **13**(18): p. 2155-63.
44. Xiao, Y. and D.T. Weaver, *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*, 1997. **25**(15): p. 2985-91.

45. Luo, G., et al., *Disruption of mRad50 causes embryonic stem cell lethality, abnormal embryonic development, and sensitivity to ionizing radiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(13): p. 7376-81.
46. Zhu, J., et al., *Targeted disruption of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to early embryonic lethality in mice*. Curr Biol, 2001. **11**(2): p. 105-9.
47. Unverricht, H., *Die Myoclonic*. 1891: Franz Deuticke, Leipzig.
48. Lundborg, H., *Die progressive Myoclonus-Epilepsie (Unverricht's Myoclonic)*. 1903: Almqvist and Wiksell, Uppsala
49. Norio, R. and M. Koskiniemi, *Progressive myoclonus epilepsy: genetic and nosological aspects with special reference to 107 Finnish patients*. Clin Genet, 1979. **15**(5): p. 382-98.
50. Lalioti, M.D., S.E. Antonarakis, and H.S. Scott, *The epilepsy, the protease inhibitor and the dodecamer: progressive myoclonus epilepsy, cystatin b and a 12-mer repeat expansion*. Cytogenet Genome Res, 2003. **100**(1-4): p. 213-23.
51. Koskiniemi, M., E. Toivakka, and M. Donner, *Progressive myoclonus epilepsy. Electroencephalographical findings*. Acta Neurol Scand, 1974. **50**(3): p. 333-59.
52. Lehesjoki, A.E., et al., *Localization of a gene for progressive myoclonus epilepsy to chromosome 21q22*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(9): p. 3696-9.
53. Pennacchio, L.A., et al., *Mutations in the gene encoding cystatin B in progressive myoclonus epilepsy (EPM1)*. Science, 1996. **271**(5256): p. 1731-4.
54. Di Giaimo, R., et al., *New insights into the molecular basis of progressive myoclonus epilepsy: a multiprotein complex with cystatin B*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(23): p. 2941-50.
55. Lehesjoki, A.E., *Molecular background of progressive myoclonus epilepsy*. Embo J, 2003. **22**(14): p. 3473-8.
56. Lalioti, M.D., et al., *A PCR amplification method reveals instability of the dodecamer repeat in progressive myoclonus epilepsy (EPM1) and no correlation between the size of the repeat and age at onset*. Am J Hum Genet, 1998. **62**(4): p. 842-7.
57. Lafreniere, R.G., et al., *Unstable insertion in the 5' flanking region of the cystatin B gene is the most common mutation in progressive myoclonus epilepsy type 1, EPM1*. Nat Genet, 1997. **15**(3): p. 298-302.
58. Delgado-Escueta, A.V., S. Ganesh, and K. Yamakawa, *Advances in the genetics of progressive myoclonus epilepsy*. Am J Med Genet, 2001. **106**(2): p. 129-38.
59. Lalioti, M.D., et al., *Identification of mutations in cystatin B, the gene responsible for the Unverricht-Lundborg type of progressive myoclonus epilepsy (EPM1)*. Am J Hum Genet, 1997. **60**(2): p. 342-51.

60. Bespalova, I.N., M. Pranzatelli, and M. Burmeister, *G to C transversion at a splice acceptor site causes exon skipping in the cystatin B gene*. *Mutat Res*, 1997. **382**(1-2): p. 67-74.
61. Lafora., G.R., *Über das vorkommen amyloider körperchen im innern der ganglienzellen; zugleich ein beitrag zum studium der amyloiden substanz im nervensystem*. *Virchows. Arch. Path. Anat.*, 1911. **205**: p. 295–303.
62. Minassian, B.A., *Lafora's disease: towards a clinical, pathologic, and molecular synthesis*. *Pediatr Neurol*, 2001. **25**(1): p. 21-9.
63. Minassian, B.A., et al., *Mutations in a gene encoding a novel protein tyrosine phosphatase cause progressive myoclonus epilepsy*. *Nat Genet*, 1998. **20**(2): p. 171-4.
64. Minassian, B.A., *Progressive myoclonus epilepsy with polyglucosan bodies: Lafora disease*. *Adv Neurol*, 2002. **89**: p. 199-210.
65. Chan, E.M., et al., *Mutations in NHLRC1 cause progressive myoclonus epilepsy*. *Nat Genet*, 2003. **35**(2): p. 125-7.
66. Ganesh, S., et al., *Targeted disruption of the Epm2a gene causes formation of Lafora inclusion bodies, neurodegeneration, ataxia, myoclonus epilepsy and impaired behavioral response in mice*. *Hum Mol Genet*, 2002. **11**(11): p. 1251-62.
67. Mole, S.E., R.E. Williams, and H.H. Goebel, *Correlations between genotype, ultrastructural morphology and clinical phenotype in the neuronal ceroid lipofuscinoses*. *Neurogenetics*, 2005. **6**(3): p. 107-26.
68. Seehafer, S.S. and D.A. Pearce, *You say lipofuscin, we say ceroid: defining autofluorescent storage material*. *Neurobiol Aging*, 2006. **27**(4): p. 576-88.
69. Berkovic, S.F., et al., *Myoclonus epilepsy and ragged-red fibres (MERRF). 1. A clinical, pathological, biochemical, magnetic resonance spectrographic and positron emission tomographic study*. *Brain*, 1989. **112 (Pt 5)**: p. 1231-60.
70. Fukuhara, N., et al., *Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibres (mitochondrial abnormalities): disease entity or a syndrome? Light-and electron-microscopic studies of two cases and review of literature*. *J Neurol Sci*, 1980. **47**(1): p. 117-33.
71. So, N., et al., *Myoclonus epilepsy and ragged-red fibres (MERRF). 2. Electrophysiological studies and comparison with other progressive myoclonus epilepsies*. *Brain*, 1989. **112 (Pt 5)**: p. 1261-76.
72. Shoffner, J.M., et al., *Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation*. *Cell*, 1990. **61**(6): p. 931-7.
73. Moraes, C.T., et al., *Two novel pathogenic mitochondrial DNA mutations affecting organelle number and protein synthesis. Is the tRNA(Leu(UUR)) gene an etiologic hot spot?* *J Clin Invest*, 1993. **92**(6): p. 2906-15.

