

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

## THESE

Pour l'obtention du grade de

**Docteur de l'Université Louis Pasteur**

Discipline: Sciences du Vivant

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par

**Clotilde Lagier-Tourenne**

### **Identification des gènes responsables du syndrome de Marinesco-Sjögren et d'une forme d'ataxie avec déficit en Coenzyme Q<sub>10</sub>**

**Soutenue publiquement le 23 janvier 2007 devant la commission d'examen :**

Mr Le Professeur Michel Koenig

Directeur de Thèse

Mr Le Professeur Franco Taroni

Rapporteur externe

Mr Le Professeur Alexis Brice

Rapporteur externe

Mr Le Docteur Ivan Tarassov

Rapporteur interne

Mme Le Professeur Christine Tranchant

Examineur

Mr Le Professeur Jean-Louis Mandel

Examineur

*Je remercie les Professeurs Christine Tranchant, Alexis Brice, Franco Taroni, Ivan Tarassov qui m'ont fait l'honneur de faire partie de mon Jury de thèse.*

*J'exprime toute ma reconnaissance à Michel Koenig pour ses précieux conseils depuis mon arrivée dans son équipe et l'immense confiance qu'il m'a accordée. Je le remercie de m'avoir communiqué son enthousiasme pour la recherche, pour nos discussions toujours constructives, pour son soutien permanent et en particulier lors de la préparation du voyage à New York, et maintenant pour le choix de mon postdoc. J'ai eu la chance d'être son « binome » au diagnostic et j'ai beaucoup appris de lui, notamment à faire confiance aux autres. Merci d'avoir été là, toujours discrètement, dans les moments difficiles.*

*Je remercie Jean-Louis Mandel pour son soutien permanent depuis mon arrivée à Strasbourg. Je le remercie de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire comme interne puis assistante en me permettant d'avoir à la fois une activité de recherche et de diagnostic. Merci pour ses nombreux conseils sur mon orientation professionnelle, m'incitant à aller découvrir d'autres horizons scientifiques.*

*Un grand merci à Michio Hirano qui m'a permis de découvrir la vie New Yorkaise entre mon DEA et ma thèse. Merci pour son accueil exceptionnel, et sa très grande gentillesse. Il m'a initié patiemment à la génétique mitochondriale, et m'a transmis sa passion pour New York. Je suis extrêmement heureuse d'avoir pu collaborer avec lui et son équipe sur ADCK3. Merci à tous mes collègues New yorkais, Catarina, Lluis, Andrea, Lucia, Saba et Luis. Un grand merci à Salvatore DiMauro pour sa gentillesse.*

*Merci à Mario Barros de Sao Paulo pour notre collaboration et son efficacité avec ses petites levures.*

*Merci à Olivier Poch et Laurent Bianchetti pour cette collaboration. Merci à Frédéric Plewniak qui nous a concocté un petit logiciel bien pratique.*

*Un grand merci à Hélène Dollfus pour son enthousiasme, ses innombrables encouragements. Merci à Stéphane Viville de m'avoir associé à ses travaux.*

*Je remercie chaleureusement toute l'équipe « ataxie » : Maria qui m'a initiée avec gentillesse et rigueur aux techniques de clonage, Moez, mon collègue des débuts avec qui j'ai tant partagé et qui me manque depuis qu'il est reparti sous le soleil de Tunisie. Heureusement, Dorra et Mirna nous ont apporté à leur tour du soleil et je leur souhaite plein de belles choses et beaucoup de patience. Merci d'avoir réussi à créer une belle équipe même si ce n'était pas facile au début. Merci à Nathalie qui est devenue le pilier de cette équipe grâce à sa gentillesse et son enthousiasme. Enfin, merci à Mathieu pour son amitié.*

*Merci à tous les collègues de l'équipe de génétique humaine. Beaucoup sont déjà partis et m'ont manqués ces derniers mois : Delphine, Aline, Léa, Hervé, Pascale, Gretta, Dom, Marie, Elias, Tom, Richard, et bien d'autres.*

*Merci à tous ceux qui sont encore là et en particulier à l'équipe MTM, Cricri, Anne-Sophie, Anne, Karim, Lama, Valérie, Johann, Anna et Jocelyn, qui mettent une super ambiance en 3031 et avec qui toutes les occasions sont bonnes pour manger des gâteaux...*

*Egalement merci à toute l'équipe Friedreich pour leurs conseils, Laurence, Marie, Stéphane, Alain, Aline, Nadège et Hélène. Merci à tous les autres membres du groupe qui font que l'ambiance est vraiment agréable : Chantal, Myriam, Fabrice, Aurélien, Marie-Cécile, Sabine, Murugan, Patricia, Anne, Yvon, Stan...*

*Et bien sur, merci à mims pour son efficacité et sa bonne humeur qui nous manque depuis qu'elle est descendue.*

*Merci aux services communs de l'IGBMC pour leur aide précieuse et notamment à Christelle Thilbault avec qui j'ai découvert l'univers des puces, Serge Vicaire et Ingrid Collas pour les milliers de séquences et microsattellites, et Betty Heller pour les nombreux colis de carboglace envoyés à l'étranger. Merci à Antoine du service informatique qui nous a quitté pour de nouvelles aventures et dont la disponibilité et la gentillesse sont à toute épreuve. Merci à Maité pour son soutien pendant les dernières semaines.*

*Merci à toute l'équipe du « Diag » : Vali, Mireille, Olivier et depuis peu Marie-Claire. Merci à tous les techniciennes et surtout à Marlène et Nadine en qui je peux avoir entièrement confiance. Merci à nos secrétaires préférées Faby et Simone toujours patientes dans nos longues séances de courrier.*

*Un grand merci pour leur amitié à Delphine et Antoine, Alinette, la marraine de notre poussin, et Faysal, Nadège, Bastien et leur petit bout de choux Flavien. Vous allez nous manquer quand on sera dans le FarWest mais vous êtes des bourlingueurs et je suis sûre que vous viendrez nous voir. Encore merci à Delphine pour son aide précieuse dans la rédaction de ma thèse.*

*Merci à Fred, notre « boulet », Gracia et leur poussin Flavio.*

*Merci à Christophe de nous avoir trouver la plus sympa des voisines. Merci à Jacqueline pour sa gentillesse, et son amitié.*

*Merci aux copains du Sud qui se dorent au soleil depuis des années. Mais c'est bientôt à notre tour !!*

*Merci à Sophie d'être toujours là et pour tous les moments partagés avec Yves et leurs petits schtroumphs.*

*Merci à ma famille, mes parents, mon petit frère, ma mamy, et bien sur Jérôme et notre petit garçon. Je vous dois tout ce que je suis aujourd'hui, aucun mot n'est assez fort pour vous remercier.*

## *Table des matières*

# Table des matières

I. Introduction	p.15
II. Caractéristiques cliniques et génétiques des ataxies héréditaires	p.18
A. Définition	p.19
B. Le problème des cas sporadiques	p.22
C. Ataxies autosomiques dominantes	p.22
D. Ataxies liées à une mutation de l'ADN mitochondrial	p.24
E. Ataxies autosomiques récessives et récessives liées à l'X	p.34
1. Ataxies récessives congénitales	p.35
a. Syndrome de Joubert et autres syndromes cérébello-oculo-rénaux	p.35
b. Ataxie de Cayman	p.44
c. L'hypoplasie ponto-cérébelleuse de type 6 (PCH6)	p.44
d. Le syndrome de Marinesco-Sjögren (MSS)	p.45
2. Ataxies récessives dégénératives	p.50
a. Protéines mitochondriales et stress oxydant :	p.53
a.1. Ataxie de Friedreich (FRDA)	p.54
a.2. Ataxie avec déficit en vitamine E (AVED)	p.58
a.3. Abêtalipoprotéïnémie (ABL)	p.60
a.4. Ataxie spinocérébelleuse avec anémie sidéroblastique	

liée à l’X (XLSA/A)	p.61
a.5. L’ataxie spino-cérébelleuse de début infantile (IOSCA)	p.62
a.6. Les mutations de l’ADN polymérase mitochondriale POLG (SANDO et MIRAS)	p.63
b. Protéines nucléaires et réparation de l’ADN	p.65
b.1. L’ataxie télangiectasie (AT)	p.65
b.2. L’ataxia télangiectasia-like disorder (ATLD)	p.69
b.3. L’ataxie avec apraxie oculomotrice de type 1 (AOA1)	p.70
b.4. L’ataxie avec apraxie oculomotrice de type 2 (AOA2)	p.75
b.5. L’ataxie cérébelleuse avec neuropathie de type 1 (SCAN1)	p.77
c. Autres mécanismes moléculaires	p.78
c.1. L’ataxie spastique autosomique récessive du Charlevoix-Saguenay (ARSACS)	p.78
c.2. Ataxie cérébelleuse autosomique récessive de type 1 (ARCA1)	p.80
c.3. Syndrome ataxie/tremblement associé à l’X Fragile (FXTAS)	p.81
3. Loci identifiés	p.86
III. Le coenzyme Q	p.87
A. Structure biochimique	p.88
B. Rôles physiologiques du coenzyme Q	p.90

C. Biosynthèse du coenzyme Q	p.92
1. La voie du mévalonate	p.93
2. La voie spécifique du coenzyme Q	p.95
D. Les déficits humains en coenzyme Q <sub>10</sub>	p.101
1. Présentation	p.101
2. Mutations dans le gène <i>COQ2</i>	p.103
3. Mutations dans le gène <i>PDSS1</i>	p.104
4. Mutations dans le gène <i>PDSS2</i>	p.104
5. Mutations dans le gène <i>AOA1</i>	p.105
6. Mutations dans le gène <i>ETFDH</i>	p.106
IV. Le clonage positionnel et la stratégie de cartographie par homozygotie	p.107
V. Résultats	p.120
A. Le syndrome de Marinesco-Sjögren (MS)	p.121
1. Analyse de liaison	p.123
a. Le syndrome de MS et le syndrome CCFDN sont deux entités génétiquement distinctes	p.123
b. Identification du locus du MS en 5q31	p.124
2. Le gène <i>SILI</i> est muté dans le syndrome de MS	p.127
a. Mutations dans le gène <i>SILI</i>	p.127
b. Fonctions de la protéine SIL1	p.128
3. Corrélations génotype-phénotype	p.132
B. Le gène <i>ADCK3</i> est muté dans une nouvelle forme d'ataxie récessive	



avec déficit en coenzyme Q <sub>10</sub>	p.167
1. Identification d'un nouveau locus d'ataxie récessive en 1q41-q42	p.168
2. Identification de mutations dans le gène <i>ADCK3</i>	p.171
3. Exploration de la biosynthèse du CoQ <sub>10</sub> chez les patients ARCA2	p.170
4. La famille des protéines ADCK est conservée au cours de l'évolution et appartient à la « super-famille » des kinases atypiques	p.172
5. Analyse de l'effet délétère des mutations non-tronquantes par complémentation de la souche mutante de levure <i>coq8</i>	p.173
6. Etude de l'expression d' <i>ADCK4</i> chez les patients ARCA2	p.175
7. Conclusion	p.177
 VI. Discussion et Perspectives	 p.210
A. La stratégie utilisée	p.211
B. Les différents mécanismes moléculaires impliqués dans les ataxies Héréditaires	p.214
1. Les différentes voies moléculaires	p.214
2. Implication des chaperonnes moléculaires dans la physiopathologie des ataxies	p.216
3. Implication des protéines mitochondriales dans la physiopathologie des ataxies	p.219
C. Références	p.227

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b>	Les différentes régions anatomiques impliquées dans la survenue d'une ataxie	p.20
<b>Figure 2 :</b>	La chaîne respiratoire mitochondriale	p.26
<b>Figure 3 :</b>	Carte du génome mitochondrial humain	p.28
<b>Figure 4 :</b>	Imagerie par Résonance Magnétique Cérébrale d'un patient atteint d'un syndrome de Joubert	p.36
<b>Figure 5 :</b>	Biopsie musculaire en microscopie électronique d'un patient atteint d'un syndrome de Marinesco-Sjögren	p.47
<b>Figure 6 :</b>	Dysmorphie faciale du syndrome CCFDN	p.49
<b>Figure 7 :</b>	Déformations squelettiques chez des patients atteints d'un syndrome CCFDN	p.49
<b>Figure 8 :</b>	Réponse cellulaire à une irradiation ionisante	p.71
<b>Figure 9 :</b>	Apraxie oculo-motrice chez un patient atteint d'AOA1	p.72
<b>Figure 10 :</b>	Les 3 états rédox du Coenzyme Q	p.89
<b>Figure 11 :</b>	La distribution intramembranaire des lipides issus de la voie du Mévalonate	p.89
<b>Figure 12 :</b>	La voie du Mévalonate est commune à la biosynthèse du Coenzyme Q, du cholestérol, et du dolichol	p.94
<b>Figure 13 :</b>	La biosynthèse du Coenzyme Q chez <i>S. cerevisiae</i> et <i>E. coli</i>	p.96
<b>Figure 14 :</b>	Principe de la cartographie par homozygotie	p.110
<b>Figure 15 :</b>	Comparaison des deux technologies utilisées pour l'étude pangénome	p.114
<b>Figure 16 :</b>	Méthode de génotypage de marqueurs microsatellites à l'aide d'une amorce universelle	p.115
<b>Figure 17 :</b>	Etapes expérimentales de l'étude pangénome par puces de génotypage Affymetrix	p.117
<b>Figure 18 :</b>	HomoSNP, une nouvelle interface graphique pour comparer les résultats de puces de génotypage obtenus chez différents individus	p.118

<b>Figure 19 :</b>	Analyse de liaison en 5q31, 7p14.2, 5q11, 20q13 dans une famille consaguine avec une syndrome de Marinesco-Sjögren	p.126
<b>Figure 20 :</b>	Mutations du <i>SIL1</i>	p.129
<b>Figure 21 :</b>	Microscopie électronique des cellules de Purkinje des souris « wozy »	p.131
<b>Figure 22 :</b>	Chevauchement phénotypique entre le syndrome de MS, le syndrome CCFDN et des syndromes apparentés	p.135
<b>Figure 23 :</b>	Phylogénie de la superfamille des kinases atypiques	p.174
<b>Figure 24 :</b>	Dosage du CoQ <sub>10</sub> et expression d'ADCK4 chez les patients ARCA2	p.176
<b>Figure 25 :</b>	Mécanismes moléculaires des défauts de communication intergénomiques	p.222

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1 :</b>	Définitions Cliniques des encéphalomyopathies mitochondriales les plus fréquentes	p.33
<b>Tableau 2 :</b>	Caractéristiques cliniques et génétiques des différentes formes du Syndrome de Joubert	p.43
<b>Tableau 3 :</b>	Classification des ataxies autosomiques récessives dégénératives proposée par Koenig (2003)	p.52
<b>Tableau 4 :</b>	Caractéristiques cliniques et génétiques des ataxies récessives dégénératives	p.84
<b>Tableau 5 :</b>	Nomenclature et caractéristiques cliniques des loci d'ataxies récessives	p.86
<b>Tableau 6 :</b>	Les nombreux rôles physiologiques du coenzyme Q	p.92

## Liste des Manuscrits

- Manuscrit 1 :** Linkage to 18qter differentiates two clinically overlapping syndromes : congenital cataracts-facial dysmorphism-neuropathy (CCFDN) syndrome and Marinesco-Sjögren syndrome p.136
- Manuscrit 2 :** Homozygosity mapping of Marinesco-Sjögren syndrome to 5q31 p.143
- Manuscrit 3 :** The gene disrupted in Marinesco-Sjögren syndrome encodes SIL1, an HSPA5 co-chaperone p.152
- Manuscrit 4 :** ADCK3, an ancestral kinase involved in coenzyme Q biosynthesis, is mutated in a new form of recessive ataxia p.178

## Liste des abbréviations

ABL	Abetalipoprotéinémie
ADCK	Aarf domain containing kinase
adPEO	Autosomal dominant progressive external ophtalmoplegia
AOA1	Ataxie avec apraxie oculomotrice de type 1
AOA2	Ataxie avec apraxie oculomotrice de type 2
ARCA1	Ataxie cérébelleuse autosomique récessive de type 1
ARCA2	Ataxie cérébelleuse autosomique récessive de type 2
ARSACS	Ataxie spastique autosomique récessive du Charlevoix-Saguenay
ASAT	Ataxie spinocérébelleuse avec anémie sidéroblastique liée à l’X
AT	Ataxie télangiectasie
ATLD	Ataxia télangiectasia-like disorder
ATM1	Ataxia telangiectasia mutated protein 1
ATP	Adénosine triphosphate
AVED	Ataxie avec déficit en vitamine E
CACH	Ataxies de l’enfance avec hypomyélinisation
CCFDN	Congénital cataracts facial dysmorphism neuropathy
CDG	Déficits congénitaux de la glycosylation
CEPH	Centre d’Etude des Polymorphismes Humains
CLN1	Céroïdes lipofuscinoses neuronales
COACH	Cerebellar vermis hypo/aplasia, oligophrenia, congenital ataxia, ocular coloboma, hepatic fibrosis
CoQ	Coenzyme Q
COX	Cytochrome c oxydase
CPK	Créatine phosphokinase
DRPLA	Atrophie pallidoluysian dentatorubrale
EMG	Electromyogramme
FADH	Flavine adenine dinucleotide
FPP	Farnesyl pyrophosphate
FRDA	Ataxie de Friedreich
FXTAS	Syndrome ataxie et tremblement associé à l’X Fragile
GDAS	GeneChip DNA Analysis Software
GTYPE	GeneChip Genotyping Analysis Software
HPLC	High performance liquid chromatography
IOSCA	Ataxie spino-cérébelleuse de début infantile
IPP	Isopentenyl pyrophosphate
IRM	Imagerie par résonance magnétique
JBTS	Syndrome de Joubert
MELAS	Encéphalopathie Mitochondriale, Acidose Lactique, Pseudo-accidents vasculaires cérébraux
MERRF	Epilepsie Myoclonique, Ragged-Red Fibers (Fibres rouges déchiquetées)
MIRAS	Syndrome avec ataxie mitochondriale récessive
MS	Syndrome de Marinesco-Sjögren
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide

NARP	Neuropathie, Ataxie, Rétinite Pigmentaire
NBS	syndrome « Nijmegen Breakage »
PARP	Poly ADP-ribose polymérase
PCH6	Hypoplasie ponto-cérébelleuse de type 6
PCR	Polymerase chain reaction
POLG	Polymérase gamma
RD	Maladie de Refsum
ROS	Reactive Oxygen Species
RRF	Ragged-red fibers : Fibres rouges déchiquetées
RT-PCR	Reverse transcriptase PCR
SANDO	Neuropathie sensitive ataxiante avec dysarthrie et ophtalmoparésie
SARA	Scale for the Assessment and Rating of Ataxia
SBMA	Spinal and bulbar muscular atrophy
SCA	Ataxies spino-cérébelleuses
SCAN1	Ataxie cérébelleuse avec neuropathie de type 1
SDH	Succinate déhydrogénase
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms
SOD	Superoxyde dismutases
SPAX	Spastic ataxia autosomal recessive
SPECT	single photon emission tomography
SSBR	Single Strand Break Repair
TPPA	Protéine de transfert de l' $\alpha$ -tocopherol
UPR	Unfolded protein response
VLDL	Very low density lipoprotein

## *Introduction*

## I. Introduction

Les ataxies héréditaires constituent un groupe hétérogène de pathologies neurodégénératives caractérisées par des anomalies de coordination des mouvements associées à des troubles de l'équilibre et de la marche. L'ataxie est généralement associée à d'autres signes neurologiques ou extra-neurologiques. Divers modes de transmission peuvent être impliqués, autosomique dominant, autosomique récessif, lié à l'X ou mitochondrial. De nombreux gènes ont été associés à ces pathologies au cours des 15 dernières années permettant une détermination plus précise des spectres cliniques de chacune de ces entités. Cependant, de nombreux patients ne présentent aucune mutation dans les gènes connus et plusieurs gènes responsables d'ataxie héréditaire n'ont pas encore été identifiés.

L'identification du gène responsable d'une pathologie héréditaire permet de proposer un diagnostic moléculaire et ainsi d'orienter le conseil génétique. En effet, il existe un chevauchement clinique important entre les différentes formes d'ataxie héréditaire et il est souvent difficile d'établir un diagnostic précis sans l'aide de la biologie moléculaire. Enfin, l'identification du gène responsable d'une pathologie permet d'entreprendre des études fonctionnelles indispensables pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques et l'orientation des approches thérapeutiques.

Au cours de ce travail de thèse, j'ai participé à l'identification de deux gènes impliqués dans la survenue d'ataxies autosomiques récessives : le syndrome de Marinesco-Sögren et une nouvelle forme d'ataxie associée à un déficit en Coenzyme Q<sub>10</sub>.

Dans ce manuscrit, je présenterai les différentes formes d'ataxies héréditaires en détaillant plus particulièrement les ataxies de transmission récessive. Les caractéristiques cliniques, paracliniques et anatomopathologiques de ces ataxies seront décrites ainsi que les aspects moléculaires et physiopathologiques. Les différentes ataxies récessives dégénératives seront classées en fonction des mécanismes moléculaires principalement impliqués.

Je décrirai ensuite les différentes formes de déficit en CoQ<sub>10</sub>, ainsi que la voie de biosynthèse et les fonctions biologiques de cette molécule.



L'identification des deux gènes d'ataxie récessive a été réalisée par une approche de clonage positionnel, et plus précisément de cartographie par homozygotie. Le principe de cette approche ainsi que les techniques utilisées seront présentés.

Enfin, les articles décrivant les résultats issus de ce travail seront inclus et brièvement décrits dans ce manuscrit. Puis, les évolutions de l'approche de cartographie par homozygotie seront discutés, ainsi que les différentes voies moléculaires apparaissant impliquées dans la survenue des ataxies héréditaires, et en particulier la dysfonction des chaperones moléculaires et l'altération du métabolisme mitochondrial.

*Caractéristiques cliniques et génétiques des  
ataxies héréditaires*

## **II. Caractéristiques cliniques et génétiques des ataxies héréditaires**

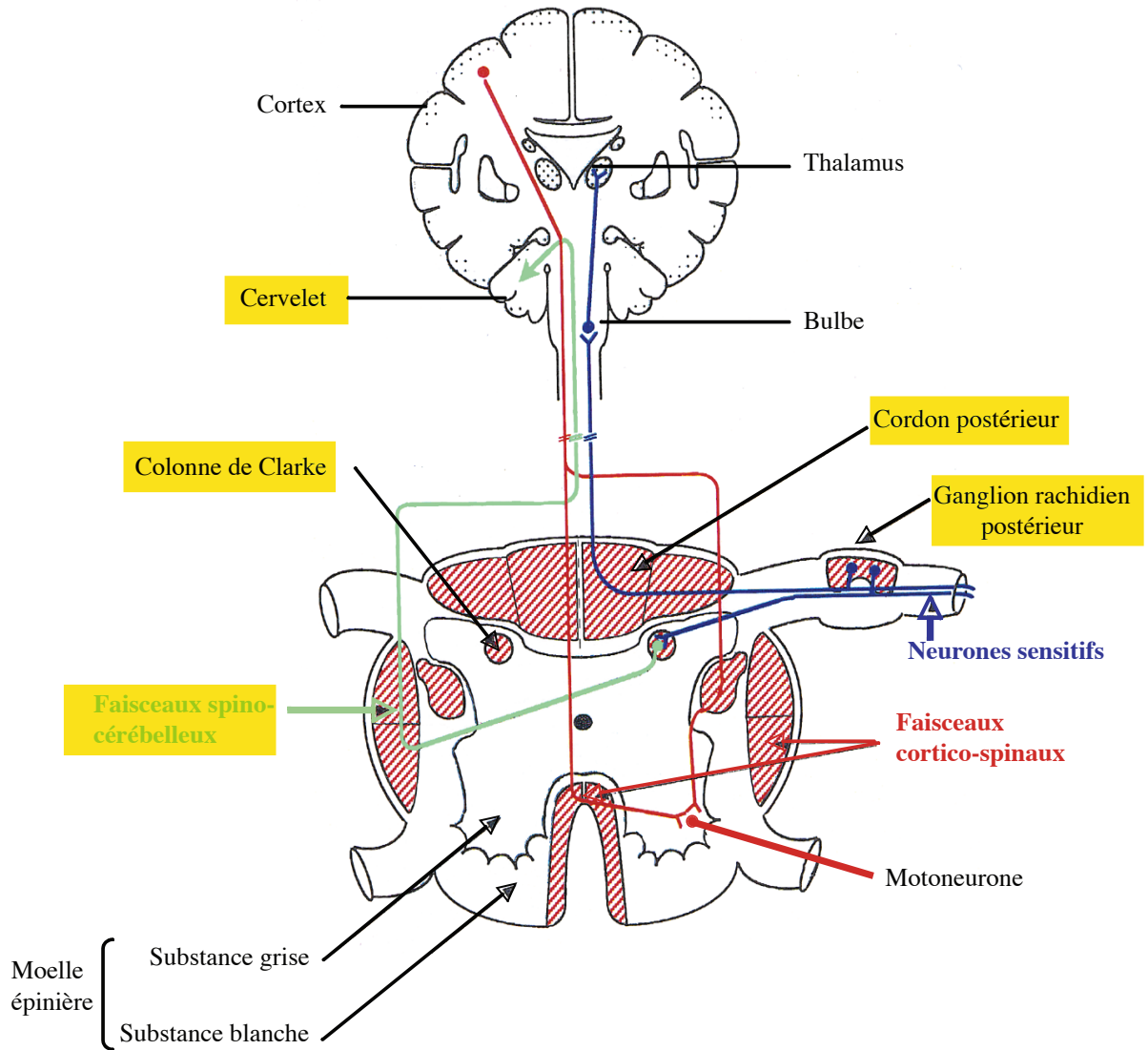
### **A. Définition**

L'ataxie (du grec « a » sans et « taxis » ordre) se définit comme une anomalie du mouvement, fréquemment appelée incoordination, qui n'est pas liée à une altération de la force musculaire (Barboi, 2000). Cette perturbation de la coordination des mouvements volontaires, peut être soit due à une atteinte du cervelet et de ses connections afférentes et efférentes, soit due à une atteinte des voies proprioceptives (fibres myélinisées de gros calibres du système nerveux périphérique, ganglions rachidiens postérieurs, colonnes postérieures de la moelle épinière, thalamus, cortex pariétal) (Figure 1).

Lorsque l'atteinte se situe au niveau du cervelet ou de ses voies afférentes (faisceaux spino-cérébelleux), l'examen clinique met en évidence un syndrome cérébelleux. Celui-ci est caractérisé par des troubles de l'équilibre et de la marche avec une démarche ébrieuse et un élargissement du polygone de sustentation. Il existe de plus un retard dans le contrôle du démarrage et de l'arrêt du mouvement responsable d'une hypermétrie (exagération de l'amplitude du mouvement qui dépasse son but), d'une adiadococinésie (difficulté à l'exécution rapide de mouvements alternatifs), d'une asynergie (perturbation de la faculté d'association des mouvements élémentaires lors de l'exécution d'actes complexes) et d'un tremblement d'intention. Ces anomalies sont responsables d'un trouble de la parole appelé dysarthrie et des troubles de l'oculo-motricité sont souvent observés.

Lorsque l'atteinte est localisée au niveau des voies de la sensibilité profonde ou proprioceptives, l'examen clinique met en évidence une ataxie proprioceptive caractérisée par une accentuation des signes lors de la fermeture des yeux. En effet, on observe des troubles de la marche et de l'équilibre, majorés lorsque les yeux sont fermés (signe de Romberg), ainsi que des troubles de la sensibilité discriminative en particulier de la kinesthésie (perception consciente de la position et des mouvements des différentes parties du corps) et de la pallesthésie (sensibilité vibratoire).

L'ataxie entraîne un handicap qui peut être sévère et confiner les patients en fauteuil roulant. Il est indispensable de pouvoir évaluer cliniquement l'évolution de cette atteinte et



**Figure 1: Les différentes régions anatomiques impliquées dans la survenue d'une ataxie**

L'ataxie peut être soit cérébelleuse si la neurodégénérescence est située au niveau du cervelet ou des faisceaux cérébelleux, soit sensitive si la neurodégénérescence est située au niveau des ganglions rachidiens postérieurs et du cordon postérieur de la moelle.

Modifié d'après Simon D. (2004), Modèles murins pour l'ataxie de Friedreich: De la caractérisation aux essais thérapeutiques, Strasbourg, Université Louis Pasteur.

plusieurs échelles d'évaluation ont été proposées. Récemment, l'échelle SARA (Scale for the Assessment and Rating of Ataxia) a montré son utilité dans l'évaluation et le suivi des patients ataxiques (Schmitz-Hubsch et al., 2006 ; Weyer et al., 2007 ; Yabe et al., 2007).

L'ataxie est rarement isolée et de nombreux patients présentent des signes associés :

- neurologiques tels qu'une neuropathie périphérique sensitivo-motrice avec faiblesse musculaire, une atteinte pyramidale ou extra-pyramidale, un déficit cognitif, une épilepsie, une chorée, une dystonie.
- ou extra-neurologiques tels qu'une atteinte oculaire, une surdité, une myopathie ou une cardiomyopathie, un diabète, une atteinte rénale...

L'ataxie peut être soit acquise (d'origine infectieuse, traumatique, tumorale, vasculaire, inflammatoire, toxique...), soit héréditaire.

Les ataxies héréditaires représentent un groupe complexe et hétérogène de pathologies congénitales ou neurodégénératives. Aucune classification de ces pathologies ne fait à ce jour l'objet d'un consensus, probablement en raison de leur complexité, de leur hétérogénéité phénotypique et génotypique, et de l'intérêt propre de chaque type de classification. Par exemple, les classifications s'appuyant sur des données anatomo-pathologiques sont difficilement utilisables en pratique clinique. En 1983, Harding a proposé une classification clinico-génétique des ataxies héréditaires selon leur mode de transmission et les signes cliniques les caractérisant (Harding, 1983). Dans ce manuscrit, j'ai choisi une classification basée sur le mode de transmission : autosomique récessif et récessif lié à l'X, autosomique dominant, et mitochondrial. J'insisterai particulièrement sur les caractéristiques cliniques et les données moléculaires des principales ataxies récessives. Parmi celles-ci, j'ai séparé les syndromes congénitaux des syndromes neurodégénératifs, et pour les ataxies dégénératives j'ai proposé une classification essentiellement basée sur les mécanismes moléculaires impliqués.

Ces dernières années, de nombreux gènes responsables d'ataxies héréditaires ont été identifiés. Les corrélations génotype-phénotype ont alors permis de mieux préciser le spectre clinique de chacune de ces entités. Cependant, de nombreux patients ne présentent aucune mutation dans les gènes connus et plusieurs gènes n'ont pas encore été identifiés. Plusieurs nouveaux loci ont été proposés, renforçant la notion d'une vaste hétérogénéité génétique parmi les ataxies héréditaires. Ces loci sont souvent définis par l'étude d'une ou de quelques familles et

le spectre clinique de ces syndromes ne pourra être réellement précisé qu'après l'identification des gènes responsables. Pour cette raison, je ne décrirai pas en détail l'ensemble de ces entités, mais je proposerai un tableau récapitulatif des différents loci publiés.

## **B. Le problème des cas sporadiques**

Même après une enquête familiale précise, la grande majorité des patients ataxiques s'avère être des cas isolés. Après avoir éliminé les causes d'ataxies acquises, il convient de considérer les causes d'ataxie héréditaire car une origine génétique ne peut être exclue (Abele et al., 2002). En effet, un cas isolé peut être le seul enfant atteint d'un couple porteurs hétérozygotes d'une mutation récessive. Il peut aussi présenter une ataxie dominante dont la pénétrance est incomplète ou due à une mutation de novo ou encore à un phénomène d'anticipation avec une apparition plus tardive des symptômes chez les parents. De même, une mutation de l'ADN mitochondrial peut ne pas avoir de conséquences phénotypiques chez la mère du patient en raison du phénomène d'hétéroplasmie. Il peut également exister une fausse paternité rendant l'enquête familiale obsolète.

Il sera donc important de ne pas exclure une cause génétique chez un cas sporadique. En particulier, la recherche de l'expansion responsable de l'ataxie de Friedreich doit être proposée chez de tels patients en raison de sa fréquence et de la variabilité de l'expression phénotypique retrouvée dans cette pathologie.

## **C. Ataxies autosomiques dominantes**

Une présentation détaillée des différentes ataxies spinocérébelleuses dominantes n'entre pas dans le cadre de cette thèse. Seules des considérations générales sur ce groupe hétérogène de maladies et en particulier sur les mécanismes moléculaires impliqués sont présentées.

Les ataxies spino-cérébelleuses (SCA) dominantes sont caractérisées par une ataxie progressive due à une atteinte du cervelet et de ses connections afférentes et efférentes. La

distinction clinique entre les différentes SCA est souvent difficile et la biologie moléculaire est nécessaire au diagnostic. Les SCA ont en commun un début qui intervient généralement à l'âge adulte, et une évolution progressive vers un décès prématuré après 10 à 20 ans d'évolution. Des formes juvéniles ou très tardives sont également décrites. L'ataxie peut s'associer ou non à d'autres manifestations neurologiques ou extra-neurologiques tels qu'un syndrome pyramidal, un syndrome extra-pyramidal, une démence, une épilepsie, une neuropathie périphérique, une surdité ou une rétinopathie. L'IRM cérébrale révèle habituellement une atrophie cérébelleuse.

Elles ont été récemment classées en SCA de type 1   28 en fonction du locus ou du gène identifié, auxquelles il convient d'ajouter l'atrophie pallidolusian dentatorubrale (DRPLA) (Duenas et al., 2006).

Plusieurs d'entre elles ont un mécanisme moléculaire commun et font partie d'un groupe plus large de maladies neurodégénératives héréditaires, incluant la maladie de Huntington et la maladie de Kennedy (SBMA), appelées « maladies à expansion polyglutaminique ». En effet, les SCAs 1,2,3,6,7,17,et DRPLA sont dues à une expansion de triplets CAG (ou CAG/CAA) dans la séquence codante, responsable d'un allongement d'une séquence polyglutaminique (polyQ) dans les protéines correspondantes. Cette séquence est à l'origine d'un gain de fonction toxique pour les cellules nerveuses et des anomalies de la conformation protéique avec formation d'agrégats cytoplasmiques et/ou nucléaires (Orr and Zoghbi, 2007). Ces pathologies sont caractérisées par le phénomène d'anticipation avec classiquement une aggravation au cours des générations et la sévérité de la maladie est corrélée à la taille de l'expansion. La plupart des séquences polyQ deviennent pathogéniques entre 35 et 40 répétitions CAG, cependant cela peut varier d'environ 20 répétitions dans SCA6 à plus de 60 répétitions dans SCA3 (Orr and Zoghbi, 2007). Le rôle primaire des agrégations dans la pathogénicité est l'objet de nombreux débats, et le lien entre toxicité et agrégations n'est pas évident (Ross, 2002). L'expansion polyglutaminique est une caractéristique commune, cependant le contexte protéique dans lequel se trouve l'expansion semble être déterminant dans la pathogénie de chacune de ces maladies (Gatchel and Zoghbi, 2005). En effet, la chaîne polyglutaminique est responsable d'une modification de conformation de la protéine, qui entraîne des altérations des interactions normales de cette protéine, à leur tour responsable d'une dysfonction neuronale et d'une mort neuronale (Orr and Zoghbi, 2007). Plusieurs mécanismes physiopathologiques ont donc été mis en évidence et varient en fonction du rôle normal de la protéine impliquée dans chacune des maladies. Ces mécanismes incluent une

dérégulation de la transcription (SCA1, SCA3, SCA6, SCA7, SCA17, DRPLA), une dérégulation du métabolisme des ARN et de la traduction (SCA2), une dérégulation de la dégradation médiée par le système Ubiquitin-Proteasome (SCA3), une dysfonction d'un canal calcium (SCA6), une dérégulation de la structure chromatinienne (SCA7), une dérégulation de la fonction gliale (SCA7).

L'expansion polyglutaminique n'est pas le seul mécanisme moléculaire responsable d'ataxie spinocérébelleuse dominante. En effet, des mutations ponctuelles ont récemment été identifiées dans les gènes responsables des SCA5, 11, 13 et 14 (Chen et al., 2003; Houlden et al., 2007 ; Ikeda et al., 2006 ; Waters et al., 2006 ). De plus des expansions trinuécléotidiques ou pentanucléotidiques dans les régions 5' ou 3' non codantes ou dans une région intronique ont été associées respectivement aux SCA12 (Fujigasaki et al., 2001; Holmes et al., 1999 ), SCA 8 (Koob et al., 1999 ; Moseley et al., 2006) et SCA10 (Matsuura et al., 2000). Le mécanisme physiopathologique de ces expansions est mal connu mais pourrait être dû à une toxicité médiée par l'ARN (Orr and Zoghbi, 2007).

Les ataxies épisodiques de type 1 et 2 (EA1 et 2) sont également de transmission autosomique dominante. Ces entités sont toutefois caractérisées par des manifestations paroxystiques les distinguant de l'évolution progressive chronique des ataxies spino-cérébelleuses.

Elles sont respectivement dues à des mutations dans le gène canal potassium voltage-dépendant (*KCNA1*) pour EA1 (Browne et al., 1994) et dans les gènes des sous-unités  $\alpha 1$  ou  $\beta 4$  du canal calcium de type P/Q cérébral (*CACNL1A4*) (Escayg et al., 2000; Ophoff et al., 1996 ).

#### **D. Ataxies liées à une mutation de l'ADN mitochondrial**

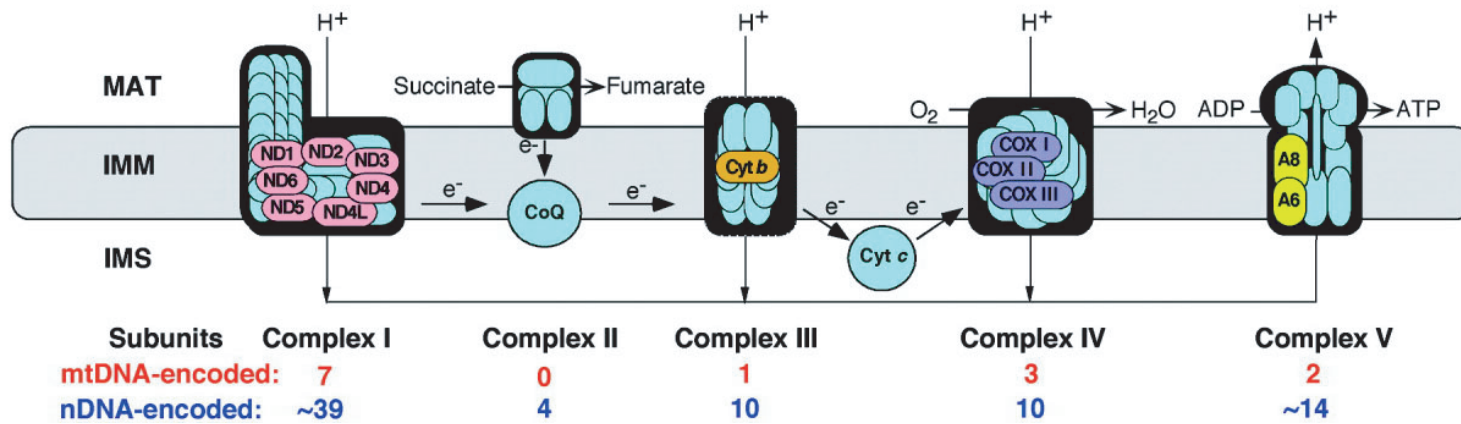
Les mitochondries sont essentielles pour les cellules eucaryotes. Elles contiennent la machinerie enzymatique nécessaire au métabolisme aérobie, par lequel les acides gras, les carbohydrates, et les acides aminés sont dégradés en molécules de CO<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub>O afin de convertir l'adénosine diphosphate (ADP) en adénosine triphosphate (ATP) qui est le carburant



universel indispensable au fonctionnement cellulaire. Ces molécules d'ATP sont produites par la chaîne respiratoire, composée de 5 complexes enzymatiques situés dans la membrane interne de la mitochondrie (Figure 2) : la NADH ubiquinone oxydoréductase (complexe I), la succinate ubiquinone oxydoréductase (complexe II), l'ubiquinone-cytochrome c oxydoréductase (complexe III), la cytochrome c oxydase (complexe IV) et l'ATP synthase (complexe V). La chaîne respiratoire comporte également deux transporteurs d'électrons : l'ubiquinone ou coenzyme Q dans la membrane interne, et le cytochrome c dans l'espace intermembranaire. Les électrons sont transmis d'un complexe à l'autre créant un flux de protons (H<sup>+</sup>) de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire, générant ainsi un gradient transmembranaire de protons. La phosphorylation oxydative est le processus par lequel l'énergie de ce gradient est convertie en ATP au niveau du complexe V. Les mitochondries réalisent également d'autres réactions métaboliques comme le cycle de l'acide citrique ou cycle de Krebs, le cycle de l'urée, la dégradation des acides gras par la  $\beta$ -oxydation, la biosynthèse d'acides aminés et de plusieurs cofacteurs (hème et noyaux Fer-Soufre) nécessaires entre autres à l'activité des complexes de la chaîne respiratoire, ou la production de chaleur par la dissipation du gradient de protons.

La plupart des protéines nécessaires au fonctionnement mitochondrial sont codées par le génome nucléaire et importées dans la mitochondrie. Cependant, la mitochondrie est chez les animaux le seul organelle possédant son propre génome codant notamment pour 13 des sous-unités constitutives des complexes de la chaîne respiratoire. En effet, seul le complexe II est constitué uniquement de peptides codés par l'ADN nucléaire. Les complexes I, III, IV et V comprennent à la fois des sous-unités codées par l'ADN mitochondrial et des sous-unités codées par l'ADN nucléaire (Figure 2).

Les maladies mitochondriales ont longtemps été appelées « myopathies mitochondriales » car les premiers patients décrits présentaient un tableau myopathique avec un aspect caractéristique de la biopsie musculaire dû à un dysfonctionnement mitochondrial. Il est devenu évident par la suite que ces pathologies étaient cliniquement hétérogènes allant de l'acidose lactique néonatale à la fatigabilité musculaire de l'adulte. Leur spectre est maintenant beaucoup plus large puisqu'elles regroupent l'ensemble des maladies liées à un déficit enzymatique de la chaîne respiratoire.



**Figure 2: La chaîne respiratoire mitochondriale**

Les 5 complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale situés au niveau de la membrane interne sont représentés:

la NADH-coenzyme Q oxydoréductase (complexe I), succinate-coenzyme Q oxydoréductase (complexe II),

la coenzyme Q-cytochrome c oxydoréductase (Complexe III), la cytochrome c oxydase (complexe IV),

l'ATP synthase (complexe V).

Le coenzyme Q et le cytochrome c sont des transporteurs mobiles de la chaîne respiratoire.

Les complexes I, III, IV et V sont codés par des gènes mitochondriaux et nucléaires, alors que le complexe II

est codé exclusivement par le génome nucléaire.

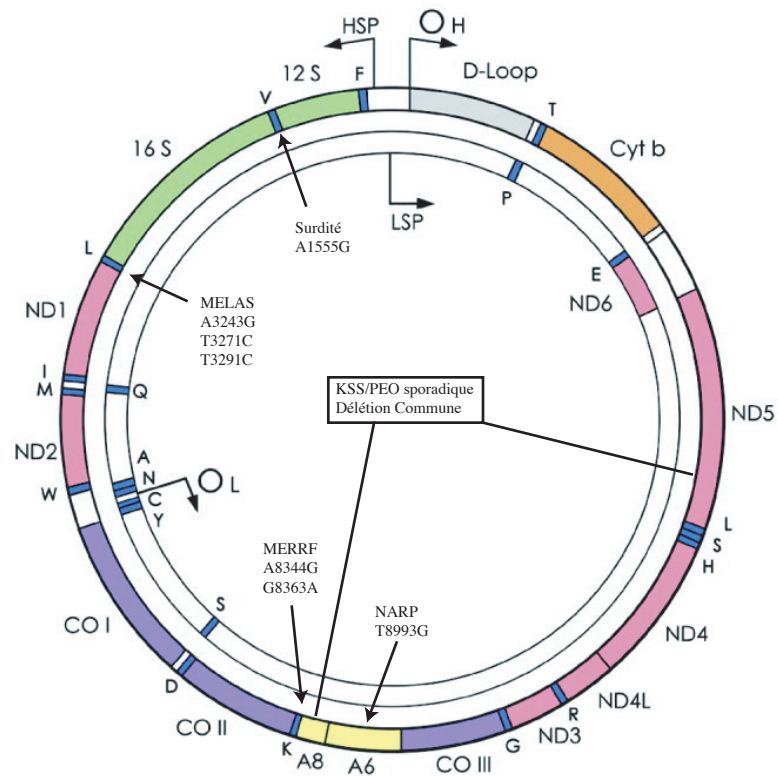
D'après DiMauro et al. *Muscle Nerve*, 2006.

D'autre part, ces maladies sont caractérisées par une extrême hétérogénéité génétique, d'autant plus complexe que les diverses fonctions de cet organelle dépendent de deux génomes : l'ADN nucléaire (ADNn) transmis selon les lois mendéliennes, et l'ADN mitochondrial (ADNmt) de transmission maternelle. Des mutations au niveau de ces deux génomes peuvent être responsables d'une dysfonction mitochondriale. De plus, une nouvelle catégorie a été identifiée regroupant des pathologies dues à un défaut de communication intergénomique. Dans ces dernières, des mutations au niveau de l'ADN nucléaire sont responsables d'une perte de la stabilité du génome mitochondrial ayant pour conséquence une dysfonction de la chaîne respiratoire.

L'ataxie est un signe clinique fréquemment observé dans les pathologies dues à une dysfonction mitochondriale. Plusieurs syndromes secondaires à des mutations dans des gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales sont présentés dans des chapitres spécifiques en fonction de leur transmission autosomique récessive (Hypoplasie ponto-cérébelleuse de type 6, Ataxie de Friedreich, Ataxies dues à des mutations de Twinkle ou de Poly), ou liée à l'X (Ataxie avec anémie sidéroblastique liée à l'X).

Cependant, une ataxie cérébelleuse peut également être retrouvée, associée à d'autres manifestations cliniques, dans les syndromes dus à des mutations de l'ADN mitochondrial.

L'ADN mitochondrial est une molécule de 16,6 Kb, circulaire, double brin, et codant pour 37 transcrits (Anderson et al., 1981) : 13 codants pour des polypeptides constitutifs de la chaîne respiratoire, 22 ARN de transfert (ARNt) et 2 ARN ribosomiques (ARNr) nécessaires à la synthèse des 13 polypeptides (Figure 3). Le génome mitochondrial diffère de l'ADN nucléaire par différents aspects: il est transmis par la mère (Giles et al., 1980). Il ne contient pas d'intron et le code génétique qui le caractérise est légèrement différent de celui du génome nucléaire (pour 3 codons chez l'homme). De plus, chaque cellule contient des centaines voire des milliers de copies d'ADNmt. Ces propriétés sont à l'origine des caractéristiques distinguant la génétique mitochondriale de la génétique mendélienne et expliquent plusieurs particularités cliniques des maladies mitochondriales (Lagier-Tourenne, 2006).



**Figure 3: Carte du génome mitochondrial humain.**

Les gènes mitochondriaux codant pour les ARN ribosomiaux 12S et 16S (en vert), les sous-unités de la NADH-coenzyme Q oxydoréductase (ND, en rose), de la cytochrome c oxydase (CO, en violet), du cytochrome b (Cyt b, en orange), de l'ATP synthase (A, en jaune), et des 22 ARN de transfert (nomenclature des acides aminés, en bleu) sont représentés. Les origines de réplication du brin léger (OL) et du brin lourd (OH) ainsi que leurs promoteurs respectifs (LSP) et (HSP) sont indiqués par des flèches. La région D-loop (en gris) contrôle l'initiation de la réplication et de la transcription de l'ADNmt. La « délétion commune » souvent retrouvée dans les ophtalmoplégies externes progressives est représentée, ainsi que les mutations ponctuelles les plus fréquemment associées à des encéphalomyopathies mitochondriales  
 Modifié d'après DiMauro et al. *Muscle Nerve*, 2006..

Plusieurs entités cliniques ont été associées à des mutations ponctuelles, des délétions ou des duplications, de l'ADN mitochondrial et leurs caractéristiques sont présentées dans le Tableau 1. Cependant, il existe un chevauchement clinique très important entre ces différentes entités, et une même mutation peut être responsable de l'un ou l'autre de ces syndromes. Ceci peut être en partie expliqué par le phénomène d'*hétéroplasmie*. En effet, une cellule dispose de très nombreuses mitochondries dont chacune contient environ 2 à 10 copies d'ADNmt. Une mutation peut être présente soit au niveau de toutes les copies (homoplasmie), soit uniquement dans certaines molécules d'ADNmt (hétéroplasmie) ce qui est généralement le cas pour les maladies mitochondriales. La proportion d'ADN muté peut être très variable d'un individu à l'autre, or un nombre critique minimum de génomes mutants doit être présent pour entraîner une dysfonction tissulaire et donc, des manifestations cliniques (effet seuil). Ainsi, un individu présentant une large proportion d'ADNmt muté sera plus sévèrement atteint qu'un individu ayant un faible taux de la même mutation.

Un autre facteur pouvant influencer l'expression d'une même mutation mitochondriale en fonction des individus, est sa *distribution tissulaire*. Cette distribution est dépendante du phénomène de ségrégation mitotique. En effet, la division mitochondriale, comme la réplication de l'ADNmt, sont des événements non liés à la division cellulaire. Les mitochondries se répartissent au hasard dans les cellules filles lors de la mitose ou de la méiose. Ainsi, le nombre de mitochondries (et d'ADNmt) peut varier dans l'espace (au sein des cellules et des tissus), mais également dans le temps (au cours du développement ou du vieillissement). La proportion d'ADNmt muté peut changer rapidement, entraînant des modifications cliniques lorsque le seuil pathogénique est dépassé. Le spectre clinique et la sévérité des maladies causées par des mutations mitochondriales sont donc très variables.

Ainsi, une ataxie cérébelleuse peut faire partie du spectre clinique du syndrome de Leigh (Miyabayashi 1983), du syndrome MERRF (Melone et al., 2004; Silvestri et al., 1992 ; Zeviani et al., 1993 ), du syndrome MELAS (Ravn et al., 2001), ou du syndrome Kearns-Sayre (Jankowicz et al., 1977). De façon plus rare, l'ataxie est au premier plan (Petruzzella et al., 2004 ; Zoccolella et al., 2006).

Elle est constitutive du syndrome de NARP (MIM 551500) associant une neuropathie, une ataxie et une rétinite pigmentaire, dû à des mutations dans le gène mitochondrial codant pour

la sous-unité 6 de l'ATP synthase (complexe V) (Holt et al., 1990). Les conséquences cliniques des mutations de ce gène sont très variables pouvant aller jusqu'à un syndrome de Leigh (Shoffner et al., 1992; Tatuch et al., 1992). Chez certains patients porteurs d'une mutation dans ce gène, l'ataxie et la neuropathie axonale sont au premier plan et ne s'associent pas à une rétinopathie (de Coo et al., 1996 ; Rantamaki et al., 2005).

Le diagnostic peut être orienté vers une mutation de l'ADN mitochondrial devant une transmission maternelle et une atteinte multi-systémique impliquant en particulier les tissus nécessitant beaucoup d'énergie (atteinte du système nerveux, myopathie, cardiomyopathie, ophtalmoplégie, diabète, dysfonction rénale, rétinopathie, surdité).

L'exploration biologique peut révéler une dysfonction hépatique, rénale, ou parathyroïdienne. Un déficit de la chaîne respiratoire est responsable d'une accumulation des équivalents réduits (NADH, FADH), ce qui favorise la transformation du pyruvate en lactate, et l'accumulation du 3OH-butyrate. Les rapports lactate/pyruvate et 3OH-butyrate/acétoacétate au repos sont donc fréquemment élevés. Cependant de nombreux patients avec des mutations documentées de l'ADNmt ont des taux de lactate normaux au repos qui, dans certains cas, s'élèvent significativement après un exercice modéré.

La ponction lombaire peut révéler une protéinorachie, en particulier chez les patients atteints du syndrome de Kearns-Sayre où la protéinorachie est souvent supérieure à 100 mg/dl. Les taux de lactate et pyruvate rachidiens peuvent également être élevés, même chez un patient ayant des taux sériques normaux.

L'IRM cérébrale peut retrouver de nombreuses anomalies en fonction de la mitochondriopathie. Des lésions bilatérales, symétriques, du ganglion basal, du thalamus, du tronc cérébral et des noyaux cérébelleux sont caractéristiques du syndrome de Leigh. De même, une encéphalomalacie multifocale, est observée dans les pseudo-accidents vasculaires cérébraux du syndrome MELAS. Lorsqu'une ataxie fait partie du tableau clinique une atrophie cérébelleuse est souvent observée. De plus, Boddaert et al. ont récemment montré l'intérêt de la spectroscopie par résonance magnétique (1H-MRS) chez les patients avec ataxie cérébelleuse (Boddaert et al., 2007). En effet, si l'ataxie est au premier plan, une biopsie musculaire est rarement réalisée à la recherche d'un déficit de la chaîne respiratoire. Or, les taux de lactate plasmatique étant souvent

normaux, il est intéressant d'utiliser la spectroscopie pour détecter une élévation du lactate et orienter le diagnostic vers une mitochondriopathie (Boddaert et al., 2007).

La biopsie musculaire reste un examen souvent indispensable dans les mitochondriopathies. En 1966, Shy et al. ont décrit les anomalies ultrastructurales typiques des myopathies mitochondriales (Shy et al., 1966). Ces modifications incluent: 1) une prolifération de mitochondries morphologiquement normales; 2) des mitochondries élargies avec une désorganisation des crêtes; 3) des inclusions mitochondriales "paracrystallines" et "osmiophyles" (Shy et al., 1966). De leur côté, Engel et Cunningham ont mis au point une coloration au trichrome de Gomori modifié permettant d'identifier les fibres musculaires ayant une accumulation sous-sarcolemmique de mitochondries appelées "ragged-red fibers" (RRF) (Fibres rouges déchiquetées) (Engel and Cunningham, 1963). En général, les RRFs sont associées à des mutations primaires de l'ADNmt qui affectent la synthèse protéique mitochondriale, comme les mutations ponctuelles dans les gènes d'ARN de transfert ou les larges délétions. Des RRFs sont également observées dans les défauts de communication intergénomiques qui affectent la synthèse protéique.

Les marquages histochimiques et immunohistochimiques des enzymes mitochondriales sont également utiles pour identifier une prolifération mitochondriale excessive et démontrer des défauts enzymatiques spécifiques. En effet, le marquage histochimique de la succinate déhydrogénase (SDH), qui correspond au complexe II de la chaîne respiratoire (succinate-CoQ réductase), est un indicateur de prolifération mitochondriale plus sensible que le trichrome de Gomori. Le marquage histochimique de la cytochrome c oxydase (COX; complexe IV) est également très utile. Chez les patients porteurs d'une mutation dans un gène nucléaire codant pour un facteur d'assemblage de ce complexe, le marquage montre une réduction généralisée dans toutes les fibres musculaires. Au contraire, chez les patients avec des mutations primaires ou secondaires de l'ADN mitochondrial, le profil histochimique est typiquement en mosaïque du fait de l'hétéroplasmie.

Malheureusement, les anomalies histologiques décrites ci-dessus ne sont ni suffisamment spécifiques, ni suffisamment sensibles pour définir toutes les mitochondriopathies. Des anomalies morphologiques mitochondriales sont parfois observées dans des maladies non liées à un déficit primaire de la phosphorylation oxydative, telles que les myopathies inflammatoires (Carpenter et al., 1975) ou les dystrophies myotoniques (Fardeau, 1970). Inversement, certaines maladies

mitochondriales présentent peu ou pas d'anomalies morphologiques des mitochondries, telles que le syndrome de Leigh, la neuropathie optique héréditaire de Leber ou le syndrome NARP (Neuropathy, Ataxia, Retinitis Pigmentosa).

L'activité enzymatique des différents complexes de la chaîne respiratoire peut également être mesurée par spectrophotométrie. Ces études biochimiques peuvent montrer deux types de résultats chez les patients atteints de mitochondriopathies.