74. Nakamura, M., et al., *A novel point mutation in the mitochondrial tRNA(Ser(UCN)) gene detected in a family with MERRF/MELAS overlap syndrome*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **214**(1): p. 86-93.
75. Mancuso, M., et al., *A novel mitochondrial tRNAPhe mutation causes MERRF syndrome*. Neurology, 2004. **62**(11): p. 2119-21.
76. Melone, M.A., et al., *Revelation of a new mitochondrial DNA mutation (G12147A) in a MELAS/MERFF phenotype*. Arch Neurol, 2004. **61**(2): p. 269-72.
77. Naini, A.B., et al., *Novel mitochondrial DNA ND5 mutation in a patient with clinical features of MELAS and MERRF*. Arch Neurol, 2005. **62**(3): p. 473-6.
78. Rapin, I., et al., *The cherry-red spot--myoclonus syndrome*. Ann Neurol, 1978. **3**(3): p. 234-42.
79. Pshezhetsky, A.V., et al., *Cloning, expression and chromosomal mapping of human lysosomal sialidase and characterization of mutations in sialidosis*. Nat Genet, 1997. **15**(3): p. 316-20.
80. Seyrantepe, V., et al., *Molecular pathology of NEU1 gene in sialidosis*. Hum Mutat, 2003. **22**(5): p. 343-52.
81. Engel, J., Jr., I. Rapin, and D.R. Gibling, *Electrophysiological studies in two patients with cherry red spot--myoclonus syndrome*. Epilepsia, 1977. **18**(1): p. 73-87.
82. Palmeri, S., et al., *Type I sialidosis: a clinical, biochemical and neuroradiological study*. Eur Neurol, 2000. **43**(2): p. 88-94.
83. Galjart, N.J., et al., *Expression of cDNA encoding the human "protective protein" associated with lysosomal beta-galactosidase and neuraminidase: homology to yeast proteases*. Cell, 1988. **54**(6): p. 755-64.
84. Kaguni, L.S., *DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase*. Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 293-320.
85. Longley, M.J., et al., *Consequences of mutations in human DNA polymerase gamma*. Gene, 2005. **354**: p. 125-31.
86. Winterthun, S., et al., *Autosomal recessive mitochondrial ataxic syndrome due to mitochondrial polymerase gamma mutations*. Neurology, 2005. **64**(7): p. 1204-8.
87. Van Goethem, G., et al., *Patient homozygous for a recessive POLG mutation presents with features of MERRF*. Neurology, 2003. **61**(12): p. 1811-3.
88. Lander, E.S. and D. Botstein, *Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children*. Science, 1987. **236**(4808): p. 1567-70.
89. Dib, C., et al., *A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites*. Nature, 1996. **380**(6570): p. 152-4.

90. Woods, C.G. and A.M.R. Taylor, *Ataxia telangiectasia in the British Isles: The clinical and laboratory features of 70 affected individuals*. Q J Med, 1992. **298**: p. 169-179.
91. Bomont, P., et al., *The gene encoding gigaxonin, a new member of the cytoskeletal BTB/kelch repeat family, is mutated in giant axonal neuropathy*. Nat Genet, 2000. **26**(3): p. 370-4.
92. Piao, X., et al., *G protein-coupled receptor-dependent development of human frontal cortex*. Science, 2004. **303**(5666): p. 2033-6.
93. Collins, F.S., *Positional cloning: let's not call it reverse anymore*. Nat Genet, 1992. **1**(1): p. 3-6.
94. Botstein, D., et al., *Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms*. Am J Hum Genet, 1980. **32**(3): p. 314-31.
95. White, R., et al., *Construction of linkage maps with DNA markers for human chromosomes*. Nature, 1985. **313**(5998): p. 101-5.
96. Beckmann, J. and J. Weber, *survey of human and rat microsatellites*. Genomics, 1992. **12**: p. 627-631.
97. Moreira, M.C., et al., *The gene mutated in ataxia-ocular apraxia 1 encodes the new HIT/Zn-finger protein aprataxin*. Nat Genet, 2001. **29**(2): p. 189-93.
98. Moreira, M.C., et al., *Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2*. Nat Genet, 2004. **36**(3): p. 225-7.
99. Ouahchi, K., et al., *Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the alpha-tocopherol transfer protein*. Nat Genet, 1995. **9**(2): p. 141-5.
100. Campuzano, V., et al., *Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion*. Science, 1996. **271**(5254): p. 1423-7.
101. Schapira, A.H., *Mitochondrial disease*. Lancet, 2006. **368**(9529): p. 70-82.
102. Blencowe, B.J., *Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(3): p. 106-10.
103. Pozzoli, U. and M. Sironi, *Silencers regulate both constitutive and alternative splicing events in mammals*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(14): p. 1579-604.
104. Sakamoto, O., et al., *A novel intronic mutation of the TAZ (G4.5) gene in a patient with Barth syndrome: creation of a 5' splice donor site with variant GC consensus and elongation of the upstream exon*. Hum Genet, 2001. **109**(5): p. 559-63.
105. Bagnall, R.D., et al., *Creation of a novel donor splice site in intron 1 of the factor VIII gene leads to activation of a 191 bp cryptic exon in two haemophilia A patients*. Br J Haematol, 1999. **107**(4): p. 766-71.