- Le premier profil correspond à un déficit partiel de plusieurs complexes contenant des sous-unités codées par l'ADNmt (complexes I, III, et IV), contrastant avec une activité normale ou augmentée de la SDH (complexe II) dont toutes les sous-unités sont codées au niveau nucléaire. Le second profil est caractérisé par un déficit sévère et spécifique d'un complexe de la chaîne respiratoire. Le premier cas est classiquement retrouvé chez des patients porteurs de mutations altérant la synthèse protéique mitochondriale (mutations dans les gènes mitochondriaux d'ARN de transfert, délétions ou déplétion).
- Le second profil est typique d'une mutation dans un gène mitochondrial ou nucléaire codant pour une sous-unité d'un complexe. L'identification d'un déficit isolé d'un complexe oriente les analyses moléculaires pour identifier la mutation responsable.



## **Tableau 1: Définitions cliniques des encéphalomyopathies mitochondriales les plus fréquentes**

### Syndrome de Kearns-Sayre

1. Début avant l'âge de 20 ans
2. Ophthalmoplégie externe progressive
3. Rétinopathie pigmentaire

Plus, au moins un des signes suivants:

1. Protéïnorachie supérieure à 100 mg/dl
2. Bloc de conduction cardiaque
3. Syndrome cérébelleux

### Syndrome MELAS: Encéphalopathie Mitochondriale, Acidose Lactique, Pseudo-accidents vasculaires cérébraux

1. Accidents cérébraux à un âge jeune (typiquement avant 40 ans)
2. Encéphalopathie (convulsions, démence)
3. Ragged-red fibers à la biopsie musculaire, acidose lactique, ou les deux.

### Syndrome MERRF: Epilepsie Myoclonique, Ragged-Red Fibers (Fibres rouges déchiquetées)

1. Myoclonies, ou épilepsie myoclonique
2. Syndrome Cérébelleux
3. Ragged-red fibers

### Syndrome NARP: Neuropathie, Ataxie, Rétinite Pigmentaire

1. Faiblesse musculaire d'origine neurogénique
2. Syndrome cérébelleux
3. Rétinopathie pigmentaire

### Syndrome de Leigh

Début typique dans l'enfance, mais peut commencer à l'âge adulte

*Début chez le nourrisson*

1. Début typiquement vers l'âge de 6 mois chez un nourrisson ayant eu un développement normal
2. Arrêt ou régression du développement psychomoteur, hypotonie, difficultés d'alimentation, anomalies respiratoires
3. Perte visuelle, anomalies oculomotrices
4. Lésions symétriques du ganglion basal et du tronc cérébral.

*Début chez l'enfant*

5. Idem mais une ophtalmoplégie, une dystonie, ou une ataxie peuvent être au premier plan.

## **E. Ataxies autosomiques récessives et récessives liées à l’X**

Le caractère récessif d’une pathologie est évoqué devant un certain nombre d’arguments : les parents des sujets atteints sont sains, de même que les enfants des sujets atteints, et les sujets des deux sexes peuvent être malades. Par ailleurs, la consanguinité des parents accroît l’incidence de la pathologie, et après la naissance d’un enfant atteint, le couple a un risque de 1/4 d’avoir un enfant atteint à chaque grossesse. Dans ce chapitre deux entités récessives liées à l’X atteignant donc uniquement les hommes, les femmes porteuses étant habituellement asymptomatiques ou avec des signes mineurs, seront également présentées.

Contrairement aux ataxies autosomiques dominantes, la plupart des ataxies récessives sont caractérisées par un âge de début avant 20 ans. Elles peuvent être soit congénitales avec des manifestations phénotypiques dès la naissance, soit dégénératives avec un âge de début variable et une aggravation progressive des symptômes. Dans ce manuscrit, j’ai décrit les caractéristiques cliniques et moléculaires des ataxies récessives dont les gènes sont identifiés. De plus, j’ai limité cette description aux syndromes pour lesquelles l’ataxie est au premier plan du tableau clinique. En effet, l’ataxie peut appartenir au spectre clinique de très nombreuses pathologies héréditaires par ailleurs définies par l’association d’autres manifestations cliniques et paracliniques. Ceci est le cas pour de nombreuses maladies métaboliques incluant notamment le syndrome de Refsum, les déficits congénitaux de la glycosylation (CDG-1A, 1C, 1E), les céréoïdes lipofuscinoses neuronales (CLN1, 2, 5), la maladie de Niemann-pick (C1, C2, D), la maladie de Tay-Sachs, la maladie de Wilson, la maladie de Krabbe, le syndrome de Salla...L’ataxie fait aussi partie de syndromes leucodystrophiques de transmission récessive tels que les ataxies de l’enfance avec hypomyélinisation (CACH), la leucoencéphalopathie de Van der Knaap, la maladie de Pelizaeus Merzbacher-like, la leucodystrophie métachromatique et la leucoencéphalopathie récemment associée à des mutations de l’aspartyl-tRNA synthetase mitochondriale (Scheper et al., 2007). Elle est également retrouvée dans plusieurs syndromes dominés par la présence d’une épilepsie tels que le syndrome d’Unverricht Lundborg, les épilepsies myocloniques de Lafora de type 1 et 2, la polymicrogyrie bilatérale fronto-pariétale, ou dans des syndromes caractérisés par un vieillissement prématuré tels que le syndrome de Cockayne ou le xeroderma pigmentosum.

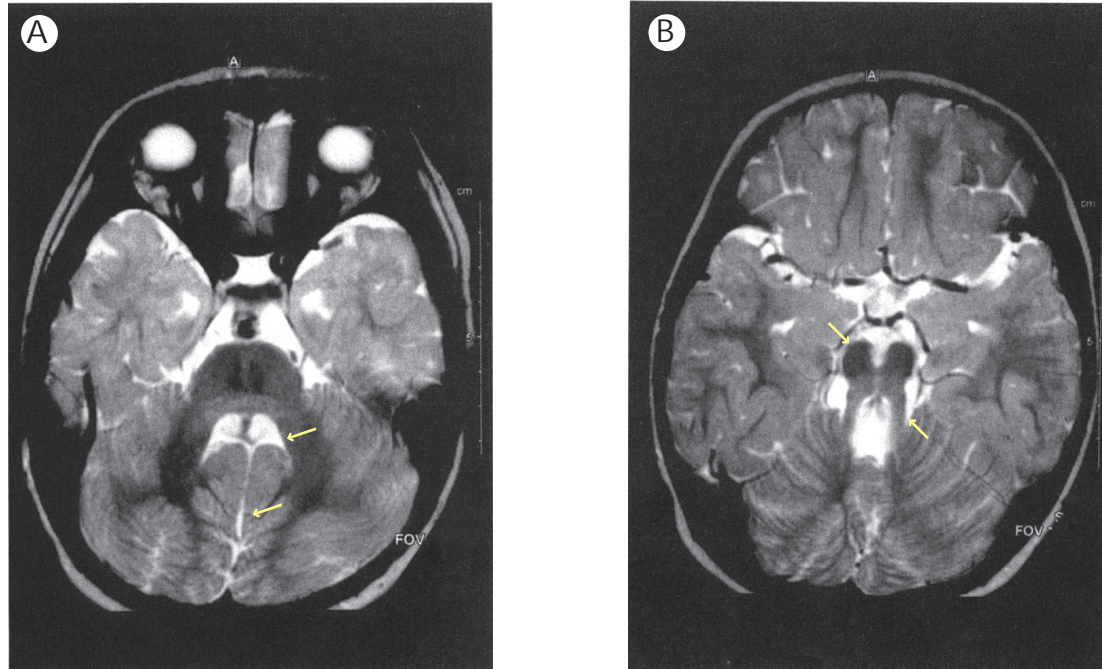
Seules deux entités de transmission récessive liée à l’X seront décrites dans ce chapitre : le syndrome ataxie et tremblement associé à l’X Fragile (FXTAS) et l’ataxie avec anémie sidéroblastique liée à l’X. Il convient de noter qu’une ataxie fait également partie du tableau clinique de deux pathologies avec anomalies de la substance blanche liées au chromosome X : l’adrénoleucodystrophie et la maladie de Pelizaeus-Merzbacher. Cependant l’ataxie n’est habituellement pas au premier plan dans ces entités, et celles-ci ne seront pas décrites dans le cadre de ce manuscrit.

## **1. Ataxies récessives congénitales**

### **a. Syndrome de Joubert et autres syndromes cérébello-oculo-rénaux**

Le syndrome de Joubert (JBTS) est une maladie congénitale de transmission autosomique récessive, initialement décrite dans une famille canadienne par Joubert et al. (Joubert et al., 1969), puis par Bolthausen et al. (Boltshausen and Isler, 1977) dans une famille suisse consanguine et une famille allemande. À ce jour, de très nombreux patients de diverses origines géographiques ont été décrits. Le syndrome de Joubert correspond en réalité à un groupe hétérogène de maladies congénitales ayant en commun une anomalie de développement de la région ponto-cérébelleuse associée ou non à une atteinte extra-neurologique et en particulier à une atteinte oculaire et/ou rénale. La nomenclature de ces maladies également appelées « syndromes cérébello-oculo-rénaux » est complexe et évolue avec le temps, en particulier depuis l’identification récente de plusieurs gènes responsables de ce spectre clinique.

Le critère diagnostique de ces syndromes est neuroradiologique. Il est défini par la présence à l’IRM cérébrale d’une aplasie ou hypoplasie du vermis cérébelleux avec des hémisphères cérébelleux de taille normale, une dilatation du quatrième ventricule cérébral en forme d’ombrelle, des pédoncules cérébelleux supérieurs épais, étirés et horizontalisés, et une fosse inter-pédonculaire profonde. Ces anomalies conduisent, sur des coupes axiales, à l’aspect typique de « dent molaire » du mésencéphale décrit par Maria et al. (Maria et al., 1997) (Figure 4). Les signes neurologiques associés sont constants et caractérisés par une hypotonie axiale et périphérique, une ataxie cérébelleuse et un retard psychomoteur. Le syndrome de Joubert est



**Figure 4 : Imagerie par Résonance Magnétique Cérébrale d'un patient atteint d'un syndrome de Joubert**

A. Coupe axiale au niveau de la fosse postérieure montrant l'aspect en ombrelle du quatrième ventricule (flèches).

B. Coupe axiale au niveau de la région ponto-mésencéphalique montrant des pédoncules cérébelleux épaissis et horizontalisés, et une fosse interpédonculaire profonde constituant le signe typique en "dent molaire" (flèches).

Modifié d'après Steinlin et al. *Neuropediatrics*, 1997.

caractérisé par une importante hétérogénéité clinique entre les familles mais également au sein d'une même famille (Pellegrino et al., 1997 ; Satran et al., 1999 ; Steinlin et al., 1997 ; Sztriha et al., 1999). Les signes cliniques décrits ci-dessous peuvent être ou ne pas être présents en fonction des patients et du gène impliqué.

Une dysmorphie faciale est souvent retrouvée (Steinlin et al., 1997), cependant une étude récente montre que les caractéristiques de cette dysmorphie sont variables, évoluent avec le temps et que cet élément ne facilite pas réellement le diagnostic (Braddock et al., 2007).

Les anomalies du rythme respiratoire et des mouvements oculaires initialement décrits par Joubert et al. (Joubert 1969) ne sont pas des critères diagnostiques obligatoires. Ils peuvent exister transitoirement au cours des premiers mois de vie et ne plus être présents au moment du diagnostic. En période néonatale les épisodes de tachypnée sont très évocateurs et peuvent atteindre 230 cycles par minute. Ils sont favorisés par le stress (Joubert et al., 1969), mais peuvent également survenir au cours du sommeil (Boltshauser et al., 1987). Ils sont souvent suivis d'une apnée centrale généralement inférieure à une minute. Les épisodes de tachypnée-apnée sont essentiellement observés chez le nourrisson et peuvent être la cause d'un décès précoce.

De même, les anomalies des mouvements oculaires à type de nystagmus, strabisme, paralysie du regard vertical et déficit de la poursuite oculaire lente ont tendance à s'atténuer avec l'âge, contrairement à l'apraxie oculo-motrice qui peut apparaître plus tardivement dans l'enfance (Steinlin et al., 1997).

De nombreux enfants atteints d'un syndrome de Joubert ont un déficit visuel de sévérité variable. Ce déficit est dû chez certains patients à des anomalies rétiniennes pouvant schématiquement être de deux types : une dystrophie rétinienne ou un colobome chorio-rétinien impliquant le plus souvent le pôle postérieur (Laverda et al., 1984; Lindhout et al., 1980 ). La dystrophie rétinienne peut correspondre à une rétinopathie pigmentaire précoce et a souvent été confondue avec l'amaurose congénitale de Leber, laquelle n'est pas associée à un spectre syndromique. La dystrophie rétinienne peut également apparaître plus tardivement (Steinlin et al., 1997) justifiant un suivi ophtalmologique des enfants atteints d'un syndrome de Joubert.

Une atteinte rénale peut être observée (Arts et al., 2007; Baala et al., 2007a; Delous et al., 2007; Ivarsson et al., 1993; Keeler et al., 2003; Kendall et al., 1990; Parisi et al., 2004; Parisi et al., 2006; Sayer et al., 2006; Utsch et al., 2006; Valente et al., 2003; Valente et al., 2006b). A

partir des données anatomo-pathologiques et de l'imagerie disponibles lors d'une revue de 101 patients, Satran et al. ont distingué deux types d'anomalies (une dysplasie kystique rénale ou une néphronophtise juvénile) pour lesquelles une concordance chez les patients d'une même famille est observée (Satran et al., 1999). La dysplasie kystique rénale est définie par une différenciation parenchymateuse anormale (Bernstein et al., 1987). Les reins sont souvent de petite taille, immatures (avec des lobulations fœtales), mais peuvent être de taille augmentée en raison de la présence de kystes. L'imagerie permet de poser le diagnostic dès les premiers mois de vie, mais l'insuffisance rénale peut n'apparaître qu'au cours de l'enfance. La néphronophtise juvénile est la cause héréditaire la plus fréquente d'insuffisance rénale chronique chez l'enfant. Elle est définie par une atrophie tubulaire avec un épaississement irrégulier de la membrane basale, associée à une fibrose interstitielle. L'échographie met en évidence des reins de taille normale ou légèrement réduite, des kystes médullaires et une perte de la différenciation cortico-médullaire. Les patients ont une fonction rénale normale au cours des premières années de vie et une insuffisance rénale s'installe le plus souvent autour de la puberté avec des extrêmes entre 2 et 23 ans (Konrad et al., 1998).

D'autres anomalies sont décrites de façon anecdotique dans le syndrome de Joubert. Nous retiendrons uniquement la polydactylie, les spasmes de l'hémiface, les tumeurs de la langue et la fibrose hépatique.

L'évolution des patients est extrêmement variable. Le décès survient fréquemment dans les premiers mois de vie (Saraiva and Baraitser, 1992), mais certains patients survivent jusqu'à l'âge adulte (Steinlin et al., 1997). Le retard mental est souvent sévère, mais peut être modéré (Steinlin et al., 1997). Cette variabilité est retrouvée entre les patients d'une même famille et il est donc très difficile d'établir un pronostic évolutif. De plus, il n'existe pas de corrélation entre la gravité du déficit psychomoteur et l'ampleur des anomalies retrouvées à l'IRM cérébrale (Gitten et al., 1998). Sur le plan moteur, les troubles de la motricité fine sont constants, et l'acquisition de la marche est retardée voir absente. D'autre part, une dystrophie rétinienne, une atteinte rénale et des déformations squelettiques dues à l'hypotonie peuvent apparaître progressivement dans l'enfance et une surveillance multidisciplinaire est nécessaire.

Comme mentionné précédemment plusieurs entités cliniques peuvent être distinguées en fonction des anomalies, en particulier oculaires et rénales, associées à l'aspect en « dent molaire » de la région ponto-cérébelleuse. Ces entités peuvent être regroupées sous le nom de syndromes cérébello-oculo-rénaux (Chance et al., 1999 ; Keeler et al., 2003; Satran et al., 1999 ; Valente et al., 2003 ) incluant le syndrome de Dekaban-Arima, le syndrome de Senior-Löken et le syndrome COACH. Les signes cliniques neurologiques précédemment décrits (ataxie, hypotonie, retard mental, troubles du rythme respiratoire et des mouvements oculaires) sont observés lorsque cette malformation du mésencéphale est présente et sont donc communs aux syndromes cérébello-oculo-rénaux présentés ci-dessous.

Le syndrome de Dekaban-Arima (Arima et al., 1971; Dekaban, 1969 ) associe le signe de la « dent molaire » à une rétinopathie et une dysplasie rénale kystique. Son pronostic est souvent sévère avec un décès dans les premières années de vie (Satran et al., 1999).

Le syndrome de Senior-Löken (Loken et al., 1961; Senior et al., 1961 ) est défini par une rétinopathie et une néphronophtise juvénile. Les anomalies neurologiques n'étaient pas initialement décrites, cependant une hypoplasie du vermis cérébelleux et la malformation ponto-mésencéphalique ont été retrouvées chez certains patients.

Le syndrome COACH est désigné par un acronyme pour hypoplasie du vermis Cérébelleux, Oligophrénie, Ataxie congénitale, Colobome et fibrose Hépatique (Verloes and Lambotte, 1989). Une atteinte rénale de type néphronophtise a été rapportée chez deux patients avec un syndrome COACH (Kumar and Rankin, 1996) et pour Satran et al. l'atteinte rénale appartient au spectre clinique de ce syndrome (Satran et al., 1999).

La classification nosologique de ces entités a considérablement évolué ces dernières années, car l'identification de plusieurs gènes et des études de corrélation génotype-phénotype montrent que cette classification clinique est peu appropriée. En effet, on observe une grande variabilité des phénotypes rencontrés chez des patients présentant des mutations dans un même gène et, inversement, un large chevauchement des spectres cliniques induits par des mutations dans différents gènes existe.

De plus certains gènes responsables d'un syndrome de Joubert ont également été retrouvés mutés dans des syndromes non caractérisés par un signe de la dent molaire tels que le syndrome de Meckel ou la néphronophtise héréditaire.

Le syndrome de Meckel est une affection grave, létale chez le fœtus ou à la naissance, qui présente un chevauchement phénotypique avec le syndrome de Joubert. Il est caractérisé par la présence d'une encéphalocèle occipitale, d'une microcéphalie, d'une fente labio-palatine, de malformations cardiaques, d'une polydactylie, d'une dysplasie rénale de type polykystique et d'une dysplasie hépatique. Des anomalies oculaires variables sont observées dans 30% des cas pouvant inclure une microphthalmie, voire une anophtalmie, une microcornée, une aniridie partielle, une sclérocornée, une cataracte, un colobome irien, une dysplasie rétinienne et une hypoplasie des nerfs optiques (MacRae et al., 1972).

Une classification basée sur les données moléculaires définit à ce jour 7 types de syndrome de Joubert nommés de JBTS1 à 7 (Tableau 2).

**JBTS1** (MIM 213300) a été localisé en 9q34 dans une famille consanguine d'Arabie Saoudite (Saar et al., 1999). Le gène n'est pas connu à ce jour.

**JBTS2** (également appelé CORS2, MIM 608091) est localisé en 11p12-q13 (Keeler et al., 2003 ; Valente et al., 2003) et le gène n'est pas identifié à ce jour. La plupart des patients présentent une atteinte rénale (néphronophtise ou dysplasie kystique) et/ou rétinienne (colobome ou rétinopathie) associée. D'autres malformations tels qu'une polydactylie ont été décrites chez des patients liés à ce locus (Keeler et al., 2003 ; Valente et al., 2005; Valente et al., 2003 ).

**JBTS3** (MIM 608629) est du à des mutations du gène *AHI1* localisé en 6q23 (Dixon-Salazar et al., 2004; Ferland et al., 2004 ; Lagier-Tourenne et al., 2004 ). L'atteinte rétinienne est fréquente dans cette forme alors qu'une atteinte rénale n'a été décrite que chez un patient (Utsch et al., 2006). Des anomalies cérébrales de type polymicrogyrie ou malformations du corps calleux peuvent être retrouvées (Dixon-Salazar et al., 2004 ; Parisi et al., 2006; Valente et al., 2006a ). *AHI1* est fortement exprimé dans le cerveaux (Ferland et al., 2004), et code pour une protéine appelée jouberin dont la fonction n'est pas connue.

**JBTS4** (MIM 609583) est une forme rare de syndrome de Joubert due à des délétions du gène *NPH1* localisé en 2q13 (Parisi et al., 2004). JBTS4 représente une forme relativement



modérée du syndrome de Joubert dans laquelle la fonction cognitive peut être normale (Parisi 2004). Tous les patients présentent une atteinte rénale de type néphronophtise. De larges délétions et, plus rarement, des mutations ponctuelles du gène *NPHP1* sont retrouvées dans 85% des néphronophtises juvéniles sans atteinte extra-rénale (Hildebrandt et al., 1997 ; Konrad et al., 1996 ; Saunier et al., 1997). Quelques patients avec un syndrome de Senior-Loken associant une néphronophtise et une rétinopathie ont également des mutations de *NPHP1* (Caridi et al., 1998). Comme d'autres gènes responsables de néphronophtise et polykystoses rénales, *NPHP1* code pour une protéine impliquée dans la fonction des cils (Fliegauf et al., 2006; Jauregui and Barr, 2005 ; Winkelbauer et al., 2005 ).

**JBTS5** (MIM 610188) est dû à des mutations du gène *CEP290* (aussi appelé *NPHP6*) localisé en 12q21 (Brancati et al., 2007 ; Helou et al., 2007; Sayer et al., 2006 ; Valente et al., 2006b ). Les patients présentent un phénotype variable pouvant associer une atteinte rétinienne et/ou rénale. Des mutations de *CEP290* ont également été identifiées chez des patients ayant une dystrophie rétinienne sévère, appelée amaurose congénitale de Leber, sans atteinte neurologique associée (den Hollander et al., 2006) et, à l'opposé du spectre phénotypique, chez des foetus présentant un syndrome de Meckel (Baala et al., 2007a). *CEP290* est hautement exprimé dans les neurones cérébelleux granulaires et code pour la protéine nephrocystin-6 localisée dans le centrosome et les cils, rapprochant le syndrome de Joubert des autres ciliopathies.

**JBTS6** (MIM 610688) est dû à des mutations dans le gène *TMEM67* localisé en 8q22 (Baala et al., 2007b). Des mutations du gène *TMEM67* sont également responsables du syndrome de Meckel de type 3 (MKS3, MIM607361) (Smith et al., 2006). *TMEM67* code pour la protéine transmembranaire 67, également appelée meckelin, qui pourrait jouer un rôle dans la fonction ciliaire (Dawe et al., 2007).

**JBTS7** (MIM 611560) est dû à des mutations dans le gène *RPGRIP1L* localisé en 16q12 (Arts et al., 2007; Delous et al., 2007 ). Les patients ont un syndrome de Joubert incluant dans tous les cas une atteinte rénale. Des mutations de *RPGRIP1L* ont également été identifiées chez des foetus présentant un syndrome de Meckel (Delous et al., 2007). *RPGRIP1L* code pour une protéine localisée au niveau des cils et des centrosomes.

En conclusion, le syndrome de Joubert correspond à un groupe hétérogène de pathologies dont le spectre clinique est très large. Les données récentes de biologie moléculaire ont permis de rapprocher ce syndrome des autres ciliopathies dont la liste ne cesse de s'allonger et inclut les dyskinésies ciliaires primitives, le syndrome de Kartagener, les dysplasies rénales héréditaires, les dysplasies rétiniennes, le syndrome de Meckel, le syndrome de Bardet-Biedl, le syndrome de Usher, le syndrome d'Alström, et le syndrome oro-facio-digital de type 1 (Badano et al., 2006).

**Tableau 2 : Caractéristiques cliniques et génétiques des différentes formes du Syndrome de Joubert**

<b>Maladie</b>	<b>OMIM</b>	<b>Locus</b>	<b>Gène</b>	<b>Caractéristiques</b>
JBTS1	213300	9q34	?	Atteinte neurologique isolée
JBTS2 CORS2	608091	11p12-q13	?	Néphronoptise ou dysplasie kystique, colobome ou rétinopathie, polydactylie
JBTS3	608629	6q23	<i>AHII</i>	Rétinopathie, polymicrogyries, anomalies du corps calleux
JBTS4	609583	2q13	<i>NPH1</i>	Atteinte cognitive modérée, Néphronoptise
JBTS5	610188	12q21	<i>CEP290 / NPH6</i>	Spectre large de l'amaurose congénitale sans atteinte neurologique au syndrome de Meckel
JBTS6 MKS3	610688	8q22	<i>TMEM67</i>	Spectre large. Atteinte rénale, atteinte hépatique
JBTS7	611560	16q12	<i>RPGRIP1L</i>	Spectre large, atteinte rénale, rétinienne, hépatique

### **b. Ataxie cérébelleuse de Cayman**

L'ataxie cérébelleuse de Cayman (MIM 601238) a uniquement été décrite chez des patients originaires de l'île de Grand Cayman dans la mer des Caraïbes (Nystuen et al., 1996). Elle est caractérisée par un retard psychomoteur, une ataxie cérébelleuse non progressive, un nystagmus, une hypotonie, un tremblement d'intention et une dysarthrie.

Le gène responsable de l'ataxie cérébelleuse de Cayman est le gène *ATCAY* localisé en 19p13 (Bomar et al., 2003; Nystuen et al., 1996). Tous les patients présentent une mutation G>T dans la troisième base de l'intron 9 altérant l'épissage de l'exon 9. Le gène *ATCAY* code pour la caytaxine dont la fonction n'est pas connue, et dont l'expression est spécifique des neurones. La caytaxine contient un motif CRAL-TRIO impliqué dans la fixation de petites molécules lipophiliques. Ce motif est également retrouvé dans la protéine de transfert de l' $\alpha$ -tocopherol (TPPA) mutée dans l'ataxie avec déficit isolé en vitamine E. Un modèle souris appelé « jittery » présente une mutation spontanée dans l'homologue murin du gène *ATCAY* responsable d'une ataxie sévère (Bomar et al., 2003; Kapfhamer et al., 1996).

### **c. L'hypoplasie ponto-cérébelleuse de type 6 (PCH6)**

Les hypoplasies ponto-cérébelleuses constituent un groupe hétérogène de maladies sévères associées à un défaut congénital du pont et des hémisphères cérébelleux. Récemment, le premier gène responsable d'hypoplasie ponto-cérébelleuse à été identifié dans une famille juive sépharade, dont 3 enfants étaient atteints de l'hypoplasie ponto-cérébelleuse de type 6 (PCH6, MIM 611523) (Edvardson et al., 2007). Les patients présentent dès la naissance une hypotonie majeure avec une hypoplasie ponto-cérébelleuse à l'IRM. L'évolution est sévère avec un décès à 7 semaines et 16 mois chez deux des patients. Aucune acquisition psychomotrice n'est observée et les patients développent une microcéphalie et des convulsions généralisées.

Aucune anomalie biologique n'est mise en évidence dans le sang, en particulier les taux de lactate plasmatique, les CPK, la fonction rénale et la fonction hépatique sont normales. Une dysfonction mitochondriale a cependant été mise en évidence sur les biopsies musculaires ou les

fibroblastes en culture des patients. Chez une des patientes, les activités des complexes de la chaîne respiratoire étaient toutes diminuées avec une relative préservation du complexe II lequel est formé de sous-unités uniquement codées par l'ADN nucléaire. Cette observation suggérait un déficit de la synthèse des protéines codées par l'ADN mitochondrial.

Grâce à une analyse de liaison par homozygotie, Edvardson et al. ont identifié une mutation d'épissage (IVS2+5A>G) dans le gène *RARS2* localisé en 6q15 (Edvardson et al., 2007). Ce gène code pour une Arginyl-tRNA synthetase mitochondriale (Bonfond et al., 2005 ; Edvardson et al., 2007). Une étude de la stabilité et de l'amino-acylation de l'ARNt<sup>Arg</sup> dans les fibroblastes d'un patient montre une diminution majeure de la quantité d'ARNt<sup>Arg</sup>, alors que le transcrit ARNt<sup>Arg</sup> résiduel est correctement amino-acylé (Edvardson et al., 2007) suggérant que les transcrits non chargés de leur acide aminé sont instables. Le déficit en ARNt<sup>Arg</sup> synthétase chez la levure est également responsable d'un déficit de synthèse des protéines mitochondriales, et d'une réduction de l'activité des complexes III, IV et V (Tzagoloff and Shtanko, 1995).

#### **d. Le syndrome de Marinesco-Sjögren (MS)**

Le syndrome de Marinesco-Sjögren (MS ; MIM : 248800) est une affection congénitale rare, de transmission autosomique récessive, décrite en 1931 par Marinesco et al. dans une famille Roumaine (Marinesco et al., 1931), puis par Sjögren et al. dans 14 familles scandinaves (Sjögren, 1950). Ce syndrome a depuis été décrit chez des patients de différentes origines.

Il est caractérisé par l'association d'une hypotonie, d'une ataxie cérébelleuse, d'une cataracte bilatérale, d'un retard psychomoteur modéré et d'un retard de croissance staturo-pondérale. Superneau et al. ont montré qu'une myopathie chronique avec l'apparition progressive d'une faiblesse et d'une atrophie musculaire était un signe cardinal du syndrome (Superneau et al., 1987). Un hypogonadisme avec un retard du développement pubertaire est également observé.

Une variabilité clinique est présente dans le syndrome de MS. En effet, la cataracte bilatérale peut être soit congénitale, soit d'apparition rapidement progressive dans les premières années de vie (Ishikawa et al., 1993; Komiyama et al., 1989) justifiant un suivi ophtalmologique régulier. De plus, la sévérité du déficit intellectuel est variable et certains auteurs décrivent la

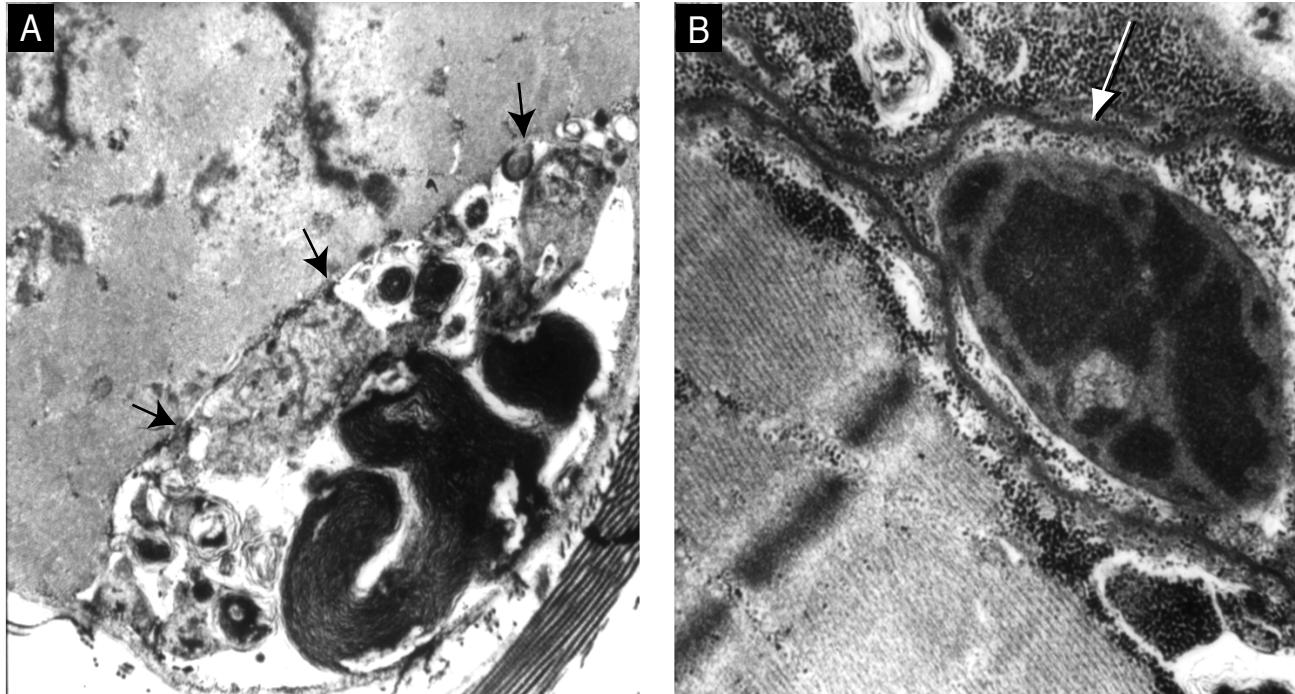
présence occasionnelle d'une microcéphalie, de convulsions (Goto et al., 1990 ; McLaughlin et al., 1996), d'une atrophie optique (Dotti et al., 1993) ou d'une surdité (Begeer et al., 1991; Newton, 1991 ). Une neuropathie périphérique a également été décrite chez quelques patients (Aguglia et al., 2000; Alexianu et al., 1983 ; Farah et al., 1997 ; Hakamada et al., 1981 ; Muller-Felber et al., 1998 ; Zimmer et al., 1992 ), mais n'est pas classique dans ce syndrome.

Le dosage sanguin des CPK démontre souvent une élévation modérée entre 200 et 500 UI/l, mais ce taux peut être normal. Le bilan hormonal peut mettre en évidence une élévation de la TSH et de la LH et une diminution des hormones soit ovariennes soit testiculaires, caractéristiques d'un hypogonadisme hypergonadotrope. Le dosage de la vitamine E et le bilan lipidique sont habituellement normaux.

L'IRM cérébrale met en évidence une atrophie cérébelleuse globale souvent isolée (Todorov 1965). Plus rarement des anomalies cérébrales associées ont été décrites à type d'atrophie cérébrale, de diminution diffuse de la substance blanche (Bromberg et al., 1990 ; McLaughlin et al., 1996), d'agénésie du corps calleux (Georgy et al., 1998), d'anomalies hypophysaires (McLaughlin et al., 1996), de kyste de la fosse postérieure ou d'atrophie du tronc cérébral.

L'électromyogramme est en général compatible avec une myopathie, et les études de conduction nerveuse sont normales. Cependant, chez quelques patients, une diminution des vitesses de conduction nerveuses en faveur d'une neuropathie sensitivo-motrice démyélinisante est décrite (Aguglia et al., 2000; Muller-Felber et al., 1998 ; Zimmer et al., 1992 ).

Des modifications de type myopathique sont observées sur les biopsies musculaires incluant des fibres de taille variable, des vacuoles bordées (Goto et al., 1990 ; Herva et al., 1987 ; Ishikawa et al., 1993 ; Kodama et al., 1992 ; Sasaki et al., 1996 ; Sewry et al., 1988 ; Superneau et al., 1987 ; Suzuki et al., 1997) et un processus de nécrose-régénération. Une accumulation sous-sarcolemmique de mitochondries de taille et de forme anormales, sans déficit associé de la chaîne respiratoire, a également été décrite par certains auteurs (Borud et al., 1989 ; Goto et al., 1990 ; Sasaki et al., 1996; Sewry et al., 1988 ; Superneau et al., 1987 ; Torbergsen et al., 1991 ). D'autre part, la microscopie électronique met en évidence, chez certains patients, une structure membranaire dense perinucléaire (Sasaki et al., 1996 ; Sewry et al., 1988 ; Suzuki et al., 1997), d'origine inconnue, qui serait pathognomonique du syndrome de MS (Figure 5).



**Figure 5: Biopsie musculaire en microscopie électronique d'un patient atteint d'un syndrome de Marinesco-Sjögren**

A. Vacuole bordée sous-sarcolemmiques (flèches) contenant des débris sarcoplasmiques et des amas de corps myéliniques. Foyers de désorganisation myofibrillaire proches de la vacuole bordée.

B. Structure membranaire dense (flèche) entourant un noyau apoptotique avec de la chromatine fragmentée

Par ailleurs, certains auteurs ont décrit une accumulation de lysosomes anormaux dans les fibroblastes issus de biopsies cutanées ou conjonctivales (Walker et al., 1985 ; Zimmer et al., 1992). Les lysosomes sont nombreux, de grande taille, et contiennent des inclusions lamellaires en spirales uni- ou poly-centriques (Walker et al., 1985). Cependant, aucun déficit enzymatique lysosomal connu n'a été mis en évidence dans le syndrome de MS.

L'évolution est caractérisée par un retard des acquisitions motrices, en partie à cause de l'ataxie cérébelleuse et de l'hypotonie. La marche est le plus souvent acquise entre 5 et 10 ans, mais peut être perdue en raison de la myopathie chronique. Le retard mental est souvent modéré : le langage est acquis au cours de la première décennie, et la plupart des patients bénéficiant d'une éducation spécialisée apprennent à lire et à écrire. L'évolution peut également être marquée par la constitution de déformations squelettiques non spécifiques tels qu'une cyphoscoliose, des pieds plats valgus, des métacarpes et métatarses courts, une coxa valga, ou un genu valgus (Brogdon 1996).

Aucun traitement spécifique n'est connu dans le syndrome de MS, cependant une prise en charge multidisciplinaire du retard psychomoteur et des problèmes visuels doit être mis en place avec des séances régulières de kinésithérapie, d'orthophonie et d'orthoptie dès les premières années de vie. Un traitement par hormone de croissance peut être proposé au cours des premières années, et une substitution hormonale est souvent nécessaire à l'adolescence en raison de l'hypogonadisme hypergonadotrope. La cataracte, et dans certains cas les déformations squelettiques, sont traitées chirurgicalement.

Au début de cette étude, aucun locus n'était identifié pour le syndrome de MS. Merlini et al. (Merlini et al., 2002) avaient proposé l'hypothèse d'une homogénéité génétique entre le syndrome de MS et le syndrome CCFDN (Congenital Cataracts Facial Dysmorphism Neuropathy ; MIM : 604168). Ce dernier a été décrit par Tournev et al. uniquement chez des patients issus de familles tziganes (Tournev et al., 1999a). Il est caractérisé par une transmission autosomique récessive, une cataracte congénitale bilatérale, une microcornée, une dysmorphie faciale (Figure 6), un déficit staturo-pondéral, un déficit psychomoteur léger et une neuropathie périphérique démyélinisante (Tournev et al., 1999a ; Tournev et al., 1999b). Une ataxie modérée est parfois retrouvée. L'IRM retrouve une atrophie spinale et cérébrale avec dilatation des ventricules





**Figure 6: Dymorphie faciale du syndrome CCFDN**

Etage moyen de la face proéminent avec tissus péribuccaux épais et dentition orientée vers l'avant. Hypognatisme.

Issu de Tournev et al. *Ann Neurol*, 1999.



**Figure 7: Déformations squelettiques chez des patients atteints d'un syndrome CCFDN**

Photographies données par le Pr Hélène Dollfus.

latéraux, mais il n'y a habituellement pas d'atrophie cérébelleuse. L'évolution est souvent marquée par l'apparition de déformations squelettiques majeures (Figure 7) et d'un hypogonadisme.

Par une stratégie de cartographie par homozygotie, le gène du syndrome CCFDN a été localisé en 18qter (Angelicheva et al., 1999), puis une mutation fondatrice affectant l'épissage du gène *CTDPI* a été identifiée chez tous les patients atteints du syndrome CCFDN (Varon et al., 2003).

Merlini et al. avaient étudié la région 18qter chez 3 familles d'origine tzigane dont les enfants atteints présentaient un syndrome de MS associé à une rhabdomyolyse aiguë (Merlini et al., 2002). Ayant mis en évidence une liaison de la maladie au locus 18qter dans ces familles, ils ont suggéré qu'il existait une homogénéité génétique entre les syndromes CCFDN et de Marinesco-Sjögren.

Dès mon arrivée au laboratoire j'ai entrepris l'étude de familles dont les patients avaient un diagnostic de MSS. Cette étude a permis l'identification du locus du syndrome de MS, puis une collaboration avec l'équipe du Pr Lehesjoki a permis l'identification du gène responsable du syndrome de MS. Ces études moléculaires associées à des études de corrélation génotype-phénotype ont montré que le syndrome de MS et le syndrome CCFDN étaient des entités cliniques et génétiques distinctes et ont permis une description précise du spectre clinique du MS. Ces résultats sont présentés dans le chapitre Résultats.

## **2. Ataxies récessives dégénératives**

En 15 ans, 14 gènes responsables d'ataxies récessives dégénératives et plus de 10 loci ont été identifiés. De plus, la constitution de bases de données à partir de l'analyse pangénome par puces de génotypage systématique de toutes les familles consanguines tel que nous le pratiquons au sein du laboratoire, montre que de très nombreuses familles ne sont liées à aucun de ces loci, et qu'il existe une hétérogénéité génétique majeure dans ce groupe de pathologies. Plusieurs classifications ont été proposées dont celle de M. Koenig (Koenig, 2003) présentée dans le Tableau 3 qui s'appuie sur le site principal de la dégénérescence : ataxies cérébelleuses pures, ataxies sensitives et spino-cérébelleuses, ataxies cérébelleuses avec neuropathie sensitivo-

motrice. Cependant, le site de l'atteinte n'est pas toujours évident à déterminer en pratique clinique. Il peut par exemple s'avérer difficile de différencier cliniquement une atteinte cérébelleuse d'une atteinte spinocérébelleuse notamment lorsqu'il existe une neuropathie associée. De plus, le site de l'atteinte peut varier en fonction des patients au sein d'une même entité. Dans le cadre de ce manuscrit, les différentes ataxies récessives dégénératives seront présentées en fonction de leur mécanisme physiopathologique. En effet, deux grands mécanismes semblent être communs à plusieurs ataxies récessives : une dysfonction mitochondriale et/ou un stress oxydant, et une dysfonction des processus de réparation de l'ADN. Il est tentant d'essayer d'établir des liens physiopathologiques entre les différentes ataxies, cependant on verra qu'au sein d'un même groupe plusieurs mécanismes différents peuvent être impliqués, et que d'autres voies moléculaires, tel que le contrôle du repliement protéique, jouent également un rôle dans la survenue des ataxies dégénératives.

**Tableau 3 : Classification des ataxies autosomiques récessives dégénératives proposée par Koenig (2003).**

<b>Maladie</b>	<b>Locus</b>	<b>Gène</b>
<b>Ataxie Cérébelleuse pure</b>		
Ataxie téléangiectasie (AT)	11q22	<i>ATM</i>
Ataxie téléangiectasie-like (ATLD)	11q21	<i>MRE11</i>
Ataxie spastique autosomique récessive de Charlevoix-Saguenay (ARSACS)	13q12	<i>SACS</i>
Neuropathie sensitive ataxiante avec dysarthrie et ophtalmoparésie (SANDO)	15q26	<i>POLG</i>
<b>Ataxie sensitive et spino-cérébelleuse</b>		
Ataxie de Friedreich (FRDA)	9q13	<i>FXN</i>
Ataxie avec déficit en vitamine E (AVED)	8q13	<i>TTPA</i>
Abétalipoprotéïnémie (ABL)	4q23	<i>MTTP</i>
Ataxie spino-cérébelleuse de début infantile (IOSCA)	10q24	<i>Twinkle</i>
Maladie de Refsum (RD)	10p13	<i>PHYH</i>
<b>Ataxie cérébelleuse et neuropathie sensitivo-motrice</b>		
Ataxie avec apraxie oculomotrice de type 1 (AOA1)	9p13	<i>APTX</i>
Ataxie avec apraxie oculomotrice de type 2 (AOA2)	9q34	<i>SETX</i>
Ataxie spino-cérébelleuse plus neuropathie (SCAN1)	14q31	<i>TDPI</i>

### **a. Protéines mitochondriales et stress oxydant**

Le cerveau a une consommation d'oxygène très élevée lui permettant une production d'énergie par métabolisme oxydatif, via la chaîne respiratoire mitochondriale. La phosphorylation oxydative génère de l'ATP en réduisant l'oxygène en eau. Au cours de ce processus, une déperdition d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire entraîne la formation d'espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species : ROS). L'anion superoxyde  $O_2^-$  (produit par le gain d'un électron), est le premier ROS formé et est le précurseur de la plupart des ROS. La dismutation de l'anion superoxyde produit le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) qui peut à son tour soit être totalement réduit en eau, soit en présence d'ions ferreux ou d'ions cuivre être transformé en un radical hydroxyl hautement toxique ( $OH^\cdot$ ). La production de ROS est un phénomène cellulaire normal qui est habituellement en situation d'équilibre avec les mécanismes biochimiques antioxydants incluant des enzymes telles que les superoxyde dismutases (SOD), les catalases et les peroxydases, ou des molécules de faible poids moléculaire telles que l'ascorbate (vitamine C), le glutathion, les tocophérols (vitamine E) ou la forme réduite du coenzyme Q ( $CoQH_2$ ). Cependant, lorsque cet équilibre est rompu par un excès de production de ROS et/ou un déficit en antioxydants un « stress oxydant » intervient au cours duquel les ROS sont responsables de lésions oxydatives des protéines, de l'ADN et des lipides membranaires, avec des conséquences majeures sur les fonctions et l'intégrité cellulaire. Les mécanismes primaires à l'origine des ataxies regroupées dans cette catégorie ont un caractère commun, à savoir le stress oxydant.

Comme nous le verrons, l'ataxie de Friedreich et l'ataxie avec anémie sidéroblastique sont liées à des anomalies du métabolisme des protéines à centre fer-soufre (Fe-S) qui mènent à une production accrue de radicaux libres, alors que l'AVED et l'ABL, toutes deux des ataxies liées au métabolisme d'une molécule anti-oxydante la vitamine E, résultent d'une augmentation de la peroxydation des lipides en particulier des membranes neuronales. Enfin, les ataxies dues à des mutations de *Twinkle* et *POLG* sont les prototypes de maladie par un « défaut de communication intergénomique ». Ces pathologies sont dues à des mutations dans des gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales nécessaires au maintien de l'intégrité du génome mitochondrial. Ces mutations sont habituellement responsables d'une perte de la stabilité de l'ADNmt ayant pour conséquence une dysfonction de la chaîne respiratoire.

### **a.1. L'ataxie de Friedreich (FRDA)**

L'ataxie de Friedreich (FRDA, MIM 229300) est l'ataxie héréditaire la plus fréquente avec une prévalence estimée entre 1:30000 et 1 :50000 dans la population caucasienne mais elle est quasiment inexistante dans les autres populations (Cossee et al., 1997; Lopez-Arlandis et al., 1995 ). L'âge de début est typiquement entre 5 et 25 ans. Les patients développent une ataxie progressive avec une dysarthrie, une aréflexie, une altération de la sensibilité proprioceptive et de la vibration, des anomalies des mouvements oculaires, une atteinte pyramidale avec faiblesse musculaire et un signe de Babinski (Delatycki et al., 2000; Harding, 1981 ). L'évolution est souvent compliquée par la survenue d'une cardiomyopathie hypertrophique, et plus rarement par la survenue d'un diabète, d'une surdité de perception, d'une atrophie optique, de déformations squelettiques. La perte de la marche intervient souvent dès l'adolescence et les complications cardiaques peuvent être responsables d'un décès prématuré. Le développement intellectuel est normal.

L'anomalie neuropathologique la plus précoce dans l'ataxie de Friedreich est une perte des corps cellulaires des neurones sensitifs de large diamètre au niveau des ganglions rachidiens postérieurs (Lamarche 1984). Lorsque la pathologie évolue, une dégénérescence des colonnes postérieures de la moelle est observée et s'associe à une atrophie des faisceaux spinocérébelleux et des faisceaux cortico-spinaux moteurs ainsi que des fibres sensitives myélinisées de gros diamètre des nerfs périphériques (Koeppen, 1998 ; Lamarche et al., 1984 ; Voncken et al., 2004).

L'IRM ne montre habituellement pas d'atrophie cérébelleuse ou une atrophie modérée après plusieurs années d'évolution, alors qu'il existe une atrophie médullaire sévère. L'EMG révèle une neuropathie sensitive axonale sans atteinte de la conduction motrice (Ingall and McLeod, 1991 ; Said et al., 1986 ; Zouari et al., 1998).

Il est important de noter que la présentation clinique des patients atteints de FRDA peut être très variable notamment dans l'âge de début, la rapidité d'aggravation, et l'étendue des manifestations. En effet, des formes atypiques de FRDA ont été décrites, comme l'ataxie de Friedreich de début tardif (Berciano et al., 2005 ; Bhidayasiri et al., 2005; Bidichandani et al., 2000 ; Durr et al., 1996 ; Gellera et al., 1997 ; Labauge, 2002 ; Lhatoo et al., 2001 ; Patel and

Dimachkie, 2000 ; Schols et al., 1997 ; Sorbi et al., 2000 ) ou l'ataxie de Friedreich avec persistance des réflexes ostéotendineux (Montermini et al., 1997; Palau et al., 1995 ). Cette variabilité phénotypique est plus marquée au niveau inter-familial qu'intra-familial, bien que de grandes différences aient été observées au sein d'une même fratrie (Harding, 1981 ; Winter et al., 1981). Du fait de sa grande fréquence et de formes atypiques, une analyse moléculaire du gène responsable de FRDA est donc indiquée en première intention chez tout patient présentant une ataxie sporadique ou de transmission récessive (Abele et al., 2002; Schols et al., 1997 ).

Le gène responsable de la maladie de Friedreich, identifié dans le laboratoire, est le gène *FXN* localisé en 9q13 et codant pour une protéine de 210 acides aminés appelée frataxine (Campuzano et al., 1996). Plus de 95% des patients sont homozygotes pour une expansion de triplets GAA dans le premier intron du gène *FXN*, et les autres patients sont hétérozygotes composites pour l'expansion et une mutation ponctuelle (Campuzano et al., 1996 ; Cossee et al., 1999 ; Gellera et al., 2007).

Le nombre de répétitions GAA est normalement compris entre 7 et 32, alors que les patients sont porteurs d'expansions de taille variant de 90 à plus de 1000 répétitions (Campuzano et al., 1996 ; Cossee et al., 1997 ; Durr et al., 1996 ; Montermini et al., 1997). Cette expansion est responsable d'une diminution de la transcription du gène et donc de la production de frataxine par la formation d'une structure d'ADN en triple hélice interférant avec l'élongation de la transcription (Bidichandani et al., 1998 ; Ohshima et al., 1998), ou par induction d'une hétérochromatinisation des séquences régulatrices flanquantes. Le taux résiduel de protéine est inversement corrélé à la taille de la plus petite des deux expansions présentes chez le patient (Bidichandani et al., 1998 ; Campuzano et al., 1997 ; Grabczyk and Usdin, 2000 ; Patel and Isaya, 2001). En conséquence, la taille de la plus petite expansion est inversement corrélée à l'âge de début et à la sévérité du phénotype, en particulier à la survenue d'une cardiomyopathie (Durr et al., 1996 ; Filla et al., 1996 ; Gellera et al., 1997; Isnard et al., 1997 ; Montermini et al., 1997 ). Certaines expansions de petite taille sont plus stables, ceci étant dû à des interruptions du triplet, par exemple par une séquence hexanucléotidique (GAGGAA)<sub>n</sub>. Elles sont le plus souvent associées à des formes tardives et atypiques de la maladie (Mateo et al., 2003 ; Pandolfo, 2001 ; Puccio and Koenig, 2000; Schols et al., 1997 ). De même, si une grande partie des patients hétérozygotes composites est cliniquement indiscernable des patients homozygotes, certaines

mutations ponctuelles sont liées à des tableaux atypiques (Bidichandani et al., 1997 ; Cossee et al., 1999; Filla et al., 1996 ). En particulier, la mutation ponctuelle la plus fréquente (G130V) est associée à une ataxie spastique avec préservation des réflexes. L'expansion est responsable d'une diminution de l'expression de la frataxine, cependant il persiste une activité résiduelle et une perte totale est certainement responsable d'une létalité embryonnaire telle qu'elle est observée chez les souris knock-out pour le gène *Fxn* (Cossee et al., 2000). Au contraire, la création de modèles murins conditionnels et inductibles pour la maladie de Friedreich a permis d'obtenir des souris qui possèdent les caractéristiques biochimiques et physiopathologiques de la maladie humaine (Puccio et al., 2001) et constituent un outil primordial pour la compréhension des processus pathogéniques et l'évaluation des stratégies thérapeutiques (Seznec et al., 2004 ; Simon et al., 2004).

La frataxine est une protéine ubiquitaire localisée dans la mitochondrie (Babcock et al., 1997; Campuzano et al., 1997 ; Koutnikova et al., 1997 ) et dont la fonction précise n'est pas connue. Au moins 5 hypothèses concernant la fonction primaire mitochondriale de la frataxine ont été proposées : le transport du fer (Babcock et al., 1997), le stockage du fer (Adamec et al., 2000 ; Gakh et al., 2002), une activité antioxydante (Babcock et al., 1997), une stimulation de la phosphorylation oxydative (Ristow et al., 2000) et la biosynthèse des centres fer-soufre (Fe-S) (Huynen et al., 2001; Rotig et al., 1997 ). Ceci suggère que le mécanisme physiopathologique de FRDA est un processus « multi-étapes » (Puccio and Koenig, 2002 ; Taroni and DiDonato, 2004) et les données actuelles montrent que FRDA résulte d'un déficit primaire de la biosynthèse des centres Fe-S, responsable notamment d'une accumulation de fer et d'une dysfonction de la chaîne respiratoire, entraînant un stress oxydant qui est responsable de lésions cellulaires et en particulier pourrait aggraver le déficit en protéines à centres Fe-S (Taroni and DiDonato, 2004).

L'étude de l'homologue de la frataxine chez la levure, Yfh1p, a montré une inhibition de la phosphorylation oxydative et une accumulation de fer mitochondrial, entraînant une augmentation de la sensibilité aux agents oxydants (Babcock et al., 1997 ; Foury and Cazzalini, 1997 ; Gakh et al., 2002 ; Gakh et al., 2006) indiquant un rôle de la frataxine dans l'homéostasie du fer. De même, des dépôts de fer ont été observés sur les biopsies myocardiques et un processus de stress oxydant aurait été mis en évidence dans les fibroblastes de patients FRDA



(Wong et al., 1999). De plus, la mesure de la production d'ATP dans le muscle squelettique de patient révèle une anomalie de la respiration mitochondriale (Lodi et al., 1999).

Cependant un rôle primaire de la frataxine dans le stockage du fer semble aujourd'hui écarté. In vitro, la protéine Yfh1 (Adamec et al., 2000) et la frataxine humaine (Cavadini et al., 2002) forment un complexe macromoléculaire en présence de fer. Cependant, les études structurales n'ont pas permis de confirmer la formation en structures de haut poids moléculaire ou la capacité de fixation du fer de la frataxine (Adinolfi et al., 2002). L'absence d'homologie entre la frataxine et les ferritines, protéines classiques de stockage du fer, font également émettre des doutes quand à l'hypothèse d'un rôle direct de la frataxin dans le stockage mitochondrial du fer (Taroni and DiDonato, 2004). De plus, une létalité embryonnaire a été observée chez les souris knock-out pour le gène de la frataxine, en absence d'accumulation mitochondriale de fer (Cossee et al., 2000). Enfin, l'étude des modèles souris conditionnels montre que l'accumulation de fer intervient après le début de la pathologie, et surtout après l'inactivation des enzymes Fe-S (Puccio et al., 2001 ; Simon et al., 2004). L'ensemble de ces données indiquent que l'accumulation de fer est un évènement secondaire dans le processus physiopathologique.

Il est aujourd'hui démontré que la frataxine joue un rôle majeur dans la biosynthèse des centres Fe-S nécessaires à l'activité de nombreuses protéines. En effet, dès 1997 Rötig et al. ont montré que les activités des enzymes mitochondriales contenant des noyaux Fe-S, tels que les complexes I, II et III de la chaîne respiratoire, mais également l'activité des aconitases mitochondriale et cytosolique, étaient significativement réduites chez les patients FRDA (Rotig et al., 1997). Plus récemment, Martelli et al. ont montré que la frataxine était nécessaire pour la biosynthèse mitochondriale de centres Fe-S associés à des enzymes cytosoliques ou nucléaires (Martelli et al., 2007).

La biosynthèse des centres Fe-S est un processus conservé au cours de l'évolution (Muhlenhoff et al., 2002). Chez la levure, l'absence d'Yfh1 entraîne un déficit partiel de maturation des protéines à centres Fe-S (Duby et al., 2002; Muhlenhoff et al., 2002 ). Le rôle de la frataxine dans la biosynthèse des centres Fe-S est également supporté par l'identification de l'interaction de Yfh1 avec Isu1 et Nfs1, deux composants indispensables pour les premières étapes de cette biosynthèse (Gerber et al., 2003 ; Ramazzotti et al., 2004). Enfin, des études in

in vitro suggèrent que la frataxine joue un rôle de transfert du fer vers la protéine IscU qui est l'homologue humaine d'Isu1 (Yoon and Cowan, 2003).