106. Taylor AMR, et al., *Leukemia and lymphoma in ataxiatelangiectasia*. Blood, 1996. **87**: p. 423-38.
107. Swift, M., *Genetic aspects of ataxia-telangiectasia*, in *Advances in neurology*, A. Harding and T. Deufel, Editors. 1993, Raven Press: New York. p. 115-25.
108. Morgan, J., T. Holcomb, and R. Morrissey, *Radiation reaction in ataxia-telangiectasia*. Am J Dis Child, 1968. **116**: p. 557-8.
109. Arush, M.W.B., et al., *Ataxia-telangiectasia and lymphoma : an indication for individualized chemotherapy dosing report of treatment in a highly inbred Arab family*. Pediatr Hematol Oncol 1995. **12**: p. 163-9.
110. Resnick, I.B., et al., *Nijmegen breakage syndrome: clinical characteristics and mutation analysis in eight unrelated Russian families*. J. Pediatr, 2002. **140** p. 355-361.
111. Kastan, M.B. and D.S. Lim, *The many substrates and functions of ATM*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(3): p. 179-86.
112. Theunissen, J.W., et al., *Checkpoint failure and chromosomal instability without lymphomagenesis in Mre11(ATLD1/ATLD1) mice*. Mol Cell, 2003. **12**(6): p. 1511-23.
113. Taylor, A.M., A. Groom, and P.J. Byrd, *Ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD)-its clinical presentation and molecular basis*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**(8-9): p. 1219-25.
114. Warner, J.P., et al., *A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR*. J Med Genet, 1996. **33**(12): p. 1022-6.

**Publications résultant du travail de thèse
mais non décrits dans ce rapport**

SHORT REPORT

Homozygosity mapping of a third Joubert syndrome locus to 6q23

C Lagier-Tourenne, E Boltshauser, N Breivik, M Gribaa, C Bétard, C Barbot, M Koenig

J Med Genet 2004;41:273–277. doi: 10.1136/jmg.2003.014787

Background: Joubert syndrome (JS) is a recessively inherited disorder characterised by hypotonia at birth and developmental delay, followed by truncal ataxia and cognitive impairment, characteristic neuroimaging findings (cerebellar vermis hypoplasia, “molar tooth sign”) and suggestive facial features. JS is clinically heterogeneous with some patients presenting with breathing abnormalities in the neonatal period, oculomotor apraxia, retinal dystrophy, retinal coloboma, ptosis, hexadactyly, and nephronophthisis or cystic dysplastic kidneys. JS is also genetically heterogeneous, with two known loci, on 9q34 (JBTS1) and 11p11-q12 (CORS2), representing only a fraction of cases.

Methods: A large consanguineous Joubert family (five affected) was analysed for linkage with a marker set covering the entire genome and 16 smaller families were subsequently tested for candidate loci.

Results: We report here the identification of a third locus in 6q23 (JBTS3) from the study of two consanguineous families. LOD score calculation, including the consanguinity loops, gave a maximum value of 4.1 and 2.3 at $q=0$ for the two families, respectively.

Conclusions: Linkage between the disease and the D6S1620–D6S1699 haplotype spanning a 13.1 cM interval is demonstrated. Genotype-phenotype studies indicate that, unlike CORS2, JBTS3 appears not to be associated with renal dysfunction.

Joubert syndrome (JS) (also known as Joubert-Boltshauser syndrome) is a recessively inherited disorder first described by Joubert *et al*¹ in a family of Canadian origin and further characterised by Boltshauser and Isler² in families of Swiss and German origin. Since then, many cases have been reported with various geographic origins. Consistent features of this condition are developmental delay, hypotonia, cerebellar ataxia, and suggestive facial features. Abnormalities on axial MRI are the neuroimaging hallmarks of JS, and include cerebellar vermis hypoplasia and abnormalities at the pontomesencephalic junction that lead to a characteristic “molar tooth” appearance.³ This neuro-radiological pattern results from an abnormally deep interpeduncular fossa and thick superior cerebellar peduncles orientated perpendicular to the brainstem. A wide clinical variability within the sibships and between families is observed with a marked variation in severity and the inconsistent presence of the following features: episodic apnea-hyperpnea which disappears with increasing age, abnormal eye movements (jerky eye movements, nystagmus, delay in saccadic initiation), rhythmic protrusion of the tongue, occipital meningoencephalocele, polydactyly, nephronophthisis or cystic dysplasia of the kidney, chorioretinal coloboma, and retinal dysplasia. There is a significant clinical

overlap between JS and other cerebello-oculo-renal syndromes (CORS) such as Arima, Senior-Loken, and COACH syndromes, and further molecular investigations should help to achieve a final classification of these conditions.⁴ This wide clinical heterogeneity hampers the gathering together of families into genetically homogeneous groups needed for linkage studies. Indeed, the first linkage studies failed to identify a specific chromosomal locus for JS providing evidence that JS and related syndromes are genetically heterogeneous.^{5–6} In addition, candidate gene approaches have failed so far to detect mutations in the *WNT1*, *EN1*, *EN2*, and *FGF8* genes of patients with JS.^{6,7} Homozygosity mapping can be used as an alternative method to bypass the problem of genetic heterogeneity by studying large consanguineous families with autosomal recessive disorder.⁸ Using this strategy, Saar *et al* identified a JS locus on chromosome 9q34.3 (JBTS1) in two families of Omani origin.⁹ However most of the families studied by Blair *et al*⁶ and by us (unpublished results) are excluded for linkage to this locus. Recently, Valente *et al*¹⁰ and Keeler *et al*¹¹ identified a second JS locus associated with nephronophthisis on chromosome 11p11-q12 (cerebello-oculo-renal syndrome 2, CORS2). We report here the identification of a third locus on 6q23 (JBTS3) from the study of two consanguineous families, including the second reported JS family.² On the other hand, linkage to 6q23 was excluded for nine out of 15 additional families diagnosed with JS, the remaining families being too small to allow conclusions to be drawn.

METHODS

Subjects

In family 1, of Turkish origin, five children born from consanguineous parents have Joubert syndrome (fig 1, table 1). All affected individuals have marked cognitive impairment, requiring special education. Expressive speech was markedly affected, and two children remained without verbal communication. Motor milestones were extremely slow and the ability to walk unaided was never reached before the age of 7 years, reflecting hypotonia and truncal ataxia. The patients had significantly reduced vision with retinal dystrophy at later ages, but no nystagmus and no retinal coloboma. Electroretinography was not performed. There was no evidence of renal dysfunction and all patients had normal serum creatinin levels at their present ages, ranging from 17 to 28 years. Neuroimaging confirmed cerebellar vermis hypoplasia and molar tooth sign. All patients, the parents, and three out of five healthy siblings were available for study.