Un déficit de la synthèse des centres Fe-S chez les patients FRDA peut entraîner de nombreuses altérations biologiques par l'inactivation de protéines impliquées dans divers processus cellulaires (Martelli et al., 2007). De plus, il est bien établi dans les modèles levures, qu'une accumulation mitochondriale de fer est une conséquence directe d'un déficit de la biosynthèse des centres Fe-S (Chen et al., 2002). Par exemple, une délétion du gène *Atm1* de la levure qui code pour une protéine impliquée dans l'export mitochondrial des centres Fe-S entraîne une accumulation de fer intra-mitochondrial (Kispal et al., 1999). Il est intéressant de noter que l'homologue d'*Atm1* chez l'homme est *ABCB7* qui est muté dans l'ataxie avec anémie sidéroblastique liée à l'X (Allikmets et al., 1999). Cette accumulation de fer peut à son tour être responsable d'un stress oxydant et aggraver le déficit en protéines à centres Fe-S (Bulteau et al., 2003; Bulteau et al., 2004).

Devant l'implication d'un stress oxydant dans la physiopathologie de FRDA, les stratégies thérapeutiques se sont orientées vers l'utilisation de molécules anti-oxydantes, cependant à ce jour aucune molécule n'a prouvé son efficacité dans la réduction des signes neurologiques. Une étude récente a montré qu'une association de coenzyme Q<sub>10</sub> et vitamine E a un effet bénéfique sur la fonction cardiaque et pourrait stabiliser certains signes neurologiques (Hart et al., 2005). Des études précédentes avaient également montré l'effet positif de l'idebenone, un analogue synthétique du coenzyme Q<sub>10</sub>, sur l'atteinte cardiaque et non sur l'atteinte neurologique des patients FRDA (Buyse et al., 2003; Hausse et al., 2002 ; Mariotti et al., 2003 ; Rustin et al., 1999 ). Des résultats similaires avec une amélioration de la fonction cardiaque ont été observés dans un modèle souris traité avec de l'idebenone (Seznec et al., 2004).

## **a.2. L'ataxie avec déficit en vitamine E (AVED)**

L'ataxie avec déficit en vitamine E (AVED ; MIM 277460) décrite en 1981 par Burck et al. est caractérisée par un phénotype très proche de celui de l'ataxie de Friedreich. L'âge de début est variable, mais intervient le plus souvent avant 20 ans (Cavalier et al., 1998). Les patients

développent une ataxie cérébelleuse progressive avec aréflexie, parfois associée à un tremblement de la tête (Benomar et al., 2002; Cavalier et al., 1998 ). Des troubles de la sensibilité profonde sont habituellement présents ainsi qu'un signe de Babinski. Une dystonie, pouvant évoluer vers une dystonie généralisée malgré le traitement (Roubertie et al., 2003), des fasciculations de la langue (Burck et al., 1981 ; Martinello et al., 1998) et des anomalies squelettiques telles qu'une scoliose et des pieds creux sont parfois retrouvés. Mais, contrairement à la maladie de Friedreich, les patients ne développent pas de cardiomyopathie, ni de diabète (Ben Hamida et al., 1993a ; Ben Hamida et al., 1993b ; Cavalier et al., 1998).

Le diagnostic d'AVED est confirmé par le dosage sérique de la vitamine E (ou  $\alpha$ -tocophérol) qui met en évidence des taux nettement inférieurs à la normale (le plus souvent inférieure à 1 mg/l pour une norme entre 6 et 15 mg/l) en l'absence de malabsorption des graisses. Les parents des sujets atteints et les porteurs hétérozygotes de la mutation présentent souvent des taux de vitamine E à la limite inférieure de la normale (Ben Hamida et al., 1993b; Harding et al., 1985 ). L'étude des conduction nerveuses peut montrer une neuropathie périphérique sensitive axonale ou démyélinisante, et l'IRM met en évidence une atrophie cérébelleuse, et chez certains patients des anomalies de la substance blanche périventriculaire.

Le diagnostic précoce d'AVED est primordial car un traitement substitutif en vitamine E permet de limiter la progression voire de réduire les signes neurologiques de certains patients, notamment les caractéristiques cliniques et électrophysiologiques de la neuropathie (Gabsi et al., 2001 ; Martinello et al., 1998). En l'absence de traitement, les patients perdent la capacité de marcher après environ 10 ans d'évolution de la maladie et peuvent développer une rétinite pigmentaire (Benomar et al., 2002; Shimohata et al., 1998 ; Yokota et al., 1997 ).

L'AVED est fréquente en Afrique du nord et le gène responsable de la pathologie a initialement été localisé en 8q13 dans des familles d'origine tunisienne (Ben Hamida et al., 1993a). Une mutation fondatrice (744delA) de l'exon 5 du gène *TTPA* est habituellement retrouvée chez les patients originaires d'Afrique du Nord, cependant des mutations tronquantes ou faux-sens ont été identifiées sur l'ensemble du gène dans diverses populations (Cavalier et al., 1998; Gotoda et al., 1995 ; Hentati et al., 1996 ; Ouahchi et al., 1995 ).

Le gène *TTPA* code pour la protéine  $\alpha$ TTP ( $\alpha$ -tocopherol transfer protein) nécessaire au transfert hépatique de la vitamine E dans les VLDL. Ainsi les patients affectés par l'AVED

absorbent correctement la vitamine E mais le taux sanguin est bas en raison de son incorporation insuffisante dans les VLDL sécrétées par le foie (Traber et al., 1990). La vitamine E est une molécule antioxydante essentielle pour la protection des membranes biologiques contre la peroxydation des lipides et un stress oxydant chronique serait impliqué dans le processus physiopathologique de l'AVED (Taroni and DiDonato, 2004; Yokota et al., 2001). L'étude de souris knockout pour le gene TTPA montre que l'ataxie et la dégénérescence rétinienne sont associées à une augmentation significative de la peroxydation des lipides extraits du cerveau (Yokota et al., 2001).

### **a.3. Abêtalipoprotéinémie (ABL)**

L'Abêtalipoprotéinémie (ABL ; MIM 200100) a été initialement décrite en 1950 par Bassen et Kornzweig dans une famille juive consanguine (Bassen and Kornzweig, 1950). C'est une pathologie rare caractérisée par un défaut d'absorption des graisses pouvant être présent dès la période néonatale et responsable de manifestations gastro-intestinales associant vomissements, diarrhées et prise de poids insuffisante. Ce syndrome de malabsorption est responsable d'un déficit en vitamines liposolubles A, E et K. Les premiers signes neurologiques apparaissent dans l'enfance avec une ataxie cérébelleuse et cordonale postérieure associée à une neuropathie périphérique sensitive. Une démyélinisation des colonnes postérieures et des faisceaux spino-cérébelleux est observée avec une dégénérescence des fibres sensibles de gros diamètre et des neurones des ganglions rachidiens postérieurs (Sobrevilla et al., 1964). Une caractéristique importante de l'ABL est la présence d'une rétinopathie pigmentaire. Il existe une surcharge lipidique intracellulaire au niveau du foie et de l'intestin, et dans de rares cas la stéatose hépatique peut évoluer vers une cirrhose (Braegger et al., 1998).

Le bilan lipidique permet d'orienter vers ce diagnostic devant des taux effondrés du cholestérol et des triglycérides, une absence de toute lipoprotéine riche en apo B (chylomicrons, LDL, VLDL) dans le plasma, et des taux bas des vitamines lipo-solubles A, E et K. Le diagnostic est confirmé par la présence d'acanthocytes (Bassen and Kornzweig, 1950) correspondant à une déformation des érythrocytes du fait de la composition pathologique de leur membrane

consécutives à la teneur basse en lipoprotéines dans le sang et à l'oxydation de ces membranes par l'absence de vitamine E.

Des mutations ont été identifiées dans le gène *MTTP* (Narcisi et al., 1995; Sharp et al., 1993) localisé sur le chromosome 4q23 et codant pour la grande sous-unité de la protéine microsomale de transfert des triglycérides (MTP : Microsomal triglyceride Transfer Protein). La protéine MTP effectue le transfert des esters de triglycérides et de cholestérol entre les vésicules lipidiques. Le déficit en MTP est responsable de l'absence de sécrétion intestinale et hépatique des lipoprotéines contenant l'apo B dans le plasma (Berriot-Varoqueaux et al., 2000; Sharp et al., 1993). L'absence de lipoprotéines entraîne un défaut d'absorption des vitamines liposolubles (A, E, K) responsable de la gravité de l'affection par ses complications neurologiques, et un traitement substitutif vitaminique massif à cause de la malabsorption est indiqué chez ces patients (Azizi et al., 1978 ; Muller and Lloyd, 1982; Muller et al., 1977). Un régime alimentaire avec une réduction de l'apport en graisses est également instauré afin de prévenir la survenue d'une stéatorrhée. En raison de la malabsorption, la vitaminothérapie nécessite l'administration de fortes doses de vitamine E, et des dosages réguliers de la vitamine E sont nécessaires pour évaluer l'efficacité du traitement.

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

#### **a.4. Ataxie spinocérébelleuse avec anémie sidéroblastique liée à l'X (XLSA/A)**

L'ataxie spinocérébelleuse avec anémie sidéroblastique liée à l'X (XLSA/A ; MIM 301310) est caractérisée par la présence chez les hommes atteints d'une ataxie cérébelleuse dès l'âge de 1 an, associée à un retard psychomoteur et parfois à un syndrome pyramidal (Bekri et al., 2000 ; Hellier et al., 2001 ; Maguire et al., 2001; Pagon et al., 1985 ; Raskind et al., 1991). Les patients présentent par ailleurs une anémie hypochrome microcytaire modérée, asymptomatique, ainsi que des sidéroblastes mis en évidence à l'examen de la moelle osseuse (Pagon et al., 1985). Les anomalies hématologiques sont également retrouvées chez certaines femmes porteuses

hétérozygotes d'une mutation mais ne sont pas associées aux signes neurologiques (Maguire et al., 2001; Pagon et al., 1985 ; Raskind et al., 1991 ).

L'XLSA/A est due à des mutations du gène *ABCB7* localisé en Xq13 (Allikmets et al., 1999; Raskind et al., 1991 ). *ABCB7* code pour un transporteur de type ATP-binding cassette (ABC transporter) localisé dans la membrane interne de la mitochondrie (Leighton and Schatz, 1995) et impliqué dans l'export mitochondrial des centres Fe-S (Kispal et al., 1999). Un déficit d'*ATMI*, l'homologue d'*ABCB7* chez la levure, est responsable d'une accumulation intra-mitochondriale de fer, un stress oxydant et une instabilité de l'ADN mitochondrial (Kispal et al., 1997; Leighton and Schatz, 1995 ), soit un phénotype similaire à celui des levures mutantes pour *YFHI*, l'homologue du gène de la frataxine responsable de l'ataxie de Friedreich (Babcock et al., 1997 ; Campuzano et al., 1996 ; Wilson and Roof, 1997). Il semble donc que ces deux types d'ataxie aient un mécanisme physiopathologique, au moins partiellement, commun.

#### **a.5. L'ataxie spino-cérébelleuse de début infantile (IOSCA)**

L'ataxie spino-cérébelleuse de début infantile (IOSCA, MIM 271245) a été décrite, à ce jour, uniquement dans la population Finlandaise (Koskinen et al., 1994 ; Lonnqvist et al., 1998; Nikali et al., 1997 ). Elle est caractérisée par un âge de début précoce (entre 9 et 18 mois) comprenant une ataxie spino-cérébelleuse, une hypotonie, une neuropathie axonale sensitive avec hyporéflexie, et une athétose. L'évolution est caractérisée par l'apparition d'une atrophie optique, une ophtalmoplégie, une surdité, un hypogonadisme hypergonadotrophique chez les filles, une épilepsie et une d ficiency intellectuelle chez certains patients. La plupart des patients ont perdu la marche à l'âge de 20 ans. L'épilepsie est présente chez 50% des patients, et se présente souvent sous la forme d' tats de mal épileptique pouvant mener au décès (Lonnqvist et al., 1998).

L'IRM montre une atrophie du cervelet, du tronc cérébral, et de la moelle épinière (Nikali et al., 1997). L'examen neuropathologique révèle une neuropathie sensitive axonale avec une perte des fibres larges myélinisées, une atrophie de la moelle épinière et des ganglions rachidiens, similaire à celle observée dans la maladie de Friedreich, ainsi que du tronc cérébral et du cervelet.

Les nerfs et le chiasma optiques sont sévèrement atrophiés et les nerfs craniens, en particulier le VIII, semblent amincis (Lonnqvist et al., 1998).

Le gène a été localisé par analyse de liaison dans des familles Finlandaises en 10q24 (Nikali et al., 1997). Une mutation a été identifiée dans le gène *C10orf2* (ou *PEO1*) qui code pour *twinkle* ou un variant d'épissage plus rare appelé *twinky* (Nikali et al., 2005). Tous les patients, excepté un individu hétérozygote composite, sont porteurs à l'état homozygote d'une même mutation (Y508C) liée à un effet fondateur.

*Twinkle* est une hélicase mitochondriale nécessaire au déroulement de l'ADN mitochondrial (ADNmt) lors de sa réplication (Korhonen et al., 2003; Spelbrink et al., 2001). *Twinkle* a un rôle primordial dans la régulation du nombre de copies d'ADN mitochondrial. Son inhibition entraîne une déplétion de l'ADNmt alors que sa surexpression a pour conséquence une accumulation d'ADNmt (Tyynismaa et al., 2004). Le spectre clinique des patients présentant une mutation du gène codant pour *twinkle* est très variable. En effet, des mutations de *twinkle* ont été initialement décrites comme responsables d'une ophtalmoplégie externe progressive de transmission autosomique dominante (adPEO) associée à des délétions multiples de l'ADNmt (Spelbrink et al., 2001). Au contraire, la mutation récessive observée chez les patients IOSCA n'entraîne pas d'anomalie de l'ADN mitochondrial ni de déficit de la chaîne respiratoire. L'adPEO peut être isolée ou associée à une myopathie, une cardiomyopathie, une neuropathie, un diabète, une surdité ou une ostéoporose (Kiechl et al., 2004), et peut être due à des mutations de *twinkle* mais également des gènes *ANTI* (Kaukonen et al., 2000) et *POLG* (Van Goethem et al., 2001). La présentation peut également être celle d'un SANDO (ataxie sensitive, neuropathie, dysarthrie et ophtalmoplégie) (Hudson et al., 2005).

#### **a.6. Les mutations de l'ADN polymérase mitochondriale POLG (SANDO et MIRAS)**

Les mutations de *POLG*, codant pour la sous unité de l'ADN polymérase  $\gamma$  mitochondriale, sont responsables d'un large spectre de manifestations cliniques avec une sévérité et un âge de début très variables (Horvath et al., 2006). En effet, les mutations ont été

initialement décrites dans l'ophtalmoplégie externe progressive autosomique dominante (adPEO ; MIM 157640) (Van Goethem et al., 2001), puis chez des patients avec un syndrome parkinsonien, une ménopause précoce, et des troubles psychiatriques (Luoma et al., 2004 ; Pagnamenta et al., 2006). Des mutations récessives de *POLG* ont été associées à l'ophtalmoplégie externe progressive autosomique récessive (arPEO ; MIM 258450) (Van Goethem et al., 2001), au syndrome d'Alpers (MIM 203700) caractérisé par un déficit hépatocérébral sévère dans l'enfance avec déplétion de l'ADNmt (Ferrari et al., 2005; Naviaux and Nguyen, 2004 ; Nguyen et al., 2005 ), mais également chez des patients avec un syndrome parkinsonien (Davidzon et al., 2006). Enfin, deux syndromes avec ataxie de transmission récessive ont été associés à des mutations de *POLG* : la neuropathie sensitive ataxiante avec dysarthrie et ophtalmoparésie (SANDO, MIM 607459) (Fadic et al., 1997 ; Van Goethem et al., 2003), et le syndrome avec ataxie mitochondriale récessive (également appelé MIRAS) (Hakonen et al., 2005; Winterthun et al., 2005 ). La distinction entre ces deux entités est essentiellement nosologique puisqu'elles peuvent être dues aux mêmes mutations de *POLG* dont la mutation fondatrice W748S. Tzoulis et al. (Tzoulis et al., 2006) ont décrit une grande hétérogénéité clinique chez des patients ataxiques porteurs des mutations A467T ou W748S dans *POLG*. Pour Hakonen et al. (2005), la mutation W748S est la cause la plus fréquente d'ataxie héréditaire en Finlande, et elle est associée à un large spectre phénotypique. L'ataxie peut être cérébelleuse ou secondaire à une neuropathie sensitive. Elle peut être associée à une myopathie, une neuropathie périphérique, une ophtalmoplégie, des migraines, une épilepsie qui peut être pharmaco-résistante, des myoclonies, une atteinte cognitive et des anomalies de la substance blanche cérébelleuse. Plusieurs patients ont présenté une insuffisance hépatique pouvant mener au décès. La biopsie musculaire peut retrouver des fibres rouges déchiquetées (Ragged Red Fibers). L'étude de l'ADNmt extrait des biopsies musculaires retrouve des délétions multiples de l'ADN.

Le gène *POLG* est localisé en 15q26 et code pour la polymérase  $\gamma$  qui est la seule ADN polymérase localisée dans la mitochondrie. Cette protéine fait partie d'un complexe multienzymatique localisé sur la membrane interne de la mitochondrie et qui a un rôle fondamental dans la réplication et la réparation de l'ADNmt (Kaguni, 2004). Des mutations de *POLG* ont été décrites sur l'ensemble du gène et sont responsables d'un défaut de la maintenance du génome mitochondrial avec une accumulation secondaire de délétions, de mutations



ponctuelles et de déplétion de l'ADNmt (Hudson and Chinnery, 2006) et un déficit de la chaîne respiratoire mitochondriale.

## **b. Protéines nucléaires et réparation de l'ADN**

Plusieurs protéines nucléaires ayant un rôle avéré ou prédit dans les processus de réparation de l'ADN ont été associées à la survenue d'ataxies autosomiques récessives parmi lesquelles l'ataxie télangiectasie (AT), l'ataxie télangiectasie-like (ATLD), l'ataxie avec apraxie oculo-motrice de type 1 (AOA1) et de type 2 (AOA2) et l'ataxie spinocérébelleuse avec neuropathie axonale (SCAN1). Elles sont toutes caractérisées par une ataxie cérébelleuse associée à une neuropathie périphérique, et il existe de nombreux chevauchements de leurs spectres cliniques respectifs. En particulier, l'apraxie oculo-motrice est fréquemment retrouvée dans ces formes d'ataxie et les cellules présentent une sensibilité accrue aux agents génotoxiques. Malgré les défauts de réparation de l'ADN et la sensibilité aux agents génotoxiques observés dans ce groupe d'ataxies, seule l'AT est caractérisée par la survenue de manifestations extra-neurologiques tels qu'un déficit immunitaire et une prédisposition aux cancers. La sensibilité aux agents génotoxiques est une caractéristique commune à un ensemble de pathologies connues sous le nom de « syndromes avec instabilité génomique ». Ces pathologies résultent d'une réponse anormale aux lésions de l'ADN et incluent notamment, le xéroderma pigmentosum, le syndrome de Cockayne, la trichothiodystrophie, le syndrome de Werner ou le syndrome de « Nijmegen breakage » (Shiloh, 2003). L'ataxie peut faire partie du spectre clinique de ces syndromes mais elle n'est habituellement pas au premier plan. A ce jour, il n'existe pas de données claires permettant d'expliquer pourquoi l'atteinte est spécifique du système nerveux et n'entraîne pas de prédisposition aux cancers dans l'ATLD, AOA1, AOA2 et SCAN1.

### **b.1. L'ataxie télangiectasie (AT)**

L'ataxie télangiectasie (AT, MIM 208900) est la seconde cause d'ataxie dégénérative chez l'enfant après l'ataxie de Friedreich. Elle est caractérisée par une ataxie cérébelleuse, des

télangiectasies cutanéomuqueuses, une apraxie oculomotrice, un déficit immunitaire, et une prédisposition aux cancers. Les patients développent une ataxie sévère le plus souvent avant l'âge de 3 ans, alors que les télangiectasies peuvent apparaître plus tardivement et leur absence ne doit donc pas amener à l'exclusion du diagnostic. De rares formes débutant plus tard, chez l'adulte jeune, ont été décrites (Hiel et al., 1994). Il peut s'associer une neuropathie axonale sensitivo-motrice, une faiblesse musculaire avec amyotrophie, un signe de Babinski, un tremblement d'intention, des myoclonies, des mouvements choréiques et athétosiques, une dystonie, un syndrome parkinsonien et dans de rares cas un diabète avec insulino-résistance (Fogel and Perlman, 2007). Une hypersensibilité aux radiations ionisantes et un vieillissement prématuré avec une kératose des zones exposées peuvent être observés. L'intelligence des patients AT est généralement normale. Le risque de développer un cancer est d'environ 38 %, avec principalement des hémopathies (85%), mais aussi dans certains cas des tumeurs solides (Di Donato et al., 2001). La perte de la marche survient souvent avant l'âge de 10 ans (Woods and Taylor, 1992), et le pronostic vital est sévère puisque la plupart des décès surviennent avant l'âge de 20 ans en raison de complications infectieuses (Tsukahara et al., 1986), ou néoplasiques (Swift et al., 1993).

Sur le plan biologique, l' $\alpha$ -foetoprotéine sérique est augmentée chez 80% des patients, et l'immunité cellulaire et humorale est réduite (CD4, CD8 et les immunoglobulines IgA, IgE, et IgG). Il convient de doser les sous-classes d'Ig car l'augmentation compensatrice d'une sous-classe peut dissimuler un déficit d'un autre type d'immunoglobulines.

L'IRM met en évidence une atrophie cérébelleuse à prédominance vermiennienne (Tavani et al., 2003), d'évolution progressive et qui peut être absente au début de la maladie.

Les cellules en culture des patients présentent une sensibilité accrue aux radiations ionisantes et des cassures chromosomiques sont retrouvées au caryotype (Chun and Gatti, 2004; Gatti et al., 1991 ; Meyn, 1999 ; Woods and Taylor, 1992 ). Comme mentionné précédemment, ces caractéristiques sont communes aux « syndromes avec instabilité génomique » résultant d'une réponse anormale aux lésions de l'ADN.

L'AT résulte de mutations dans le gène *ATM* (Savitsky et al., 1995), localisé en 11q22 et constitué de 62 exons codants. Des mutations ont été décrites sur l'ensemble du gène (Campbell et al., 2003), et l'analyse moléculaire est fastidieuse en raison de sa taille. Il s'agit le plus souvent

de mutations tronquantes responsables d'une absence complète d'expression de la protéine ATM et du phénotype classique de la maladie. Dans 10 à 15 % des cas, un autre type de mutation est détecté, à l'origine d'un tableau moins sévère, avec notamment un début tardif, une évolution plus lente et l'absence de certains signes cardinaux (Gilad et al., 1998 ; Saviozzi et al., 2002).

La protéine ATM (AT mutated protein) est une protéine kinase essentiellement localisée dans le noyau. La partie C-terminale est homologue à une famille de protéines contenant un domaine phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) qui semble être impliqué dans les processus de transduction des signaux (Savitsky et al., 1995 ; Shiloh, 2003). Les fonctions d'ATM sont vastes et incluent un rôle suppresseur de tumeur, avec une implication dans le contrôle du cycle cellulaire, la réponse cellulaire aux altérations de l'ADN, la régulation de réponses physiologiques via p53, un rôle lors des recombinaisons méiotiques, et un rôle dans la maturation des cellules immunitaires (Reina-San-Martin et al., 2004). Pour la compréhension physiopathologique des ataxies, il est important de noter qu'ATM intervient à la phase initiale de la voie de réparation des cassures double-brin de l'ADN. Cette reconnaissance entraîne son activation par autophosphorylation (Bakkenist and Kastan, 2003) et la phosphorylation de plusieurs substrats impliqués dans les processus d'arrêt du cycle cellulaire et de réparation de l'ADN, dont la protéine p53, et la protéine NBS1. En effet, ATM interagit avec, est activée par, et régule le complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1) qui a des activités hélicase et exonucléase essentielles pour la reconnaissance et la réparation des cassures double-brins (Uziel et al., 2003). Des mutations hypomorphes dans deux protéines constituant ce complexe, MRE11 et NBS1 ont également été identifiées chez des patients avec une symptomatologie neurologique (Carney et al., 1998 ; Stewart et al., 1999; Varon et al., 1998 ). En effet, des mutations dans MRE11 sont responsables du **syndrome « Ataxia telangiectasia-like disorder »** (ATLD ; MIM 604391) décrit plus loin, alors que des mutations dans NBS1 sont responsables du **syndrome « Nijmegen Breakage »** (NBS ; MIM 251260) caractérisé par une microcéphalie, un retard de croissance, un retard mental, une dysmorphie faciale, un déficit immunitaire, une prédisposition au cancer et une sensibilité aux radiations ionisantes, mais sans ataxie, ni télangiectasie ou élévation de l' $\alpha$ -foetoprotéine (Carney et al., 1998; Varon et al., 1998 ; Weemaes et al., 1981 ). La mutation la plus fréquente est une délétion de 5 pb (657del5) retrouvée chez les patients d'origine slave du fait d'un effet fondateur. Cette mutation conduit à la production d'une protéine partiellement

fonctionnelle, car contenant les domaines C-terminaux par ré-initiation de la traduction en aval de la mutation (Maser et al., 2001).

Malgré une littérature prolifique sur les fonctions d'ATM, son rôle dans le processus neurodégénératif n'est pas clair à ce jour. En effet, les fibroblastes des patients AT et des souris knock-out pour ATM ont une sensibilité accrue aux radiations ionisantes, et l'irradiation du thymus de ces souris entraîne une apoptose massive. Au contraire, les cellules nerveuses en développement des souris  $ATM^{-/-}$  présentent une résistance à l'apoptose après exposition à des radiations ionisantes (Herzog et al., 1998). Ceci indique qu'ATM pourrait intervenir au cours du développement cérébral en éliminant les neurones ayant accumulé des lésions de l'ADN, ceci par une voie impliquant p53. La neurodégénérescence progressive observée chez les patients AT serait le résultat d'une accumulation de dommages génomiques au cours du développement (Herzog et al., 1998). Cette hypothèse est supportée par l'observation d'une accumulation progressive de lésions de l'ADN dans le cervelet de souris  $ATM^{-/-}$  (Stern et al., 2002). De plus certains résultats suggèrent qu'ATM agit comme un signal favorisant la survie des cellules post-mitotiques de Purkinje et des cellules dopaminergiques en agissant sur les radicaux superoxydes (Quick and Dugan, 2001). En effet, Quick et al. observent une élévation des ROS dans les neurones spécifiquement atteints dans l'AT et non dans les neurones du cortex de souris  $ATM^{-/-}$  indiquant une implication du stress oxydant dans le processus physio-pathologique (Quick and Dugan, 2001). De même, une élévation du stress oxydant et une diminution des taux de  $NAD^+$ , NADH et  $NADP^+$  ont été mis en évidence au niveau du cervelet des souris knock-out (Barlow et al., 1999 ; Stern et al., 2002).  $NAD^+$  est un substrat de PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) et sa déplétion pourrait être due à une activation excessive de PARP du fait de l'accumulation de lésions de l'ADN. Il a donc été proposé que la perte d'ATM soit responsable d'une accumulation de cassures de l'ADN et d'une activation chronique des systèmes de réparation entraînant une déplétion des ressources énergétiques cellulaires et des anomalies de l'homéostasie énergétique de la cellule (Stern et al., 2002).

## **b.2. L'ataxia télangiectasia-like disorder (ATLD)**

L'« ataxia télangiectasia-like disorder » (ATLD ; MIM 604391) est une ataxie autosomique récessive extrêmement rare puisque seuls 16 patients issus de 6 familles ont été décrits à ce jour (Delia et al., 2004 ; Fernet et al., 2005; Pitts et al., 2001 ; Stewart et al., 1999 ). Le phénotype est proche de celui des patients AT avec une ataxie progressive et une atrophie cérébelleuse à l'IRM, une apraxie oculomotrice très marquée, un nystagmus, des mouvements choréïques et dystoniques des mains (Delia et al., 2004 ; Fernet et al., 2005). L'évolution est cependant moins sévère, notamment car les atteintes extra-neurologiques caractéristiques de l'AT ne sont pas observées. En effet, il n'y a pas de télangiectasie, de déficit immunitaire, ni de risque accru de cancer. Comme dans le syndrome de « Nijmegen breakage », une microcéphalie peut être observée chez les patients ATLD, associée à une intelligence à la limite de la normale (Fernet et al., 2005).

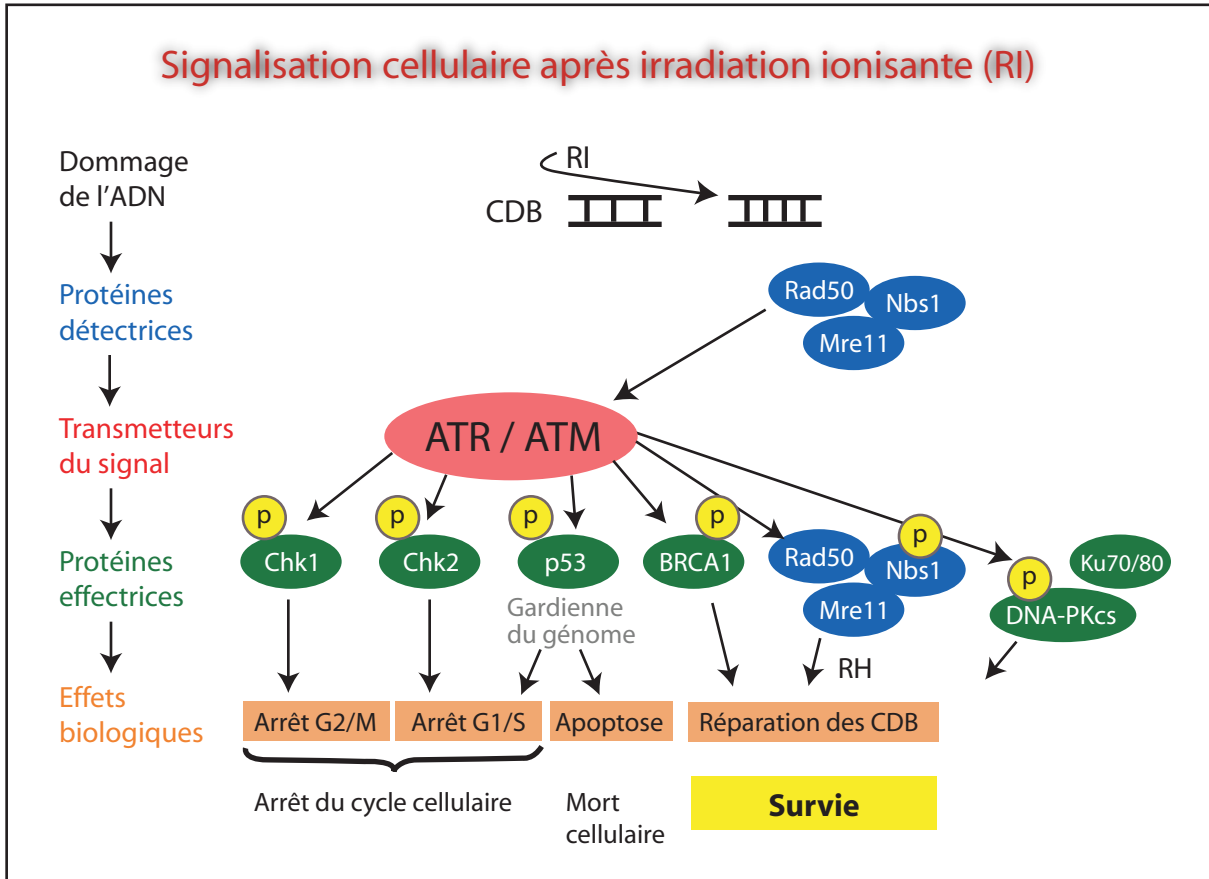
Sur le plan biologique, les patients ne présentent pas d'élévation de l' $\alpha$ -foetoprotéine, ni d'anomalie de l'immunité. Le caryotype peut être normal ou montrer, comme dans l'AT et NBS, des cassures chromosomiques impliquant surtout les chromosomes 7 et 14, et dont le nombre augmente significativement après exposition aux radiations ionisantes (Stewart et al., 1999).

Comme mentionné précédemment, le syndrome ATLD est dû à des mutations dans le gène *MRE11* localisé sur le chromosome 11q21 et contenant 19 exons codants (Stewart et al., 1999). Ces mutations entraînent soit une tronquation de la partie C-terminale de la protéine soit une modification d'un acide aminé. Il semble que toutes les mutations soient des mutations hypomorphes avec une activité résiduelle de la protéine, et cette hypothèse est soutenue par l'observation d'une létalité embryonnaire précoce chez la souris knock-out du gène *Mre11* (Xiao and Weaver, 1997). Ce gène code pour la protéine MRE11 de 708 acides aminés appartenant au complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1) essentiel dans les processus de réparation des cassures double-brins de l'ADN. MRE11 a une activité exonucléase et une activité endonucléase dépendante de l'ATP, qui permet d'ouvrir les structures « en épingle à cheveux » (Arthur et al., 2004; de Jager et al., 2002 ; Paull and Gellert, 1998 ; Uziel et al., 2003 ). Après une exposition aux radiations ionisantes, le complexe MRN est recruté au niveau des foyers de réparation indépendamment d'ATM. En effet, le complexe MRN se fixe sur l'ADN lésé, puis recrute ATM

qui va s'autophosphoryler puis va à son tour activer le complexe MRN en phosphorylant NBS1 (Lee and Paull, 2005) (Figure 8). Dans les cellules ATLD déficientes en MRE11, l'autophosphorylation d'ATM au résidu S318 est diminuée, de même que l'activité de la protéine ATM et que la phosphorylation des protéines cibles d'ATM (Delia et al., 2004). Le complexe MRN joue un rôle primordial dans la réparation par recombinaison homologue des cassures double-brins de l'ADN, mais également dans d'autres processus tels que le maintien des télomères, les recombinaisons homologues méiotiques ou l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire.

### **b.3. L'ataxie avec apraxie oculomotrice de type 1 (AOA1)**

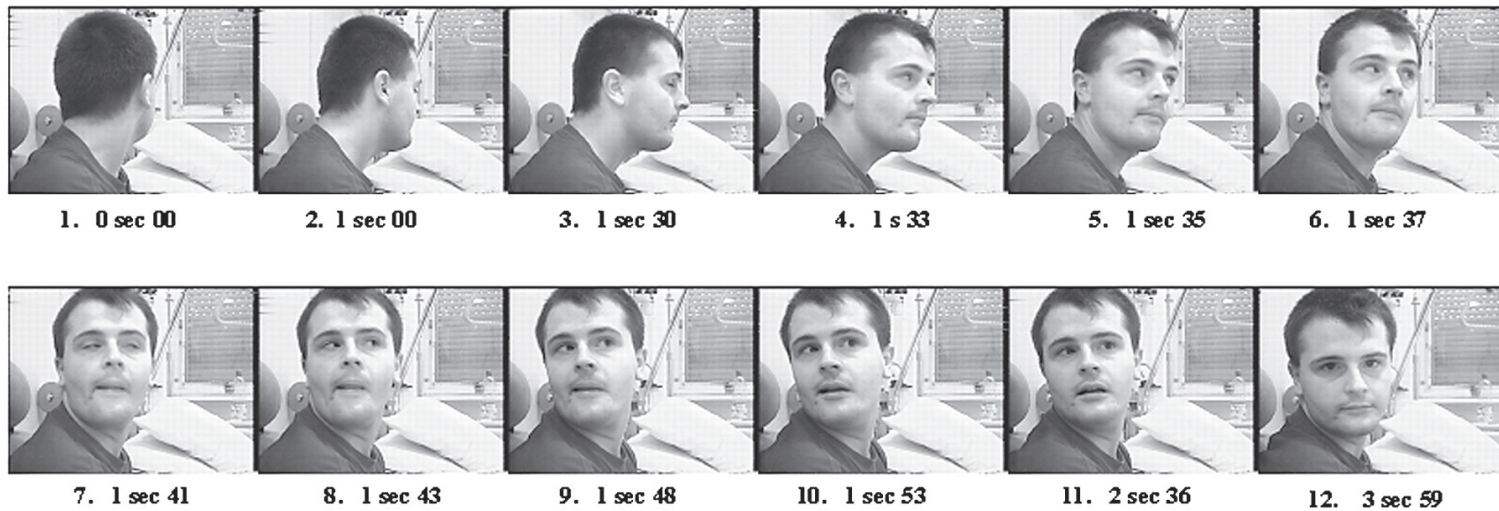
Les premiers patients présentant une ataxie avec apraxie oculo-motrice ont été décrits par Inoue et al. (1971) et étaient d'origine japonaise. Plusieurs descriptions ont suivi (Aicardi et al., 1988 ; Barbot et al., 2001) et l'identification du gène en cause a permis de mieux définir le spectre clinique de cette affection également appelée « Early-onset ataxia with oculomotor apraxia and hypoalbuminemia » (AOA1 ; EAOH ; MIM 208920). Cette affection est caractérisée par une ataxie cérébelleuse débutant généralement avant 7 ans, une apraxie oculo-motrice, une aréflexie puis une amyotrophie distale majeure et des déformations squelettiques, dus à une neuropathie axonale sensitivo-motrice sévère (Barbot et al., 2001 ; Fukuhara et al., 1995 ; Le Ber et al., 2003 ; Shimazaki et al., 2002 ). Un début plus tardif, éventuellement à l'âge adulte a été décrit chez certains patients (Criscuolo et al., 2005 ; Criscuolo et al., 2004b ; Date et al., 2001 ; Tranchant et al., 2003 ). Contrairement à ce que la nomenclature laisse entendre, l'apraxie oculo-motrice n'est pas un signe obligatoirement retrouvé chez les patients AOA1, ni chez les patients AOA2. Elle correspond à une dissociation entre les mouvements de la tête et des yeux. Lorsqu'il est demandé au patient de regarder une cible située latéralement, le patient tourne la tête et les yeux n'atteignent la cible que secondairement (Figure 9). Dans AOA1, l'apraxie oculo-motrice apparaît généralement après plusieurs années d'évolution et est présente dans environ 86% des cas (Le Ber et al., 2003). D'autres anomalies oculomotrices peuvent être mises en évidence : un nystagmus horizontal dans le regard latéral, une instabilité de la fixation ainsi qu'une hypométrie importante des saccades qui affecte les mouvements horizontaux et parfois verticaux des yeux.



**Figure 8: Réponse cellulaire à une irradiation ionisante**

Le complexe MRN reconnaît les cassures double-brin (CDB) et recrute ATM qui, à son tour, active le complexe MRN et d'autres protéines de la réparation de l'ADN et du contrôle du cycle cellulaire.

D'après Gribaa M (2006), Génétique Moléculaire de nouvelles formes d'ataxies progressives récessives, Strasbourg, Université Louis Pasteur.



**Figure 9: Apraxie oculo-motrice chez un patient atteint d'AOA1**

Dissociation des mouvements de la tête et des yeux lorsqu'il est demandé au patient de regarder une cible sur le coté et que les mouvements de la tête sont libres.

D'après Le ber et al. *Brain*, 2003.



La poursuite oculaire est généralement préservée, mais après plusieurs années d'évolution une ophtalmoplégie externe progressive peut apparaître. Environ 80% des patients développent une chorée qui peut être le symptôme initial et dont l'intensité diminue après quelques années, ou une dystonie (dans environ 40% des cas), suggérant une implication des ganglions de la base (Le Ber et al., 2003 ; Sekijima et al., 2003 ; Tranchant et al., 2003). Ces structures apparaissent intactes à l'examen anatomopathologique d'un patient AOA1 (Sekijima et al., 1998) qui révèle par contre une diminution sévère du nombre de cellules de Purkinje, une dégénérescence des colonnes postérieures de la moelle et des faisceaux spino-cérébelleux, et une perte marquée des fibres myélinisées des nerfs périphériques. Cependant Salvatore et al. (Salvatore et al., 2007) ont récemment étudié chez 4 patients AOA1 la densité du transporteur de la dopamine (DAT) en mesurant par SPECT (single photon emission tomography) la fixation au DAT d'un analogue de la cocaïne. Ils ont montré des anomalies de la fonction nigro-striatale même en l'absence de signes cliniques extra-pyramidaux.

L'espérance de vie peut être normale, mais l'évolution est caractérisée par un handicap moteur sévère confinant les patients en fauteuil roulant dès l'adolescence (Le Ber et al., 2003). Un retard mental modéré est noté chez 30 à 40 % des patients. Il existe une variabilité phénotypique inter-familiale mais également intra-familiale (Tranchant et al., 2003).

L'exploration biologique peut aider le diagnostic devant la mise en évidence d'une hypercholestérolémie et d'une hypoalbuminémie, mais ces signes n'apparaissent généralement qu'après 10 à 15 ans d'évolution, avec une corrélation entre leur intensité et à la durée d'évolution de la maladie. Contrairement à l'Ataxie Téléangiectasie, il n'y a ni élévation de l' $\alpha$ -foetoprotéine, ni déficit immunitaire, ni anomalie au caryotype dans l'AOA1.

L'IRM cérébrale met en évidence une atrophie du cervelet avec une prédominance sur le vermis, alors que le tronc cérébral et la moelle épinière apparaissent généralement intacts.

AOA1 est due à des mutations du gène *APTX* localisé en 9p13 (Date et al., 2001 ; Moreira et al., 2001a ; Moreira et al., 2001b). C'est la cause la plus fréquente d'ataxie récessive au Japon du fait de la survenue de deux mutations fondatrices (689insT et P206L). Des mutations ont été retrouvées chez des patients de diverses origines, et en particulier une mutation fondatrice (W279X) a été décrite dans la population caucasienne (Amouri et al., 2004 ; Criscuolo et al., 2004b; Date et al., 2001 ; Le Ber et al., 2003 ; Moreira et al., 2001b ; Shimazaki et al., 2002 ). Le

gène contient 7 exons codants, et est caractérisé par la présence d'un codon ATG alternatif dans l'exon 4 responsable de la production d'un isoforme court de la protéine. Le diagnostic moléculaire est facilité par le fait que les mutations identifiées à ce jour sont toutes localisées dans les trois derniers exons (5, 6, et 7), en dehors d'une délétion de l'ensemble du gène (Amouri et al., 2004).

L'expression du gène *APTX* est ubiquitaire. Il code pour une protéine nucléaire appelée aprataxine qui contient 3 domaines conservés :

- un domaine caractéristique de la famille des nucléotides hydrolases/transférases « histidine-triad protein » (HIT).
- un domaine C-terminal en doigt de zinc qui pourrait permettre la fixation à l'ADN et/ou l'ARN.
- un domaine « forkhead-associated (FHA) en situation N-terminale également appelé domaine PANT (PNKP-AOA1 N-terminal domain) car il est homologue de la région N-terminale de la polynucléotide 5'-kinase 3'-phosphatase (PNKP) (Moreira et al., 2001b; Caldecott, 2003) impliquée dans la réparation par excision de base (BER) des cassures simple-brins de l'ADN (Whitehouse et al., 2001).

Le rôle de l'aprataxine dans les processus de réparation des cassures simple-brin est également suggéré par l'identification de son interaction directe, tout comme PNKP, avec XRCC1, un autre composant du complexe SSBR (Single Strand Break Repair) (Clements et al., 2004 ; Gueven et al., 2004; Sano et al., 2004 ), via le domaine PANT. De plus, les cellules en culture de patients montrent une sensibilité accrue aux agents responsables de cassures simple-brins ( $H_2O_2$  ou methyl methane sulfonate) sans hypersensibilité aux radiations ionisantes, et sans que des anomalies de réparation des cassures simple ou double-brins de l'ADN ne soient mises en évidence (Clements et al., 2004 ; Gueven et al., 2004). Il faut également noter que l'aprataxine interagit avec XRCC4 (Clements et al., 2004) qui intervient dans les processus de réparation des cassures double-brin (Li 1995) et pourrait avoir un rôle dans la réparation des cassures simple et double-brins de l'ADN (Clements et al., 2004). L'implication directe de l'aprataxine dans la réparation de l'ADN a été récemment démontrée (Ahel et al., 2006). Elle catalyse l'élimination de groupes adenylylés liés de manière covalente aux extrémités 5' des cassures simple-brins suite

à une réaction de ligation abortive et qui empêchent la réparation des cassures. L'action de l'aprataxine permet ainsi d'obtenir des extrémités 5'-phosphate qui peuvent être efficacement liguées. La neurodégénérescence observée chez les patients AOA1 est donc certainement due à un défaut de réparation de l'ADN. Si l'activité biochimique de l'aprataxine a été décrite, il reste néanmoins de nombreuses questions sur les fonctions cellulaires de cette protéine, et les mécanismes physiopathologiques responsables de la neurodégénérescence. Comme dans l'AT, les cellules des patients AOA1 sont caractérisées par une augmentation de ROS et une accumulation de lésions oxydatives de l'ADN (Hirano et al., 2007). De plus, un déficit modéré en coenzyme Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub> ou ubiquinone) a été observé dans le muscle de patients AOA1 (Le Ber et al., 2007; Quinzii et al., 2005). Cette diminution ne s'accompagne pas d'un déficit des complexes de la chaîne respiratoire et le lien entre la biosynthèse mitochondriale du CoQ<sub>10</sub> et la protéine nucléaire aprataxine reste à élucider, de même que l'implication physiopathologique de ce déficit chez les patients AOA1.

#### **b.4. L'ataxie avec apraxie oculomotrice de type 2 (AOA2)**

L'ataxie avec apraxie oculomotrice de type 2 (AOA2 ; MIM 606002) est caractérisée par un début plus tardif que AOA1, en moyenne autour de 15 ans (Watanabe et al., 1998; Moreira et al., 2004; Le Ber et al., 2004; Duquette et al., 2005). Le premier symptôme est une ataxie cérébelleuse dans 80% des cas, et plus rarement une dystonie focale voire un strabisme (Le Ber et al., 2004). Une neuropathie axonale sensitivo-motrice est retrouvée chez quasiment tous les patients (Duquette et al., 2005; Le Ber et al., 2004). Alors que les patients développent une neuropathie sensitive sévère avec des anomalies de la proprioception, de la sensibilité vibratoire et une abolition des réflexes ostéo-tendineux, l'atteinte motrice est beaucoup plus modérée et l'amyotrophie distale plus tardive que dans l'AOA1. Des mouvements anormaux à type de dystonie, de chorée, ou de tremblement d'attitude notamment du chef, peuvent être observés (Duquette et al., 2005; Le Ber et al., 2004). L'apraxie oculo-motrice n'est mise en évidence que dans un quart des cas rapportés (Asaka et al., 2006; Criscuolo et al., 2006 ; Duquette et al., 2005 ; Le Ber et al., 2004 ; Watanabe et al., 1998), et ne constitue donc pas un élément d'orientation clinique aussi fort que pour l'AOA1 ou l'ataxie-télangiectasie. A l'examen, il existe une

désynchronisation des mouvements oculo-céphaliques, un nystagmus horizontal est fréquent et les saccades horizontales sont normales ou hypométriques. L'enregistrement oculographique met en évidence une poursuite oculaire saccadée chez tous les patients, et des saccades hypométriques avec des latences qui peuvent être normales ou allongées (Le Ber et al., 2004). L'évolution de cette maladie est moins sévère que celle de l'AOA1 avec en particulier l'absence de troubles cognitifs, mais l'AOA2 reste une pathologie très invalidante avec un confinement en fauteuil roulant en moyenne vers l'âge de 25 ans. Une insuffisance ovarienne précoce avec ostéoporose a également été décrite dans l'évolution d'une patiente âgée de 21 ans (Lynch et al., 2007).

Sur le plan biologique, il existe comme dans l'AT une élévation de l' $\alpha$ -foetoprotéine (1 à 5 fois la limite supérieure de la normale) retrouvée chez tous les patients si le dosage est réalisé à plusieurs reprises (Le Ber et al., 2004), et dont le taux est généralement corrélé à la durée d'évolution de la maladie. L'AOA2 se distingue cependant de l'AT par l'absence de déficit immunitaire et de prédisposition aux cancers. Une élévation modérée des CPK peut également être observée (Watanabe et al., 1998; Moreira et al., 2004).

L'IRM cérébrale révèle une atrophie cérébelleuse précoce et sévère prédominant sur le vermis.

En 2000, Bomont et Nemeth ont décrit indépendamment deux familles japonaises et une famille d'origine pakistanaise présentant une ataxie cérébelleuse avec apraxie oculomotrice et/ou élévation de l' $\alpha$ -foetoprotéine, et ont identifié un locus lié à la maladie en 9q34 (Bomont et al., 2000 ; Nemeth et al., 2000). Des mutations du gène *SETX* ont été identifiées chez les patients AOA2 et sont présentes sur l'ensemble du gène qui code pour une protéine de 2677 acides aminés (Moreira et al., 2004). De façon surprenante, certaines mutations faux-sens ont été associées à une forme autosomique dominante de sclérose latérale amyotrophique appelée ALS 4 (Asaka et al., 2006; Chen et al., 2004) et caractérisée par une évolution lente avec une durée de vie normale. Les parents des patients AOA2, porteurs hétérozygotes de mutations de *SETX*, ne présentent pas de sclérose latérale amyotrophique. Cela pourrait être expliqué par l'existence de deux types de mutations ayant soit un effet « perte de fonction » responsable d'une ataxie de transmission récessive, soit un effet « gain de fonction » responsable d'une ALS de transmission dominante.

Le gène *SETX* code pour la senataxine, une ADN/ARN hélicase dont l'homologue chez la levure SEN1p, est impliqué dans la transcription, la réparation de l'ADN, et la maturation des ARNs non-codants (Ursic et al., 2004). La senataxine est localisée de manière diffuse dans le cytoplasme, et co-localise avec la fibrillarine, un marqueur des nucléoles, dans le noyau. Cette localisation sub-cellulaire dépend du cycle cellulaire et l'extrémité N-terminale de la protéine semble essentielle pour la régulation de sa localisation (Chen et al., 2006). Dans les cellules différenciées ne se divisant pas, la senataxine est présente de manière diffuse dans le nucléoplasme (Chen et al., 2006). Le rôle de la senataxine dans la réparation de l'ADN n'a pas été clairement démontré à ce jour. Les cellules des patients AOA2 ne présentent pas de sensibilité accrue aux radiations ionisantes (Nahas et al., 2007 ; Nemeth et al., 2000 ; Suraweera et al., 2007). Cependant Suraweera et al. (2007) ont récemment montré une sensibilité accrue des cellules de patients AOA2 à différents agents génotoxiques responsables de cassures simple et double-brins de l'ADN (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, camptothecin et mitomycin C). De plus, les fibroblastes de patients AOA2 révèlent un taux constitutif élevé de 8-oxo-deoxyguanosine qui est un marqueur de lésions de l'ADN dues à des ROS (Suraweera et al., 2007).

#### **b.5. L'ataxie cérébelleuse avec neuropathie de type 1 (SCAN1)**

L'ataxie cérébelleuse avec neuropathie de type 1 (SCAN1, MIM 607250) est une affection extrêmement rare dont le spectre clinique présente un chevauchement avec celui d'AOA1. En effet, ce syndrome est caractérisé par la survenue d'une ataxie cérébelleuse et d'une neuropathie sensitivo-motrice sévère associées à une diminution modérée de l'albumine et une élévation du cholestérol. Il n'existe cependant pas d'apraxie oculo-motrice, et la maladie débute à l'adolescence.

A ce jour, cette pathologie n'a été décrite que dans une grande famille consanguine d'Arabie Saoudite dans laquelle 9 individus sont atteints (Takashima et al., 2002). L'étude de liaison de cette famille a permis d'identifier la mutation responsable (H493R) dans le gène *TDP1* localisé en 14q31 et codant pour la tyrosyl-DNA phospho-diesterase 1 (Takashima et al., 2002). TDP1 est une enzyme nécessaire à la réparation des cassures simple-brin de l'ADN induites lors

du déroulement de l'ADN par des liaisons covalentes de la topoisomérase 1 avec l'ADN, ou par le stress oxydant (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et les radiations ionisantes (El-Khamisy et al., 2007; El-Khamisy et al., 2005 ). Dans le cas des cassures provoquées par la topoisomérase 1, elles résultent d'une réaction abortive de cette dernière, bloquée sur un intermédiaire de la réaction qui est une liaison covalente de la tyrosine du site actif de la topoisomérase avec l'extrémité 5'OH de l'ADN dont elle devrait réduire les contraintes de torsion. Les cellules lymphoblastoïdes des patients SCAN1, de même que les neurones cérébelleux et les astrocytes primaires dérivés de souris knock out *tdp<sup>1</sup>* présentent un déficit de réparation des cassures simple brin (Katyal et al., 2007). Il a également été montré que TDP1 est recrutée au niveau du complexe SSBR (Single Strand Break Repair) par une interaction directe avec l'ADN ligase 3 $\alpha$  (El-Khamisy et al., 2005) qui est un partenaire d'XRCC1 et de PNKP dont l'implication dans l'AOA1 a été précédemment évoquée. Il est donc probable qu'AOA1 et SCAN1 aient un processus physiopathologique similaire.

### **c. Autres mécanismes moléculaires**

#### **c.1. L'ataxie spastique autosomique récessive du Charlevoix-Saguenay (ARSACS)**

L'ataxie spastique autosomique récessive du Charlevoix-Saguenay (ARSACS, MIM 270550) débute habituellement en même temps que l'acquisition de la marche, vers 1 à 2 ans. Elle est caractérisée par une dégénérescence précoce et marquée du faisceau pyramidal et du vermis cérébelleux supérieur (Bouchard et al., 1998). L'atteinte pyramidale domine le tableau clinique. Il s'agit avant tout d'une spasticité des membres inférieurs associée à un signe de babinski bilatéral. La spasticité a tendance à s'aggraver, mais de rares patients ont été décrits sans spasticité, laquelle pourrait avoir disparue au cours de l'évolution de la maladie (Shimazaki et al., 2007; Shimazaki et al., 2005 ). Les réflexes ostéo-tendineux sont habituellement vifs, éventuellement avec un clonus de la rotule, mais peuvent être abolis au niveau achilléen en particulier après plusieurs années d'évolution (Bouchard et al., 1998 ; El Euch-Fayache et al., 2003). Les signes cérébelleux sont modérés au début et s'aggravent progressivement, associant une ataxie à la marche, une dysarthrie et un nystagmus. Il existe par ailleurs une atteinte oculaire

typique, précoce et non progressive, mise en évidence au fond d'œil. Elle correspond à un aspect de striations rétiniennes dues à une prééminence des fibres myélinisées irradiant depuis le disque optique et enchâssant les vaisseaux rétiniens (Bouchard et al., 1978 ; Bouchard et al., 1998), sans déficit visuel. Cette anomalie caractéristique est présente chez tous les patients canadiens, mais peut être absente chez les patients d'autres origines géographiques (El Euch-Fayache et al., 2003 ; Hara et al., 2005 ; Mrissa et al., 2000 ; Richter et al., 2004 ; Takiyama, 2006; Yamamoto et al., 2005 ). Une altération de la poursuite oculaire saccadée peut également être mise en évidence et un cas d'ophtalmoplégie a été décrit (Hara et al., 2005).

Vers l'âge de 20 ans, une neuropathie sensitivo-motrice à prédominance axonale apparaît, et une amyotrophie distale de sévérité variable se développe. L'évolution est caractérisée par une perte de la marche, en moyenne vers 40 ans. Il n'y a habituellement pas de retard mental, mais une atteinte cognitive a récemment été rapportée chez plusieurs patients (Criscuolo et al., 2004a ; Grieco et al., 2004 ; Ogawa et al., 2004 ; Takiyama, 2006; Yamamoto et al., 2005 ).