Family 2, of Swiss origin, is one of the original families described by Boltshauser and Isler.² The parents are third

Abbreviations: CORS, cerebello-oculo-renal syndrome; JS, Joubert syndrome

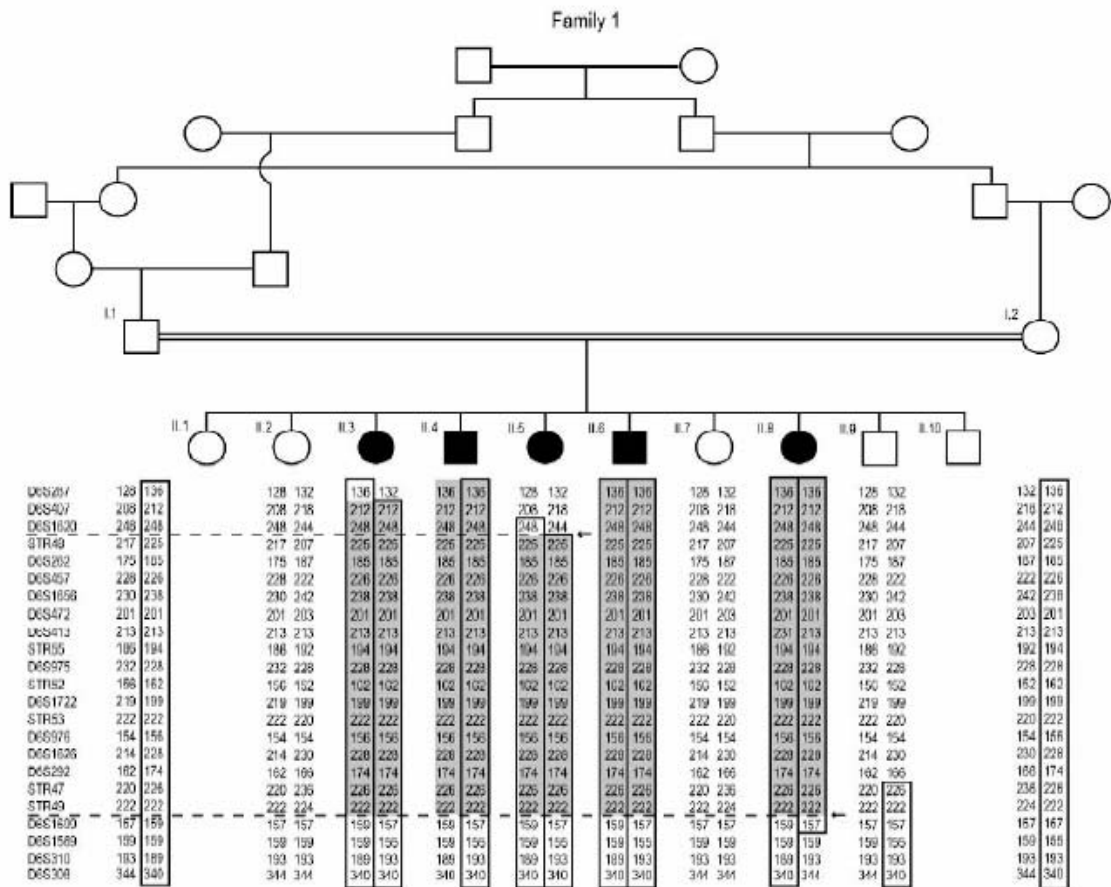


Figure 1 Genotyping results of family 1 for the chromosome 6q23 region. DNA samples of healthy siblings II.1 and II.2 were not available for study. Markers are indicated on the left and are organised from top to bottom in centromeric to telomeric order. The marker order is based on the UCSC Assembly of Human Genome browser (April 2003 update, <http://genome.ucsc.edu>). Parental haplotypes linked with the disease are boxed. The region of homozygosity by descent is highlighted in grey. Dotted lines indicate the centromeric and telomeric boundaries of the JBTS3 locus defined, respectively, by a maternal recombination in patient II.5 and heterozygosity in patients due to an ancestral recombination (arrows).

Table 1 Clinical features of the JBTS3 patients

Clinical features	Family 1				Family 2	
	Turkey		Switzerland		Switzerland	
Origin	1	2	3	4	5*	1 2
Patient	F	M	F	M	F	F F
Sex						
Present age (years)	28	27	23	21	17	† 23
Early hypotonia	+	+	+	+	+	+
Age at independent walking (years)	10	10	9	WCB	WCB	† 7
Cognitive impairment	++	++	++	+++	+++	NA +
Neonatal breathing problems	NA	NA	NA	NA	NA	+ +
Cerebellar ataxia	±	-	+	-	-	+ +
Nystagmus	-	-	+	-	-	+ +
Optic atrophy	-	-	-	-	NA	- -
Retinal dystrophy	-	+	-	-	NA	NA +
Reduced vision	+	+	+	+	+	NA +
Kyphoscoliosis	+	+	-	-	-	- -
Retarded skeletal growth	NA	NA	+	+	+	- -
Renal dysfunction	-	-	-	-	-	- ‡
MTS	+	+	+	+	+	+§ +
Cerebellar vermis hypoplasia	+	+	+	+	+	+ +

F, female; M, male; NA, not available; MTS, molar tooth sign; WCB, wheelchair bound.

*Also presented with spasticity, microcephaly and seizures; †deceased at 23 months; ‡normal kidney histology at autopsy; §abnormal ponto-mesencephalic junction and upper cerebellar peduncles at autopsy.

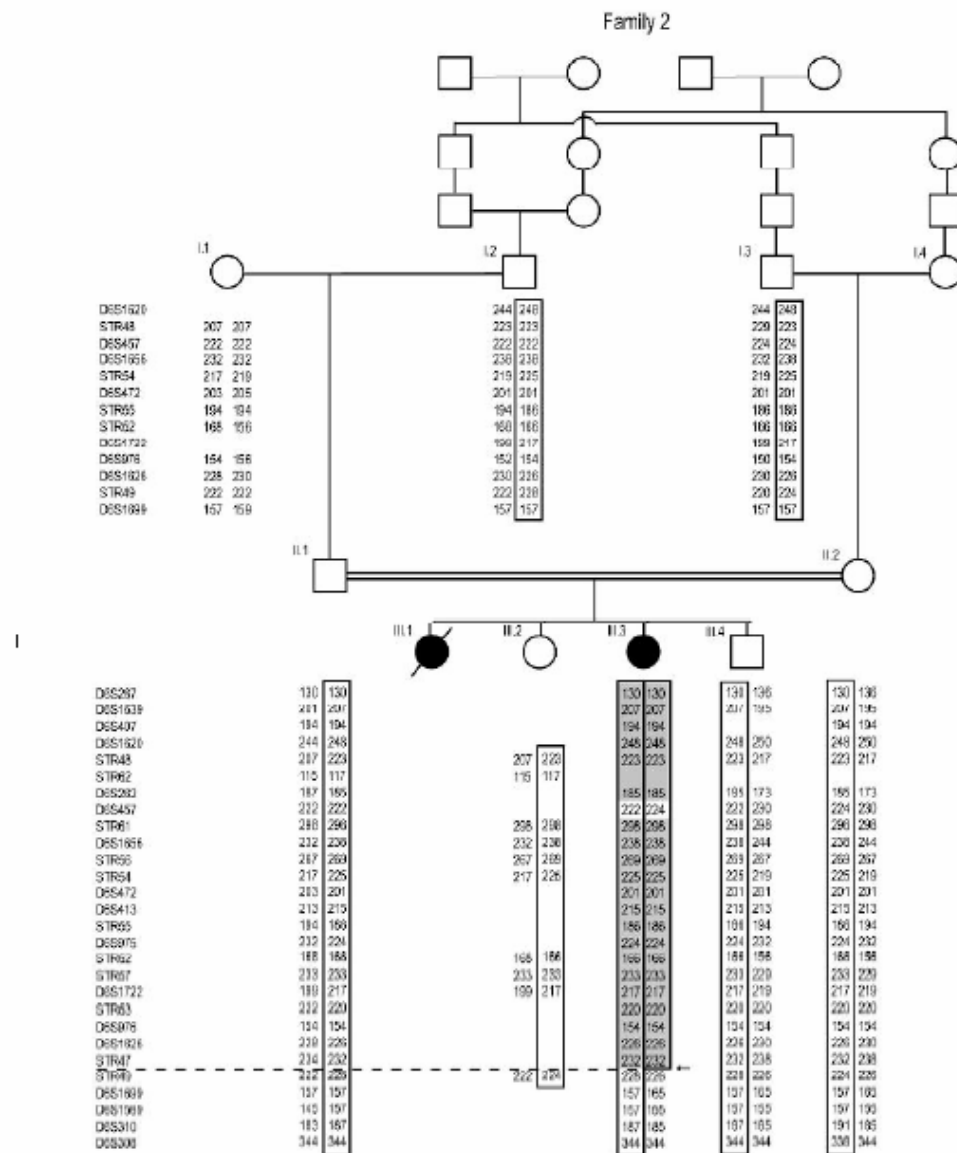


Figure 2 Genotyping results of family 2 for the chromosome 6q23 region. Markers and haplotypes are indicated as in figure 1. The patient is homozygous for 23 consecutive markers, with the exception of D6S457 which is assumed to represent an ancient allelic mutation, since both parents and transmitting grandparents carry different alleles at this locus. The patient is heterozygous for marker STR49 (arrow) and further telomeric markers, allowing reduction of the critical interval. The dotted line defines the telomeric boundary of this interval.

degree cousins and have two healthy children (fig 2). A second affected daughter was born subsequently to the initial report.^{12 13} The index patient had poor developmental progress and died at 23 months of age, before DNA sampling was available. Her autopsy report¹⁴ was the first detailed pathological description of JS. The surviving patient is now 23 years old and has a favourable, but clearly subnormal, cognitive development, with independence in her daily activities and fair reading and writing skills. She has normal ultrasonography of kidney and liver, normal serum creatinin levels, and no evidence of kidney involvement. She has pigmentary retinopathy, which has been non-progressive until now, with flat electroretinogram since the age of 10 (table 1).

Fifteen additional families (22 patients in total) were also included in the study. The selected families had at least one healthy child available for genetic study or had documented

consanguinity. Fourteen patients have been previously described.^{13 15 16} All patients conform to the following diagnostic criteria: hypotonia and developmental delay, followed by truncal ataxia and cognitive impairment, presence on MRI of the molar tooth sign and cerebellar vermis hypoplasia, and suggestive facial features (high-rounded eyebrows, ptosis, broad nasal bridge with mild epicanthus, anteverted nostrils, triangular shaped open mouth, and low-set ears as illustrated in Maria *et al*¹⁷). In addition, some patients presented with breathing abnormalities in the neonatal period, abnormal eye movements, or retinal dystrophy. Two patients, from two families, had renal failure before 12 years of age followed by renal transplantation, and an affected brother had reduced cortico-medullary differentiation on renal ultrasounds and high serum creatinin levels since the age of 10.

Genotyping

Blood samples were obtained with informed consent. Genomic DNA was extracted from the peripheral blood leukocytes by a standard phenol/chloroform method.

A whole-genome screen was initiated with family 1 using a microsatellite marker set developed and commercialised by PE Biosystems (ABI Linkage Mapping Set version 2, medium density set 10, MD-10). This set comprises 400 fluorescently labelled microsatellite markers selected from the Génethon human linkage map,¹⁸ with an average spacing of 10 cM and an average heterozygosity of 75%. PCR-multiplex protocol and fragment analysis were performed as described.¹⁹

Additional CA/TG microsatellite markers from the Génethon human linkage map¹⁸ and new polymorphic markers were amplified with a universal fluoresceinated primer as described.¹⁹ To identify new polymorphic markers, we searched for (CA)_n repeats in the corresponding sequence of the human genome and designed flanking PCR primers for repeats with more than 12 motif units. The primer sequences of the new polymorphic markers, derived from the BAC clones (<http://genome.ucsc.edu>), are given in table 2. All annealing temperatures for PCR amplification were set at 60°C. PCR products were resolved on ABI 377 or ABI 3100 DNA sequencers (PE Applied Biosystems) and analysed using ABI PRISM GeneScan Analysis Software.