L'IRM cérébrale met en évidence une atrophie précoce du vermis supérieur et une atrophie progressive des hémisphères cérébelleux et de la moelle épinière (Bouchard et al., 1998), ainsi que des lésions linéaires hypo-intenses en T2 dans le pont (Martin et al., 2007). Les études électrophysiologiques retrouvent des signes de neuropathie sensitivo-motrice axonale et démyélinisante, associés à un ralentissement des conceptions centrales motrices, sensitives et auditives (Garcia et al., 2007). Des anomalies à l'électroencéphalogramme sont retrouvées chez 60% des patients, le plus souvent à type de bouffées d'ondes lentes généralisées asymptomatiques, alors que de rares cas présentent une réelle activité épileptique.

L'ARSACS est due à des mutations dans le gène *SACS* localisé en 13q12 (Engert et al., 2000; Richter et al., 1999 ). C'est l'ataxie héréditaire la plus fréquente au Québec, notamment dans la province de Charlevoix-Saguenay en raison d'une mutation fondatrice (6594delT), cependant des mutations ont été secondairement identifiées chez des patients de diverses origines géographiques (Criscuolo et al., 2004a ; El Euch-Fayache et al., 2003 ; Engert et al., 2000 ; Grieco et al., 2004 ; Hara et al., 2005 ; Ogawa et al., 2004 ; Ouyang et al., 2008; Ouyang et al., 2006 ; Richter et al., 2004 ; Shimazaki et al., 2005 ). Le gène *SACS* contient 5 exons codants dont un très grand exon de 12.8 Kb dans lequel la majorité des mutations sont retrouvées (Engert et al., 2000 ; Ouyang et al., 2006). Il est fortement exprimé dans le cerveau, mais également dans le

muscle et le pancréas (Engert et al., 2000). Il code pour la protéine appelée sacsine, dont la fonction n'est pas connue mais qui présente un domaine DnaJ et des homologies avec les protéines heat-shock 90 (Hsp90) et pourrait donc avoir un rôle de chaperonne et être impliquée dans les processus de repliements protéiques (Buchner, 1999; Engert et al., 2000 ; Fink, 1999 ).

## **c.2. Ataxie cérébelleuse autosomique récessive de type 1 (ARCA1)**

L'ataxie cérébelleuse autosomique récessive de type 1 (ARCA1, également appelée SCAR8 ou ataxie récessive de la Beauce, MIM 610743) a été récemment décrite chez 53 patients d'origine canadienne et plus particulièrement originaires des régions de la Beauce et du Bas-St-Laurent au Québec (Gros-Louis et al., 2007). Cette affection est caractérisée par une ataxie cérébelleuse de début tardif (en moyenne à l'âge de 30 ans) et d'évolution lente, parfois accompagnée de réflexes ostéo-tendineux vifs, et d'anomalies mineures de la poursuite oculaire (Dupre et al., 2007). Aucune autre anomalie phénotypique n'a été mise en évidence et ARCA1 serait la première ataxie cérébelleuse pure de transmission autosomique récessive dont le gène ait été identifié (Gros-Louis et al., 2007). L'IRM cérébrale retrouve dans tous les cas une atrophie cérébelleuse diffuse isolée.

Des mutations du gène *SYNE1* localisé en 6q25 ont été identifiées chez les patients ARCA1 (Gros-Louis et al., 2007). Alors que tous les patients provenaient d'une population homogène géographiquement, 5 mutations tronquantes ont été mises en évidence et les auteurs suggèrent que l'implication de ce gène dans les ataxies cérébelleuses de l'adulte pourrait être relativement importante. L'étude moléculaire d'un plus grand nombre de patients sera nécessaire pour évaluer cette fréquence, cependant celle-ci semble difficile à réaliser en routine car le gène contient 145 exons et code pour une protéine cytosolique de 8797 acides aminés. *SYNE1* est exprimé dans de nombreux tissus dont le système nerveux central (Apel 2000), et particulièrement dans les cellules de Purkinje et les neurones des olives bulbaires du tronc cérébral (Gros-Louis et al., 2007). Il code pour la protéine syne-1, également appelée nesprine 1, qui est caractérisée par la présence d'un domaine de fixation à l'actine, de répétitions de type



spectrine, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine klaricht (KASH). Des études précédentes avaient montré l'implication de la nesprine 1 dans la fixation des noyaux des fibres musculaires en regard des jonctions neuromusculaires (Apel et al., 2000 ; Grady et al., 2005 ; Zhang et al., 2007b). Ces noyaux sont spécialisés dans l'expression de grandes quantités de transcrits de protéines composant la synapse telles que les sous-unités du récepteur de l'acétylcholine (Sanes and Lichtman, 2001). Or, si les jonctions neuromusculaires sont normales chez les patients ARCA1, Gros-Louis et al. (2007) retrouvent une diminution du nombre de noyaux localisés juste sous la membrane post-synaptique comparé à un muscle contrôle. Il faut cependant noter qu'aucune anomalie musculaire clinique ou électrophysiologique n'est présente chez les patients, suggérant que des anomalies du regroupement nucléaire post-synaptique n'ont pas une fonction primordiale dans la maturation ou le maintien des jonctions neuromusculaires. Au contraire, la nesprine 1 semble être cruciale pour le maintien des fonctions cérébelleuses, et les auteurs font l'hypothèse qu'une perte de fonction de la nesprine 1 soit responsable d'une dérégulation de l'architecture cérébelleuse entraînant le phénotype ARCA1. Il est intéressant de souligner que Zhang et al. ont récemment identifié trois mutations faux sens dans *SYNE1* qui pourraient être associées à une dystrophie musculaire de type Emery-Dreifuss (Zhang et al., 2007a).

### **c.3. Syndrome ataxie/tremblement associés à l'X Fragile (FXTAS)**

Un tableau neurologique caractérisé par une ataxie cérébelleuse et/ou un tremblement d'intention débutant après l'âge de 50 ans a récemment été décrit chez des patients porteurs d'une prémutation pour le syndrome de l'X fragile (Berry-Kravis et al., 2003 ; Hagerman et al., 2001 ; Jacquemont et al., 2003; Leehey et al., 2003 ). Le syndrome, appelé FXTAS (MIM 300623), peut associer des troubles cognitifs et psychiatriques de degrés variables pouvant aller jusqu'à une démence, un syndrome de Parkinson, une neuropathie périphérique, une faiblesse musculaire proximale ou des troubles dysautonomiques (Jacquemont et al., 2003). Les patients sont habituellement des hommes d'intelligence normale, avec ou sans histoire familiale de syndrome d'X-fragile. Les femmes portant une prémutation X-fragile présentent un risque de ménopause

précoce (Allingham-Hawkins et al., 1999; Murray et al., 1998 ), cependant quelques rares femmes ont également été décrites avec un syndrome FXTAS sans démence (Biancalana et al., 2005; Hagerman et al., 2004 ).

L'IRM met en évidence une atrophie cérébrale généralisée et des lésions hyper-intenses en T2 au niveau des pédoncules cérébelleux moyens et de la substance blanche cérébelleuse adjacente (Jacquemont et al., 2003 ; Loesch et al., 2005).

L'étude anatomopathologique à l'autopsie de patients FXTAS retrouve une dégénérescence cérébelleuse avec des inclusions intranucléaires éosinophiles et ubiquitine-positives présentes dans les neurones et les astrocytes (Greco et al., 2006).

FXTAS est dû à la présence d'une prémutation de 55 à 200 répétitions (CGG)<sub>n</sub> dans la partie 5'UTR du gène *FMRI* localisé en Xq27.3. La plupart des prémutations associées à un syndrome FXTAS sont supérieures à 70 répétitions (Jacquemont et al., 2007; Jacquemont et al., 2006 ). Les mutations supérieures à 200 répétitions (CGG)<sub>n</sub> sont responsables du syndrome de l'X fragile (MIM 300624) (Kremer et al., 1991 ; Oberle et al., 1991 ; Verkerk et al., 1991; Yu et al., 1991 ).

L'identification d'une prémutation chez un patient ataxique a une répercussion majeure pour le conseil génétique dans sa famille quand au risque de voir naître un enfant atteint du syndrome d'X fragile. Hall et al. (2005) proposent donc de rechercher une prémutation au niveau du gène *FMRI* chez tout homme développant une ataxie après l'âge de 50 ans ou chez tout homme présentant, après l'âge de 50 ans, un tremblement d'intention, un syndrome de Parkinson, ou une démence et chez qui il existe une histoire familiale de retard mental, d'autisme, ou de ménopause précoce (Hall et al., 2005).

Sur le plan moléculaire, les patients FXTAS, comme les patientes avec ménopause précoce due à un déficit ovarien prématuré, présentent une élévation du taux d'ARNm leucocytaire de *FMRI* et une diminution modérée du taux de protéine FMR1 (Hagerman et al., 2004 ; Hagerman et al., 2001 ; Jacquemont et al., 2003 ; Oostra and Willemsen, 2003). Le mécanisme physiopathologique serait un « gain de fonction » toxique de l'ARNm porteur de l'expansion trinuécléotidique (CGG)<sub>55-200</sub> et FXTAS rejoindrait ainsi un groupe de maladies neurodégénératives dues à des expansions dans les parties non codantes d'ARNm et incluant les dystrophies myotoniques de type 1 et 2, les SCA de type 8, 10, 12 et la maladie de Huntington-

like 2 (Ranum and Cooper, 2006). L'ARNm porteur de la prémutation pourrait séquestrer les protéines dont la fonction normale est de fixer l'ARNm contenant le motif CGG et entraîner leur déplétion fonctionnelle et des anomalies du métabolisme des ARNm, d'épissage par exemple (Jacquemont et al., 2007).

Les caractéristiques cliniques et génétiques des ataxies récessives dégénératives présentées dans ce manuscrit sont résumées dans le Tableau 4.

**Tableau 4 : Caractéristiques cliniques et génétiques des ataxies récessives dégénératives**

Maladie	Locus	Gène	Protéine	Caractéristiques
<b>Protéines mitochondriales et Stress oxydant</b>				
Ataxie de Friedreich <b>FRDA</b>	9q13	<i>FXN</i> Expansion GAA	Frataxine	aréflexie, signe de Babinski, troubles de la sensibilité profonde, cardiomyopathie
Ataxie avec déficit en vitamine E <b>AVED</b>	8q13	<i>TTPA</i>	Protéine de transfert de l' $\alpha$ -Tocopherol	Aréflexie, signe de Babinski, troubles de la sensibilité profonde, tremblement de la tête, vitamine E ↓
Abêtalipoprotéïnémie <b>ABL</b>	4q23	<i>MTTP</i>	Grande sous-unité de la protéine microsomale de transfert des triglycérides	Stéathorée, aréflexie, troubles de la sensibilité profonde, rétinopathie pigmentaire, acanthocytes, cholestérol, TG, LDL, VLDL ↓
Ataxie spinocérébelleuse avec anémie sidéroblastique liée à l'X <b>XLSA/A</b>	Xq13	<i>ABC7</i>	Transporteur de type ATP-binding cassette	Hommes atteints, retard psychomoteur, syndrome pyramidal, anémie hypochrome microcytaire, sidéroblastes
Ataxie spino-cérébelleuse de début infantile <b>IOSCA</b>	10q24	<i>C10orf2</i>	Twinkle	Hypotonie, neuropathie sensitive, athétose, épilepsie, atrophie optique, surdité, ophtalmoplégie
Neuropathie sensitive ataxiante avec dysarthrie et ophtalmoparésie <b>SANDO</b> Ataxie mitochondriale récessive <b>MIRAS</b>	15q26	<i>POLG</i>	Polymérase $\gamma$	Variabilité clinique, ataxie cérébelleuse ou neuropathie sensitive, myopathie, ophtalmoplégie, épilepsie, migraines, myoclonies, insuffisance hépatique, atteinte cognitive, anomalies substance blanche, délétions multiples ADNmt

**Tableau 4 (Suite)**

<b>Maladie</b>	<b>Locus</b>	<b>Gène</b>	<b>Protéine</b>	<b>Caractéristiques</b>
<b>Protéines nucléaires et réparation de l'ADN</b>				
Ataxie télangiectasie <b>AT</b>	11q22	<i>ATM</i>	Phosphatidylinositol 3-kinase-type	Télangiectasies, apraxie oculomotrice, atrophie cérébelleuse, déficit immunitaire, prédisposition aux cancers, instabilité chromosomique, $\alpha$ -foetoprotéine $\uparrow$
Ataxie télangiectasie-like <b>ATLD</b>	11q21	<i>MRE11</i>	MRE11	Atrophie cérébelleuse, apraxie oculomotrice, mouvements choréiques et dystoniques des mains, microcéphalie, instabilité chromosomique
Ataxie avec apraxie oculomotrice de type 1 <b>AOA1</b>	9p13	<i>APTX</i>	Aprataxine	Apraxie oculomotrice, neuropathie axonale sensitivo-motrice, chorée, dystonie, retard mental, hypercholestérolémie, hypoalbuminémie
Ataxie avec apraxie oculomotrice de type 2 <b>AOA2</b>	9q34	<i>SETX</i>	Senataxine	Atrophie cérébelleuse, neuropathie axonale sensitivo-motrice, dystonie, chorée, apraxie oculomotrice, $\alpha$ -foetoprotéine $\uparrow$
Ataxie cérébelleuse avec neuropathie de type 1 <b>SCAN1</b>	14q31	<i>TDP1</i>	Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1	Proche d'AOA1, atrophie cérébelleuse, neuropathie sensitivo-motrice, hypercholestérolémie, hypoalbuminémie
<b>Autres mécanismes moléculaires</b>				
Ataxie spastique de Charlevoix-Saguenay <b>ARSACS</b>	13q12	<i>SACS</i>	sacsine	Syndrome pyramidal, atrophie cérébelleuse, striations rétiniennes, neuropathie sensitivo-motrice
Ataxie cérébelleuse autosomique de type 1 <b>ARCA1</b>	6q25	<i>SYNE1</i>	Syne-1	Début à l'âge adulte, progression lente, atrophie cérébelleuse
ataxie/tremblement associés à l'X Fragile <b>FXTAS</b>	Xq27.3	<i>FMRI</i> Prémuation CGG	FMRP	Ataxie cérébelleuse et/ou tremblement, après 50 ans, troubles cognitifs et psychiatriques, atrophie cérébrale avec lésions hyperintenses des pédoncules cérébelleux moyens

### 3. Loci identifiés

Plusieurs loci d'ataxies récessives ont été identifiés sans que le gène responsable ne soit actuellement mis en évidence. Ils sont présentés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Nomenclature et caractéristiques cliniques des loci d'ataxies récessives

Nom / OMIM	Signes cliniques distinctifs	Locus	Références
SCAR2 / 213200	Ataxie cérébelleuse congénitale, retard mental, petite taille	9q34-qter	Delague 2001
SCAR3 / SCABD / 271250	Ataxie, atrophie optique ou rétinopathie pigmentaire, surdité	6p22	Bomont 2000
SCAR4 / 607317	Ataxie cérébelleuse et sensitive de l'adulte, signes pyramidaux	1p36	Burmeister 2002
SCAR5 / CAMOS / 606937	Ataxie cérébelleuse, retard mental, microcéphalie, atrophie optique, anomalies de la biopsie cutanée	15q24-q26	Delague 2002
SCAR6 / 608029	Ataxie spastique infantile, hypotonie, petite taille	20q11-q13	Tranebjaerg 2003
SCAR7 / 609270	Ataxie cérébelleuse et proprioceptive, début dans l'enfance.	11p15	Breedveld 2004
AXPC1 / 609033	Ataxie cordonale postérieure et rétinopathie pigmentaire	1q31-q32	Higgins 1999
SPAX2 / 611302	Ataxie spastique à l'adolescence	17p13	Bouslam 2007
SPAX3 / 611390	Ataxie spastique avec leucoencéphalopathie	2q33-q34	Thiffault 2006
610185	Hypoplasie cérébelleuse, retard mental, locomotion quadrupédale	17p	Turkmen 2006
Nouvelle forme d'ataxie-épilepsie (Unverricht-Lundborg)	Epilepsie avant 1 an, ataxie cérébelleuse, retard mental, anomalies de la substance blanche	16q21	Gribaa 2007
Nouvelle forme d'ataxie-épilepsie (Unverricht-Lundborg) <sup>a</sup>	Ataxie précoce, épilepsie vers 10 ans	12p12-q13	El-Shanti 2006
Nouvelle forme d'ataxie-épilepsie (Unverricht-Lundborg) <sup>a</sup>	Epilepsie myoclonique vers 5-10 ans, ataxie	12p11-q13	Berkovic 2005

SCAR : spinocerebellar ataxia autosomal recessive ; SPAX : spastic ataxia autosomal recessive (correspond à une nomenclature proposé sur le site de OMIM). a. Les loci identifiés par El-Shanti (2006) et Berkovic (2005) pourraient correspondre à la même entité.

## *Le coenzyme Q*

### III. Le coenzyme Q

Au cours de ma thèse, nous avons identifié des mutations dans un gène responsable d'une nouvelle forme d'ataxie associée à un déficit en coenzyme Q<sub>10</sub>. Dans ce chapitre, je présenterai donc les caractéristiques biochimiques, les principales fonctions et la voie de la biosynthèse du coenzyme Q. Puis, je décrirai les différentes formes de déficit en CoQ<sub>10</sub> observés chez l'homme.

#### A. Structure biochimique

Le coenzyme Q (CoQ ou ubiquinone) a été isolé en 1955 par Festenstein et al. (Festenstein et al., 1955), et dès 1957, Crane et al. ont établi son rôle dans la chaîne respiratoire mitochondriale (Crane et al., 1957).

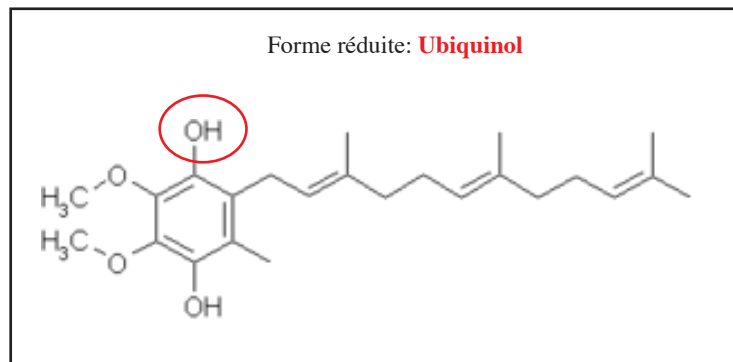
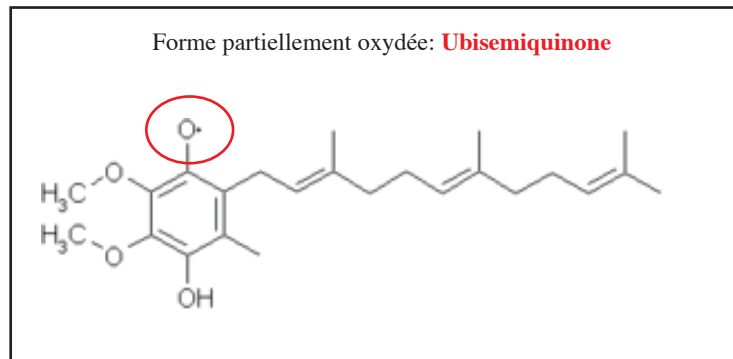
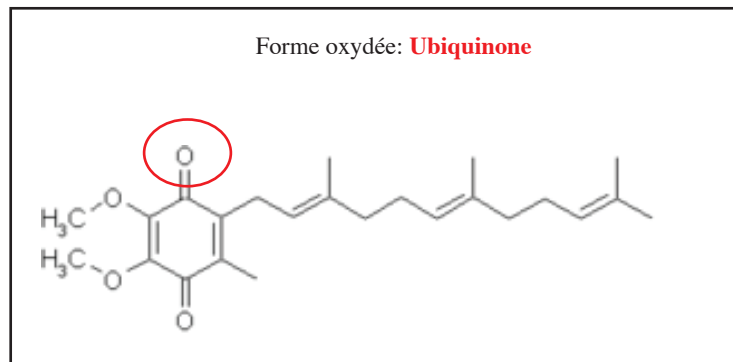
Le CoQ est un lipide prenyl benzoquinone, le 2,3-dimethoxy,5-methyl,6-polyisoprene parabenzoquinone, composé d'un noyau benzoquinone connecté à une longue chaîne isoprénoïde.

Il peut exister sous trois états rédox : une forme complètement oxydée appelée ubiquinone, une forme partiellement oxydée appelée ubisemiquinone, et une forme totalement réduite appelée ubiquinol (Figure 10).

La taille de la chaîne isoprénoïde est spécifique de l'espèce. Ainsi, la levure *Saccharomyces cerevisiae* produit du CoQ<sub>6</sub>, la bactérie *E. coli* produit du CoQ<sub>8</sub> et les rongeurs synthétisent essentiellement du CoQ<sub>9</sub>, l'indice correspondant au nombre d'unités isoprène présents dans la chaîne polyprenyl. Chez l'homme, on le retrouve principalement sous la forme CoQ<sub>10</sub>, et dans une moindre mesure (entre 2 et 7%) sous la forme CoQ<sub>9</sub> (Turunen et al., 2004).

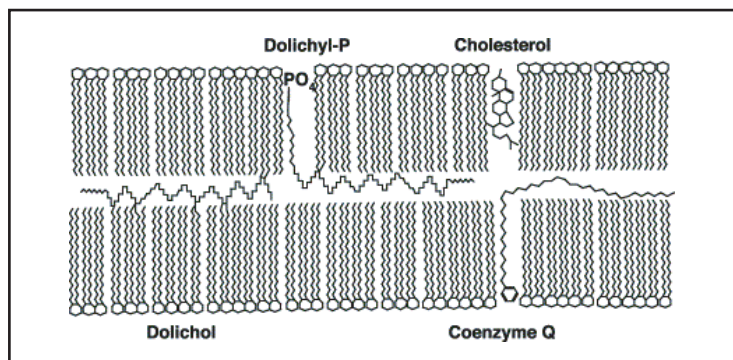
La majorité du CoQ est libre dans le feuillet lipidique (Lenaz et al., 2007) et une petite quantité est liée à des protéines (Lass and Sohal, 1999). La localisation intramembranaire des différents lipides issus du métabolisme du mevalonate influence les propriétés physico-chimiques des membranes. En effet, les chaînes polyisoprénoïdes du CoQ, du dolichol et du dolichyl-P sont situées dans la région centrale hydrophobe entre le double feuillet phospholipidique (Figure 11) (Cornell et al., 1987 ; Turunen et al., 2004). Les groupements fonctionnellement actifs, dont le noyau benzoquinone, sont ainsi à la surface interne ou externe de la membrane. Cette





**Figure 10 : Les 3 états rédox du Coenzyme Q**

Le noyau benzôïque actif est associé à une chaîne isoprénoïde (CoQ<sub>3</sub> sur ce schéma)



**Figure 11 : La distribution intramembranaire des lipides issus de la voie du Mévalonate.**

D'après Turunen et al. *Biochimica Biophysica Acta*, 2004.

conformation déstabilise les membranes entraînant une augmentation de la fluidité et de la perméabilité, contrairement au cholestérol qui stabilise les membranes.

## **B. Rôles physiologiques du coenzyme Q**

Il apparaît de plus en plus évident que le CoQ a de nombreuses fonctions physiologiques. Il est présent dans tous les tissus à des taux variables compris chez l'homme entre 114 µg/g dans le cœur et 8 µg/g dans le poumon (Turunen et al., 2004). Il est présent dans toutes les membranes cellulaires et dans toutes les lipoprotéines circulantes. Son rôle principal est le transfert d'électrons et de protons au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, dès 1957, Crane et al. ont établi qu'il avait une fonction dans la chaîne respiratoire (Crane et al., 1957). En 1975, Mitchell et al. ont proposé le modèle du « protonmotive CoQ cycle » dans lequel des étapes de réduction puis d'oxydation du noyau quinone du CoQ permettent de transférer des protons dans l'espace intermembranaire. Le CoQ participe ainsi à la constitution du gradient de protons permettant la formation de l'ATP et a donc un rôle dans la conversion de l'énergie. Au cours de ce processus, le CoQ transfère des électrons des complexes I et II au complexe III, et il a été montré qu'il est indispensable pour la stabilité du complexe III (complexe bc1) (Santos-Ocana et al., 2002).

Ce rôle de transfert d'électrons n'est pas limité à la chaîne respiratoire, puisque le CoQ pourrait être impliqué dans les processus d'acidification des lysosomes (Gille and Nohl, 2000), et dans des réactions de transfert de protons à travers la membrane plasmique (Crane et al., 1991).

Un second rôle majeur du CoQ est son action antioxydante. L'ubiquinol (CoQH<sub>2</sub>) est un agent réducteur permettant l'inactivation des peroxydes. De même, l'oxydation des protéines membranaires et de l'ADN peut être prévenue par le CoQH<sub>2</sub> (Forsmark-Andree et al., 1995 ; Tomasetti et al., 2001; Tomasetti et al., 1999). Afin de maintenir ce rôle antioxydant, il est nécessaire qu'il y ait des protéines régulant le niveau de réduction du CoQ dans tous les compartiments cellulaires. Or, c'est le cas dans la mitochondrie (Aberg et al., 1992), mais également dans les autres compartiments cellulaires (Beyer et al., 1996 ; Olsson et al., 1999; Takahashi et al., 1995). L'efficacité de la régénération du coenzyme Q réduit, et son implication

dans la prévention de l'initiation et de la propagation de la peroxydation lipidique sont les raisons pour lesquelles le CoQ est considéré comme un antioxydant particulièrement efficace. Le CoQ a un rôle antioxydant par une interaction directe avec les ROS, mais également par sa capacité à régénérer le tocophérol (ou vitamine E). En effet, le CoQH<sub>2</sub> peut réduire le tocophérol oxydé et ainsi restaurer sa fonction antioxydante (Arroyo et al., 2000). Cette activité est importante car les membranes cellulaires possèdent des enzymes réduisant le CoQ, alors qu'il n'existe pas d'enzyme réduisant directement le tocopherol oxydé (Crane, 2007).

Le CoQ joue aussi un rôle antioxydant au niveau de la circulation sanguine et en particulier dans la prévention de la peroxydation des VLDL (Alleva et al., 1995; Romagnoli et al., 1994). Le CoQ pourrait ainsi avoir un rôle anti-athérogène par son action anti-oxydante dans les particules lipidiques. Il semble qu'il ait également une fonction, encore mal comprise, dans la régulation des facteurs d'adhésion cellulaire permettant une inhibition du recrutement des monocytes au niveau des lésions d'athérosclérose (Witting et al., 2000). Le CoQ pourrait également avoir une action bénéfique sur la dysfonction endothéliale en particulier en régulant la production de l'oxyde nitrique NO.

De plus, le CoQ est un cofacteur des protéines « découplantes » mitochondriales (uncoupling proteins, UCP) (Echtay et al., 2000) qui permettent de réduire la force du gradient de protons (Echtay, 2007). En effet, les protéines « découplantes » peuvent transférer les protons H<sup>+</sup> de l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale afin d'utiliser le gradient de protons dans un but autre que la production d'ATP, comme par exemple pour créer de la chaleur (Klingenberg and Huang, 1999).

Lors de l'oxydoréduction du CoQ il peut se former un radical semiquinone partiellement réduit qui contribuera à la formation de ROS et peut donc avoir un effet délétère. Cette action prooxydante contribue également à la production d'ion superoxyde O<sub>2</sub><sup>-</sup> et donc via les SOD de peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lequel intervient dans la régulation de nombreux processus cellulaires (Linnane et al., 2007). Ainsi, le CoQ aurait un rôle dans la transduction du signal et la régulation de l'expression des gènes (Groneberg 2005) par son rôle dans la production du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lequel active des facteurs de transcription tels que le NFκB (Kaltschmidt et al., 1999).

Enfin, le CoQ aurait également un rôle régulateur au niveau du pore de transition de perméabilité mitochondriale indispensable au processus d'apoptose (Fontaine et al., 1998 ; Papucci et al., 2003; Walter et al., 2000 ).

---

### **Tableau 6 : Les nombreux rôles physiologiques du coenzyme Q**

---

Rôle de transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale (force protonmotive).

Rôle dans le transfert de protons au niveau d'autres compartiments cellulaires (membranes plasmiques, lysosomes).

Rôle antioxydant.

Rôle prooxydant impliqué dans la régulation de l'expression de nombreux gènes

Rôle dans la régulation des propriétés physicochimiques des membranes

Rôle dans l'activation des protéines découplantes (uncoupling proteins) mitochondriales.