Linkage analysis

Part of the linkage power of families 1 and 2 is due to the consanguinity loop(s) and linkage is supported when the patients are homozygous for a rare haplotype.⁸ This information was included in a two-point LOD score calculation by considering the non-recombinant haplotype as a single locus.⁸ The frequency of the homozygous haplotype was calculated as the product of the frequency of the individual alleles estimated from a reference white population. In order to eliminate biases due to possible linkage disequilibrium, only one marker was taken into account when two were less than 500 kb apart on the human genome sequence. Two-point LOD scores with consanguinity loops were calculated by using the MLINK program of the FASTLINK package.²⁰ We assumed a fully penetrant autosomal recessive mode of inheritance, and a gene frequency of 0.001 that certainly represents an upper limit for this rare condition.

RESULTS

A total of 390 markers of the ABI PRISM Linkage Mapping Set were tested with family 1. Given the close consanguinity of the parents and the close spacing of the markers, we selected the regions for which at least one marker was homozygous in all five affected individuals and heterozygous in the three healthy siblings. We identified only one such

region, on chromosome 6q23, in which the consecutive markers D6S262 and D6S292 were homozygous in all patients. The study of a dense set of microsatellite markers from this region confirmed linkage to the 6q23 locus, since the five patients were homozygous for at least 16 consecutive markers and the healthy siblings were heterozygous for 14 of these markers (fig 1). LOD score calculation, including the consanguinity loop,^{8,21} gave a value of 4.1 at a recombination fraction θ of 0, demonstrating linkage between the disease and the 6q23 haplotype. On the centromeric side, a maternal recombination in patient II.5 excluded marker D6S1620 from linkage. On the other side, marker D6S1699 and further telomeric markers were heterozygous in all patients, indicating the occurrence of an ancestral recombination. The recombinant markers define a 13.1 cM interval containing the JS gene.

The set of 6q23 microsatellite markers was tested in 16 smaller families, of which six had documented consanguinity. Linkage to 6q23 was excluded in nine families either because patients and a healthy sibling shared the same haplotypes or because homozygosity by descent was not present in consanguineous families. Five of these families were compatible with linkage to CORS2, and three to JBTS1, including two compatible with both (LOD scores in favour of linkage ranging from 0.25 to 1.1, not shown). Six families were compatible with linkage to 6q23, albeit this is most likely due to small family size in most cases (LOD scores in favour of linkage ranging from 0.125 to 0.725), since five of these families were equally linked to the CORS2 locus, and two to the JBTS1 locus (not shown). In all cases, sufficient markers were tested in order to have fully informative families. Finally, linkage to 6q23 was demonstrated for family 2. The affected patient was homozygous for 22 consecutive markers (with the exception of a probable allelic mutation at D6S457) and the two healthy siblings did not share the same haplotypes (fig 2). LOD score calculation, including the consanguinity loops, gave a value of 2.3, at a recombination fraction θ of 0, demonstrating linkage between the disease and the 6q23 locus in this family.²² Marker STR49, which is 1.3 Mb centromeric to D6S1699, as well as more distal markers were heterozygous in the patient, allowing us to reduce the critical interval and to exclude seven genes located between STR49 and D6S1699 from being candidate JS genes. The final interval is 8.2 Mb in size and contains 45 known genes. None of them seemed to be a good candidate gene for Joubert syndrome.

DISCUSSION

Despite early descriptions of JS in 1969 and 1977,^{1,2} and numerous subsequent reports since then, the search for the defective genes has remained elusive so far, mostly due to tremendous heterogeneity both at the clinical and genetic levels. Identification of a first JS locus on chromosome 9q34 (JBTS1),⁹ confirmed this heterogeneity, since most JS families are not linked to this locus.^{6,9} We report here the identification of another locus, on 6q23, based on homozygosity of patients in two consanguineous families. While the LOD score in favour of linkage in family 1 (4.1) is sufficient to demonstrate the existence of this locus, the LOD score for family 2 (2.3) is sufficient to confirm that it is linked to the same locus as family 1. Here again, the JS locus represents only a fraction of the JS families. Indeed, it is anticipated that in most of the six small families for which the disease segregates with 6q23 it does so by chance and only a few subjects will have mutations in the 6q23 locus.

Another locus has recently been identified on chromosome 11p11-q12, based on the study of a large Sicilian consanguineous family¹⁰ and of three smaller consanguineous families.¹¹ In the Sicilian family, two patients also developed

Table 2 Primer sequences for PCR amplification of the new microsatellite markers

Marker	Primer sequence	BAC clones	Size (bp)
STR48	5'-aagtaggtctgctgtttcca-3'	AL358943	~210
	5'-tgttccaaagldtctctcatcc-3'		
STR55	5'-atcaccactgaccacaga-3'	AL513524	~190
	5'-gdtcaactctatccaggttt-3'		
STR52	5'-caacaaggccaagagaaggt-3'	AC068005	~160
	5'-gdtggggagagatcaagg-3'		
STR53	5'-adctcagldggttacctagagttt-3'	AC023293	~220
	5'-tggtcaagtggtggcttc-3'		
STR47	5'-agtttctggcaccctctat-3'	AL023284	~230
	5'-cactcactgaggtgctt-3'		
STR49	5'-tgcacagttgcccacatd-3'	AL357060	~220
	5'-cacccagtgaaaagcaacaa-3'		

renal failure at age 17 and 15, respectively, while the two youngest patients, aged 12 and 8 years, had only altered urinary concentration test and no polyuria/polydipsia. Three patients had increased kidney echogenicity but no renal cysts. None had retinal abnormalities. Patients from the three smaller families were clinically heterogeneous and presented with either kidney cysts, suggestive nephrocalcinosis, posterior encephalocele, hydrocephalus, corpus callosum and occipital lobe dysplasia, coloboma of the retina, or retinal dystrophy.¹¹ The age at last examination of patients without renal problems was not indicated. The 11p11-q12 locus was named CORS2 for cerebello-oculo-renal syndrome, with JBTS1 corresponding to CORS1. CORS2 patients contrast with the six patients of families 1 and 2, who have not developed renal failure past the age of 17. Moreover, reduced vision with retinal dystrophy was found in both families, while retinal presentation of CORS2 patients was more heterogeneous. The 6q23 locus was therefore named JBTS3, which may correspond to CORS3 if future linked families reveal renal heterogeneity. The knowledge of three JS loci opens up the possibility of investigating genotype/phenotype correlations that should help clarify nosologic delineation among CORS and facilitate the search for defective genes from homogeneous patient groups.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank Drs D Chaigne, J Messer, and B Rouselle for referring JS samples and clinical information, Dr E M Valente for sharing data prior to publication, and M Moreira and J-L Mandel for helpful discussion and support. We also wish to thank L Reutenauer, E Troesch, F Ruffenach, I Colas, and S Vicaire for excellent technical help.

Authors' affiliations

C Lagier-Tourenne, M Gribaa, M Koenig, IGBMC, CNRS/INSERM/ULP, Illkirch, C.U. de Strasbourg, France
 E Boltshausen, Department of Neurology, Children's University Hospital, Zürich, Switzerland
 N Breivik, Department of Paediatrics, Aalesund Hospital, Aalesund, Norway
 C Bétard, Centre National de Génotypage, Evry, France
 C Barbot, Department of Neurology, Hospital Maria Pia, Porto, Portugal

Genetic studies were supported by funds from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (PHRC régional), and the GIS-Maladies Rares. CL-T was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale and by the Association Française contre les Myopathies.

Conflict of interest: none declared.

Correspondence to: Professor M Koenig, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 1 rue Laurent Fries BP10142, 67404 Illkirch cedex, C.U. de Strasbourg, France; mkoenig@igbmc.u-strasbg.fr

Revised version received 1 January 2004

Accepted for publication 6 January 2004

REFERENCES

- Joubert M, Eisenring JJ, Robb JP, Andermann F. Familial agenesis of the cerebellar vermis. A syndrome of episodic hyperpnea, abnormal eye movements, ataxia, and retardation. *Neurology* 1969;19:813-25.
- Boltshausen E, Isler W. Joubert syndrome: episodic hyperpnea, abnormal eye movements, retardation and ataxia, associated with dysplasia of the cerebellar vermis. *Neuropadiatrie* 1977;8:57-66.
- Maria BL, Hoang KB, Tusa RJ, Mancuso AA, Hamed LM, Quisling RG, Howe MT, Fennell EB, Booth-Jones M, Ringdahl DM, Yachnis AT, Creel G, Frerking B. 'Joubert syndrome' revisited: key ocular motor signs with magnetic resonance imaging correlation. *J Child Neurol* 1997;12:423-30.
- Satran D, Pierpont ME, Dobyns WB. Cerebello-oculo-renal syndromes including Arima, Senior-Loken and COACH syndromes: more than just variants of Joubert syndrome. *Am J Med Genet* 1999;86:459-69.
- Chance PF, Cavalier L, Satran D, Pellegrino JE, Koenig M, Dobyns WB. Clinical nosologic and genetic aspects of Joubert and related syndromes. *J Child Neurol* 1999;14:660-6, discussion 669-72.
- Blair IP, Gibson RR, Bennett CL, Chance PF. Search for genes involved in Joubert syndrome: evidence that one or more major loci are yet to be identified and exclusion of candidate genes EN1, EN2, FGF8, and BARHL1. *Am J Med Genet* 2002;107:190-6.
- Pellegrino JE, Lench MW, Muenke M, Chance PF. Clinical and molecular analysis in Joubert syndrome. *Am J Med Genet* 1997;72:59-62.
- Ben Hamida C, Daerflinger N, Belal S, Linder C, Reutenauer L, Dib C, Gyapay G, Vignat A, Le Paslier D, Cohen D, Pandolfo M, Mokini V, Novelli G, Hentati F, Ben Hamida M, Mandel J-L, Koenig M. Localization of Friedreich ataxia phenotype with selective vitamin E deficiency to chromosome 8q by homozygosity mapping. *Nat Genet* 1993;5:195-200.
- Saar K, Al-Gazzali L, Sztrika L, Rueschendorf F, Nur EKM, Reis A, Bayoumi R. Homozygosity mapping in families with Joubert syndrome identifies a locus on chromosome 9q34.3 and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1999;65:1666-71.
- Valente EM, Salpietro DC, Brancati F, Bertini E, Galluccio T, Tortorella G, Briuglia S, Dallapiccola B. Description, nomenclature, and mapping of a novel cerebello-renal syndrome with the molar tooth malformation. *Am J Hum Genet* 2003;73:663-70.
- Keeler LC, Marsh SE, Leeflang EP, Woods CG, Sztrika L, Al-Gazzali L, Gururaj A, Gleason JG. Linkage analysis in families with Joubert syndrome plus ocular-renal involvement identifies the CORS2 locus on chromosome 11p12-q13.3. *Am J Hum Genet* 2003;73:656-62.
- Boltshausen E, Herdan M, Dumermuth G, Isler W. Joubert syndrome: clinical and polygraphic observations in a further case. *Neuropadiatrie* 1981;12:181-91.
- Steinlin M, Schmid M, Landau K, Boltshausen E. Follow-up in children with Joubert syndrome. *Neuropadiatrie* 1997;28:204-11.
- Friede RL, Boltshausen E. Uncommon syndromes of cerebellar vermis aplasia. I: Joubert syndrome. *Dev Med Child Neurol* 1978;20:758-63.
- Boltshausen E, Forster I, Deanna T, Willi U. Joubert syndrome: are kidneys involved? *Neuropadiatrie* 1995;26:320-1.
- Barreirinho MS, Teixeira J, Moreira NC, Bastos S, Goncalves S, Barbot MC. Síndrome de Joubert: revisão de 12 casos [Joubert's syndrome: report of 12 cases]. *Rev Neurol* 2001;32:812-7.
- Maria BL, Boltshausen E, Palmer SC, Tran TX. Clinical features and revised diagnostic criteria in Joubert syndrome. *J Child Neurol* 1999;14:583-91.
- Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Draoui N, Vignat A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 1996;380:152-4.
- Lagier-Tourenne C, Tranebjaerg L, Chaigne D, Gribaa M, Dollfus H, Silvestri G, Bétard C, Warter J, Koenig M. Homozygosity mapping of Marfanoid-Sjögren syndrome to 5q31. *Eur J Hum Genet* 2003;11:770-8.
- Cottingham RW, Idury RM, Schaffer AA. Faster sequential genetic linkage computations. *Am J Hum Genet* 1993;53:252-63.
- Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J. Multilocus linkage analysis in humans: detection of linkage and estimation of recombination. *Am J Hum Genet* 1985;37:482-98.
- Ott J. *Analysis of human genetic linkage*. Baltimore, MD: John Hopkins University Press, 1991.

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Homozygosity mapping of Marinesco-Sjögren syndrome to 5q31

C Lagier-Tourenne, L Tranebjærg, D Chaigne, **M Gribaa**, H Dollfus, G Silvestri, C Bétard, J M Warter et M Koenig

European Journal of Human Genetics, 2003, Vol. 11, Pages 770-778

Pages 770 à 778 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://www.nature.com/ejhg/journal/v11/n10/full/5201068a.html>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Distinguishing the four genetic causes of jouberts syndrome-related disorders

Enza Maria Valente, MD, PhD , Sarah E. Marsh, MS, Marco Castori, MD, Tracy Dixon-Salazar, BS, Enrico Bertini, MD, Lihadh Al-Gazali, MD, Jean Messer, MD, Clara Barbot, MD, C. Geoffrey Woods, MD, PhD, Eugen Boltshauser, MD, Asma A. Al-Tawari, MD, Carmelo D. Salpietro, MD, Hulya Kayserili, MD, László Sztriha, MD, PhD, **Moez Gribaa**, MD, Michel Koenig, MD, PhD, Bruno Dallapiccola, MD, Joseph G. Gleeson, MD

Annals of Neurology, 2005, Vol. 57, Pages 513-519

Pages 513 à 519 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/110432587/HTMLSTART>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

RESUME

Les ataxies cérébelleuses progressives représentent un groupe hétérogène de maladies neurologiques. Certaines formes de ces ataxies ont une transmission autosomique récessive et sont génétiquement et moléculairement bien caractérisées. Pour les autres, le gène en cause soit n'est pas encore connu soit la protéine qu'il code a une fonction qui est mal ou pas encore connue.

Au cours de ma thèse j'ai principalement étudié 3 formes particulières d'ataxie. Dans le but de m'affranchir du problème de l'hétérogénéité génétique de ces maladies, ma stratégie a consisté à identifier des nouveaux loci à partir de grandes familles consanguines par cartographie par homozygotie dont la liaison génétique permet de générer un LOD score supérieur ou égal à 3 pour chacune d'elle.

La première forme est représentée par l'ataxie spinocérébelleuse avec cécité et surdité (SCABD). Il s'agit d'une ataxie associée à une atrophie optique et une surdité de perception d'évolution progressive décrite pour la première fois en 1974 par Van Bogaert et Martin. Le locus associé à ce syndrome a été identifié en 6p21-22. L'étude de liaison d'autres familles consanguines m'a permis de trouver 2 autres familles liées à ce locus. La combinaison des régions d'homozygotie dans ces familles m'a permis de réduire la région en cause à 3,5 mégabases. Cette région compte 27 gènes de protéines non-histones. Le séquençage de l'ensemble de leurs exons ne nous a pas permis de trouver des mutations susceptibles d'être la cause du syndrome SCABD. Ce résultat négatif m'a conduit à remettre en cause l'une des deux familles. L'analyse des deux patients de cette famille avec les nouvelles micropuces de génotypage à haute densité (50.000 SNP) a permis d'identifier une liaison à d'autres loci. Si cette hypothèse se confirme, le locus en 6p21-22 inclut une grande région plus centromérique n'ayant pas encore été explorée.

La deuxième forme concerne le syndrome de l'Ataxia Telangiectasia-like disease qui associe une ataxie cérébelleuse progressive à une instabilité chromosomique mais, à l'inverse de l'ataxie télangiectasie, elle ne présente ni télangiectasie ni déficit immunitaire. Elle est secondaire à des mutations du gène *MRE11*. J'ai étudié, par liaison génétique, deux grandes familles consanguines originaires d'Arabie Saoudite. La région d'homozygotie correspond à la bande 11q22-23 qui contient le gène *MRE11*. Le séquençage de ce gène chez les différents patients m'a permis de trouver une transition de G en C en position 630 dans l'exon 7, responsable du remplacement d'un tryptophane par une cystéine (W210C). Cette mutation a été retrouvée par la suite dans une troisième famille d'Arabie Saoudite, indiquant un effet fondateur dans ce pays. Une étude fonctionnelle des conséquences de la mutation W210C dans les lignées de cellules fibroblastiques des patients a montré que cette mutation entraîne une perte partielle de la fonction de la protéine Mre11 en dépit d'une élévation de sa concentration intracellulaire.

La troisième forme est une ataxie récessive associée à une épilepsie que j'ai étudiée chez une grande famille consanguine d'Arabie Saoudite. L'étude de la liaison génétique m'a permis d'identifier deux régions d'homozygotie partagées par les 4 enfants atteints. L'étude des enfants sains a permis de ne retenir qu'une seule région en 16q21-q23. Les caractéristiques phénotypiques des patients de cette famille permettent de définir une nouvelle entité clinicobiologique associant un syndrome épileptique avec crises généralisées à début infantile, une ataxie cérébelleuse modérée, un retard du développement psychomoteur ainsi que des anomalies vacuolaires à la biopsie musculaire.

Mots-clés : ataxies autosomiques récessives, cartographie par homozygotie, SCABD, 6p21-22, ATLD, Mre11, épilepsie, 16q21-q23