Rôle dans la régulation de la perméabilité des pores de transition mitochondriaux.

---

(Modifié d'après Turunen et al. 2003)

### **C. Biosynthèse du coenzyme Q**

La première partie de la biosynthèse du CoQ est commune à celle du cholestérol et correspond à la voie du mévalonate qui a lieu dans le cytosol.

La deuxième partie est spécifique du CoQ et a lieu principalement dans la mitochondrie. Cette voie a été largement étudiée chez la levure et les bactéries, mais peu de données existent chez les mammifères en dehors des corrélations issues des études d'homologie de séquences. Si la mitochondrie synthétise le CoQ nécessaire à la chaîne respiratoire, il se pourrait qu'un système existe également dans le réticulum endoplasmique-appareil de Golgi permettant la synthèse de

novo du CoQ inséré dans les lipoprotéines ou dans les membranes cellulaires autres que la membrane mitochondriale (Turunen et al., 2004).

### **1. La voie du mévalonate**

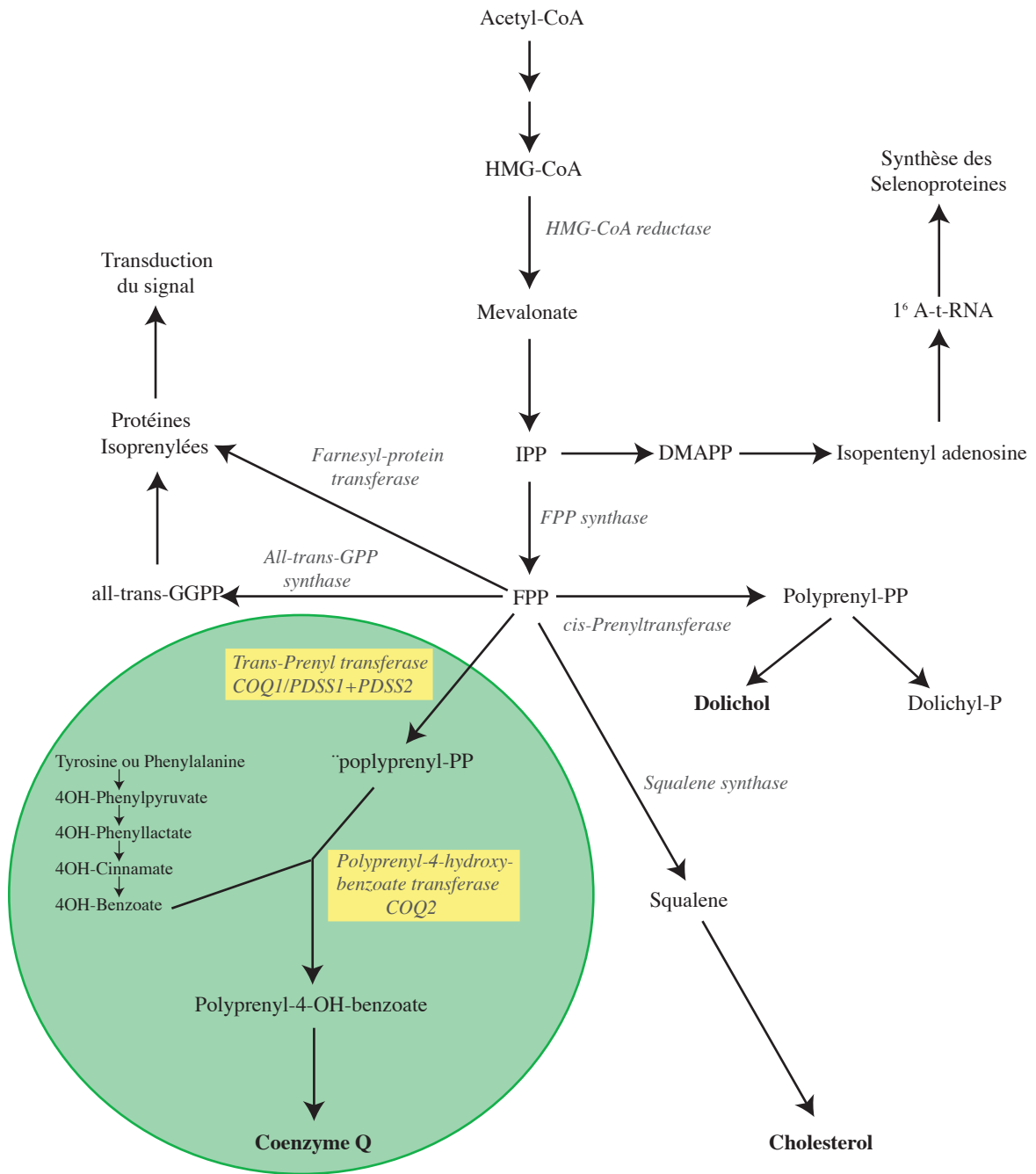
Cette voie est commune à la synthèse du cholestérol, du dolichol, du CoQ et à l'isoprenylation des protéines (Figure 12). Elle a essentiellement lieu dans le cytosol mais pourrait faire intervenir d'autres compartiments cellulaires tels que les péroxysomes, les microsomes ou le réticulum endoplasmique. Cette voie correspond à la transformation de l'acetyl-coenzyme A (acetyl-CoA) en Farnesyl pyrophosphate (FPP) qui est le substrat commun des différentes voies spécifiques permettant la biosynthèse des molécules précédemment citées.

La première réaction est la formation de 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) à partir de 3 acetyl-CoA, réalisée par 2 enzymes : l'acetoacetyl-CoA thiolase et l'HMG-CoA synthase.

Puis l'HMG-CoA est transformé en mévalonate par l'HMG-CoA réductase (enzyme à NAPH+H<sup>+</sup>) qui est une enzyme majeure pour la régulation de la synthèse du cholestérol (Brown Goldstein 1985). Les inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase (les statines) sont largement utilisés en pratique médicale et sont responsables d'une diminution de l'ensemble des lipides issus de la voie du mévalonate, dont le CoQ. L'apparition d'une myopathie peut être observée lors de la prise de statines, et celle-ci pourrait être secondaire au déficit induit en coenzyme Q<sub>10</sub> (Folkers 1985, Rundek 2004, Lamperti 2005) (Fadic et al., 1997 ; Lamperti et al., 2005; Rundek et al., 2004 ).

Le mévalonate est ensuite phosphorylé à deux reprises par la mévalonate kinase et la phosphomévalonate kinase. Puis la décarboxylation du mévalonate pyrophosphate permet d'obtenir l'isopentenyl pyrophosphate (IPP) qui est non seulement le précurseur du FPP, mais également le bloc utilisé dans la chaîne polyisoprénoïde du dolichol et du CoQ. De plus, l'IPP a un rôle lors de la biosynthèse des sélénoprotéines (Warner et al., 2000).

Enfin, l'IPP est transformé en FPP par la Farnesyl pyrophosphate synthase puis la phase finale spécifique de la biosynthèse de chaque molécule (cholestérol, dolichol, CoQ) est entreprise.



**Figure 12: La voie du Mévalonate est commune à la biosynthèse du Coenzyme Q, du cholestérol, et du dolichol.** Les enzymes majeures sont indiquées en italiques. La voie spécifique du coenzyme Q dans le cercle vert. Les enzymes qui ont été associées à des déficits du Coenzyme Q chez l'homme sont encadrées en jaune. CoA, coenzyme A, HMG, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl; IPP, isopentenyl pyrophosphate; FPP, farnesyl pyrophosphate GGPP, geranylgeranyl pyrophosphate; DMAPP, diméthylallyl pyrophosphate. Modifié d'après Turunen et al. *Biochimica Biophysica Acta*, 2004.

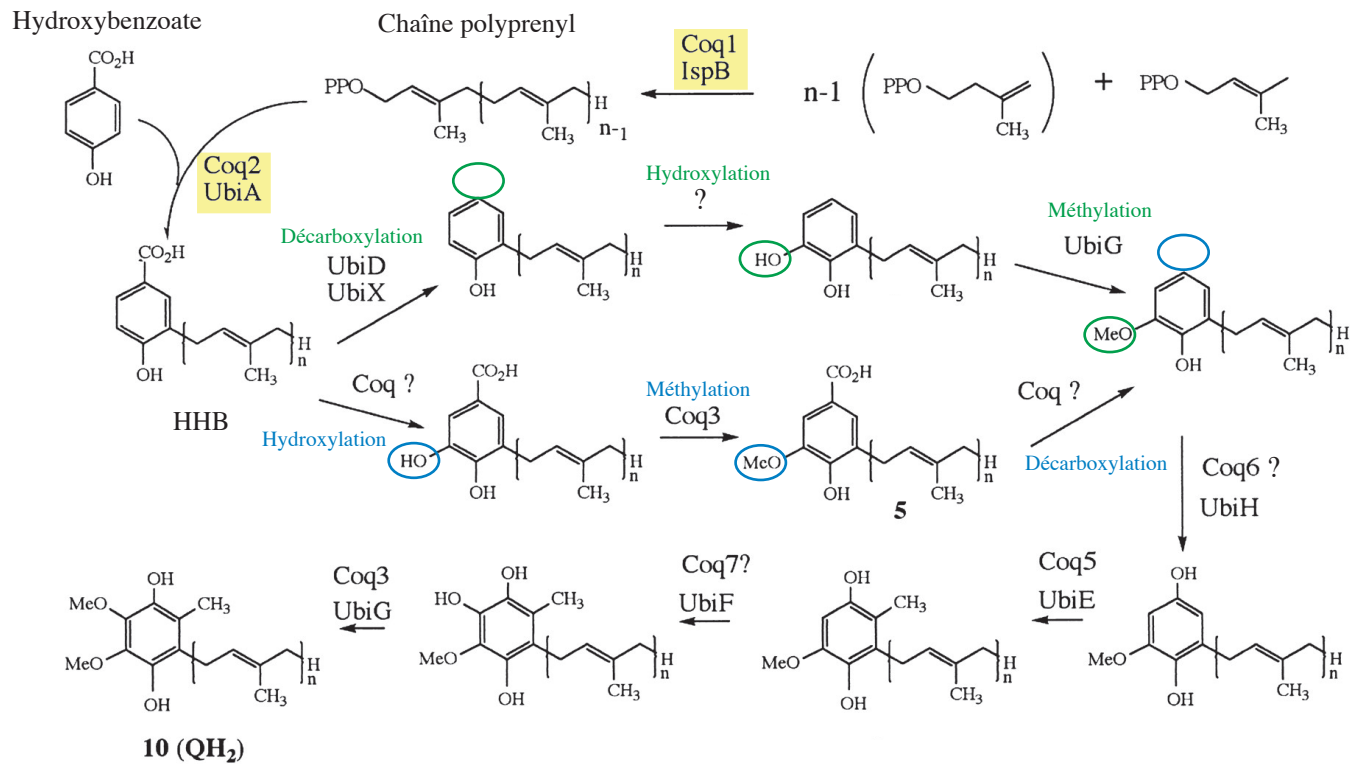
## 2. La voie spécifique du coenzyme Q

L'étude de groupes de complémentation déficients en CoQ chez la levure *S. cerevisiae* (*coq1* à *coq10*) et la bactérie *E. coli* (*UbiA-H*) a permis d'identifier 10 gènes codant pour des protéines impliquées dans la biosynthèse du CoQ. Chacun de ces gènes a au moins 1 homologue chez l'homme suggérant une conservation de cette voie métabolique au cours de l'évolution. Cette hypothèse est renforcée par l'observation d'une complémentation fonctionnelle lorsque les gènes humains *COQ2*, *COQ3* et *COQ7* sont introduits dans les souches mutantes correspondantes (Forsgren et al., 2004 ; Jonassen and Clarke, 2000 ; Vajo et al., 1999).

Les souches mutantes *coq* de la levure sont caractérisées par un déficit de la respiration mitochondriale et sont incapables de pousser sur un milieu riche en carbone non-fermentable (éthanol et glycérol). De plus, elles ne forment que de petites colonies lorsqu'elles sont cultivées sur un milieu riche en glucose (Tzagoloff et al., 1975a; Tzagoloff et al., 1975b ). Les activités des enzymes NADH-cytochrome c réductase et succinate-cytochrome c réductase sont basses, mais elles sont restaurées par un apport exogène en CoQ dans le milieu de culture (Johnson et al., 2005; Tzagoloff et al., 1975a ).

Cette voie est caractérisée par la formation de la chaîne isoprénoïde puis son association au noyau benzoquinone, suivie d'une série de modifications biochimiques de ce noyau. Ces modifications biochimiques comprennent 2 *O*-méthylations, 1 *C*-méthylation, 1 décarboxylation et 4 hydroxylations (Figure 13). Les protéines codées par les gènes *COQ1*, 2, 3, 5, 6 et 7 ont une activité enzymatique démontrée dans ce cycle de modifications, alors que la fonction des autres COQ est moins bien établie.

De nombreuses études restent nécessaires pour réellement attribuer une fonction à chacun des gènes impliqués dans cette biosynthèse et en particulier pour définir quels sont les gènes responsables de chaque étape. Cette détermination est compliquée car les composants majeurs de la biosynthèse sont organisés en un complexe multienzymatique associé à la membrane interne de la mitochondrie. La présence des différents polypeptides est requise pour la fonction et la stabilité du complexe. En effet, les taux protéiques de COQ3, COQ4, COQ6, COQ7 et COQ9 sont significativement diminués dans toutes les souches mutantes *coq null* (Baba et al., 2004 ; Belogrudov et al., 2001 ; Hsieh et al., 2007; Hsu et al., 2000 ; Tran et al., 2006 ). De plus, de



**Figure 13: La biosynthèse du Coenzyme Q chez *S. cerevisiae* et *E. coli***

Cette voie est caractérisée par la formation de la chaîne isoprénoïde puis son association au noyau benzoquinone, suivie d'une série de modifications biochimiques de ce noyau. Ces modifications biochimiques comprennent 2 O-méthylations, 1 C-méthylation, 1 décarboxylation et 4 hydroxylation. L'ordre des modifications est en partie spéculatif.

Après la formation de l'acide benzoïque 4-hydroxy-3-polyprenyl (HHB), l'ordre des modifications diffère entre les procaryotes et les eucaryotes.

Les enzymes impliquées dans ces étapes sont indiquées lorsqu'elles sont connues (Coq chez *S. cerevisiae*; Ubi chez *E. coli*).

Les homologues des gènes humains dans lesquels des mutations ont été associées à un déficit en CoQ sont soulignés en jaune. Modifié d'après Poon et al. *Journal of Bacteriology*, 2000.



nombreuses expériences de co-élution ou de co-migration ont montré un lien entre les différentes protéines impliquées dans la phase finale de la biosynthèse du CoQ (Tran and Clarke, 2007). Il est donc difficile de définir le rôle exact de chaque protéine car les différentes souches mutantes accumulent essentiellement ou exclusivement un intermédiaire stable appelé acide benzoïque 4-hydroxy-3-polyprenyl (HHB) obtenu après l'action de COQ2 (Figure 13). L'ordre des réactions modifiant le noyau benzoate est donc en grande partie spéculatif (Tran and Clarke, 2007).

Les caractéristiques de chacune des 10 protéines COQ1 à 10 et de leurs homologues sont décrites ci-dessous.

### **COQ1 / PDSS1-PDSS2 :**

COQ1 est la polyprenyl diphosphate synthase. Elle catalyse l'association de plusieurs résidus isoprènes pour former une longue chaîne polyisoprénoïde (Ashby and Edwards, 1990) (Figure 13). La taille de la chaîne isoprénoïde est spécifique de chaque espèce et elle est directement déterminée par la séquence de la polyprenyl diphosphate synthase. En effet, si la séquence bactérienne est transfectée dans la souche mutée de levure *coq1*, la levure produira du CoQ<sub>8</sub> au lieu du CoQ<sub>6</sub> (Okada et al., 1996).

Chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, la souris ou l'humain, la polyprenyl diphosphate synthase correspond à des hétérotétramères composés de deux sous-unités PDSS1 et PDSS2 (Saiki et al., 2005; Saiki et al., 2003), alors que chez *S. cerevisiae* et *Arabidopsis thaliana* (Jun et al., 2004), COQ1 fonctionne en homo-oligomères. Chez *S. cerevisiae* il a été montré que COQ1 est associée à la membrane mitochondriale interne du côté de la matrice (Gin and Clarke, 2005).

### **COQ2 / UbiA :**

Le noyau 4-hydroxybenzoate, dérivé de la tyrosine, est lié à la chaîne polyisoprénoïde par la 4-hydroxybenzoate polyprenyl transferase (COQ2) (Ashby et al., 1992). Cette réaction permet la formation du dérivé intermédiaire appelé acide benzoïque 4-hydroxy-3-polyprenyl (HHB) (Figure 13) (Ashby et al., 1992 ; Fadic et al., 1997). Chez la levure, cette enzyme est intramembranaire au niveau de la membrane mitochondriale interne (Tran and Clarke, 2007).

### ***COQ3 / UbiG :***

Parmi les transformations biochimiques du noyau benzoate, on observe deux réactions d'*O*-méthylations. Il semble que la même enzyme, COQ3, catalyse ces deux réactions (Figure 13) (Clarke Williams 1991, Wu, Williams, Zamanian 1992, Hsu, Poon 1996). Chez la levure, COQ3 est localisé dans la mitochondrie, où elle est associée à la membrane interne de la mitochondrie du côté de la matrice (Poon et al., 1999).

### ***COQ4***

Des mutations dans ce gène ont été identifiées comme responsables du déficit de synthèse du CoQ dans la souche *coq4* (Belogradov et al., 2001). Cependant, COQ4 code pour une protéine dont la fonction enzymatique est inconnue. En effet, COQ4 ne partage aucune homologie avec les enzymes nécessaires aux différentes étapes de la biosynthèse, et pourrait avoir un rôle structural dans le maintien du complexe polypeptidique impliqué dans la biosynthèse (Tran et al., 2006).

### ***COQ5 / UbiE***

COQ5, la 2-methoxy-6-polyprenyl-1,4-benzoquinone méthyltransferase, catalyse l'unique étape de *C*-méthylation nécessaire à la biosynthèse (Figure 13) (Barkovich et al., 1997; Dibrov et al., 1997). Chez la levure, COQ5 est associée à la membrane interne de la mitochondrie du côté de la matrice (Baba et al., 2004).

### ***COQ6 / UbiH***

Des mutations dans le gène *COQ6* ont été associées à un déficit de la biosynthèse du CoQ, cependant l'étape dans laquelle cette enzyme intervient n'est pas clairement définie (Gin et al., 2003). COQ6 présente des homologies avec la famille des FAD-binding-aromatic hydroxylases et pourrait agir au niveau d'une ou plusieurs étapes d'hydroxylation dans la voie de biosynthèse. Chez la levure elle est associée à la membrane interne de la mitochondrie du côté de la matrice (Gin et al., 2003).

### ***COQ7 / UbiF / CLK-1***

COQ7 est la 3-Methoxy-5-methyl-6-polyprenyl-benzoquinone-hydroxylase et catalyse au moins une hydroxylation du noyau benzoate (Marbois and Clarke, 1996). Les mutations de son homologue *CLK-1* chez *C. elegans* sont responsables d'un allongement de la durée de vie (Ewbank et al., 1997) et son étude est d'un intérêt majeur pour comprendre le lien entre métabolisme du CoQ et la détermination de la durée de la vie. Il faut cependant noter que ce phénotype a également été observé lorsque les différents gènes de la voie de biosynthèse du CoQ sont inactivés par RNAi, et cela sans qu'une modification majeure de l'activité des enzymes de la chaîne respiratoire ne soit induite (Asencio et al., 2003). COQ7 pourrait avoir plusieurs fonctions mal connues à ce jour. Par exemple, Gorbunova et al. ont montré que les homologues chez *C. elegans* et chez la souris, étaient capables de fixer l'ADN mitochondrial au niveau de la région O(L) et pourrait être impliqués dans la régulation de la réplication ou de la transcription de l'ADNmt (Gorbunova and Seluanov, 2002).

### ***COQ8 / ABC1 / UbiB / CABC1 / ADCK3***

Ce gène, initialement identifié dans une souche mutante de levure caractérisée par un déficit respiratoire avec une absence d'activité de la NADH-cytochrome c oxydoréductase et de la succinate-cytochrome c oxydoréductase, a été appelé *ABC1* pour « activity of bc1 complexe » (Bousquet et al., 1991). Puis il a été montré que l'activité des complexes II, III et IV des souches mutantes était thermosensible et que l'addition de CoQ exogène compensait partiellement le déficit respiratoire (Brasseur et al., 1997). Une hypothèse a été émise selon laquelle la protéine *ABC1* avait un rôle de chaperone essentiel pour la conformation et l'activité du complexe bc1 et des complexes voisins, d'où l'appellation du gène humain *CABC1* pour « Chaperone activity of bc1 complexe-like » (MIM 606980). Cependant Do et al. ont montré que *ABC1* correspondait au gène *COQ8* muté dans la souche de levure *coq8* et que les anomalies de la chaîne respiratoire étaient dues à un déficit en CoQ (Do et al., 2001). De même, l'homologue *ubiB* est muté chez *E. Coli* (Poon et al., 2000) et l'homologue *aarF* est muté chez *Providencia stuartii* (Macinga et al., 1998) entraînant dans les deux cas un déficit en CoQ. Sa fonction dans la voie de biosynthèse n'est pas connue, et *COQ8* ne partage aucune homologie avec les enzymes nécessaires aux différentes étapes de la biosynthèse. Au contraire, Leonard et al. ont montré que les membres de cette famille conservée jusque chez les procaryotes présentaient des homologies avec les kinases (Leonard et al., 1998). Au cours de ma thèse nous avons identifié, chez des patients ataxiques,

des mutations dans *CABC1* (également appelé *ADCK3* pour « aarf domain containing kinase 3 »). Je discuterai donc plus en détail de la fonction de ce gène dans les chapitres Résultats et Discussion.

### ***COQ9* :**

Des mutations de *COQ9* ont été récemment identifiées dans une souche de *S. cerevisiae* présentant un phénotype similaire aux autres souches déficientes en CoQ (Johnson et al., 2005). Son rôle dans la biosynthèse n'est pas connu. Bien qu'il ait de nombreux homologues chez les eucaryotes et les  $\alpha$ -protéobactéries, il n'a aucune homologie avec des protéines ayant une fonction connue. Il a été montré qu'une expression multi-copies de *COQ8* pouvait restaurer le phénotype respiratoire d'un des mutants *coq9*, cependant le mécanisme permettant cette restauration n'est pas compris. Chez la levure, *COQ9* est associée à la membrane interne de la mitochondrie du côté de la matrice (Hsieh et al., 2007).

### ***COQ10* :**

Comme les autres souches *coq*, la souche *coq10* présente un déficit de l'activité de la NADH-cytochrome c reductase et de la succinate-cytochrome c reductase qui peut être restaurée par l'addition exogène de CoQ<sub>2</sub> (Barros et al., 2005). Mais, contrairement aux autres *coq*, la croissance de cette souche sur un milieu éthanol-glycérol est possible même si elle est très ralentie. Ces levures présentent des taux quasiment normaux de CoQ<sub>6</sub> et la croissance sur un milieu éthanol-glycérol n'est que partiellement restaurée en présence de CoQ<sub>6</sub> exogène. L'hypothèse a donc été émise que le CoQ<sub>6</sub> produit par ces levures n'est pas « fonctionnel ». De plus, *COQ10* fait partie de la famille des protéines START impliquées dans la liaison et le transport de lipides (Miller, 2007). Ainsi, *COQ10* pourrait agir comme une chaperonne du CoQ nécessaire pour sa fonction dans la chaîne respiratoire ou être impliquée dans le transport intracellulaire du CoQ, sans avoir de rôle direct dans la voie de biosynthèse (Barros et al., 2005 ; Tran and Clarke, 2007).

## **D. Les déficits humains en coenzyme Q<sub>10</sub>**

### **1. Présentation**

Les déficits primaires en coenzyme Q<sub>10</sub> représentent un groupe hétérogène de maladies rares (MIM 607426). En effet, depuis la première description (Ogasahara et al., 1989), seuls une quarantaine de patients ont été rapportés dans la littérature (Rotig et al., 1997). Toutes les formes décrites à ce jour ont une transmission autosomique récessive. Schématiquement, trois formes cliniques peuvent être distinguées :

- Une forme sévère avec encéphalopathie chez le nourrisson pouvant être associée ou non à une myopathie mitochondriale ou à une atteinte multisystémique avec, en particulier, une atteinte rénale (Boitier et al., 1998 ; Leshinsky-Silver et al., 2003 ; Ogasahara et al., 1989 ; Quinzii et al., 2006; Rahman et al., 2001 ; Rotig et al., 2000 ; Salviati et al., 2005 ; Sobreira et al., 1997 ; Van Maldergem et al., 2002 ).
- Une forme dominée par une atteinte musculaire (intolérance à l'exercice, myoglobulinurie, myopathie mitochondriale à la biopsie), (Di Giovanni et al., 2001 ; Horvath et al., 2006 ; Lalani et al., 2005).
- Une forme dominée par une ataxie, qui peut être associée à d'autres manifestations neurologiques ou extra-neurologiques. Cette forme semble être la plus fréquente (Rotig 2007) et a été découverte par hasard (Musumeci et al., 2001). En effet, il n'est pas habituel de réaliser une biopsie musculaire avec dosage du coenzyme Q<sub>10</sub> chez les patients ataxiques. Lors d'une étude sur les encéphalomyopathies avec déficit en coenzyme Q<sub>10</sub> réalisée par Sobreira et al., une des biopsies musculaires contrôles utilisées a retrouvé un déficit majeur en CoQ (Sobreira et al., 1997). Cette biopsie provenant d'un patient hospitalisé pour une ataxie avec atrophie cérébelleuse, Musumeci et al. ont dosé systématiquement le CoQ chez leurs patients ataxiques et ont identifié 6 patients avec déficit en CoQ (Musumeci et al., 2001). Depuis, plusieurs patients ont été décrits, avec chez certains un début à l'âge adulte (Artuch et al., 2006 ; Aure et al., 2004 ; Gironi et al., 2004 ; Horvath et al., 2006; Lamperti et al., 2003 ).

A l'exception de la forme dominée par l'ataxie, la plupart des patients présentent des signes évocateurs d'une maladie mitochondriale. La biopsie musculaire retrouve le plus souvent un déficit modéré de l'activité enzymatique combinée des complexes I+III et II+III, reflétant le déficit en CoQ. Ces activités peuvent être stimulées in vitro par l'ajout de CoQ exogène (Rotig et al., 2000). Les autres activités enzymatiques sont habituellement normales. Le dosage par HPLC du CoQ, idéalement réalisé sur du tissu musculaire et éventuellement sur des fibroblastes, révèle une déplétion d'intensité variable.

Il est important de faire le diagnostic précocement car un traitement substitutif oral en CoQ a montré un effet bénéfique chez certains de ces patients (Rotig et al., 2000). Aucune donnée statistique n'est disponible en raison du petit nombre de patients testés et des taux variables de CoQ utilisés dans le traitement substitutif. Cependant, une amélioration subjective est souvent notée par le patient et sa famille, parfois associée à une amélioration objective lors de l'examen clinique. Celle-ci peut correspondre à une meilleure coordination (Van Maldergem 2002), un retour aux facultés ambulatrices et de faire du vélo (Rotig et al., 2000), une augmentation de la force musculaire (Aure et al., 2004 ; Boitier et al., 1998 ; Gironi et al., 2004), la disparition des myoclonies (Salviati et al., 2005), ou une amélioration du score d'évaluation ICARS (Artuch et al., 2006). Le traitement substitutif en CoQ a également montré un effet sur la fonction mitochondriale de certains patients (Aure et al., 2004 ; Di Giovanni et al., 2001 ; Rotig et al., 2000 ; Van Maldergem et al., 2002 ). Cependant, dans certains cas les patients s'aggravent ou voient apparaître de nouveaux symptômes alors qu'ils sont sous traitement (Aure et al., 2004) (Rahman et al., 2001) (Leshinsky-Silver et al., 2003). En particulier, il ne semble pas que l'ataxie soit améliorée par le traitement substitutif (Aure et al., 2004 ; Gironi et al., 2004 ; Quinzii et al., 2007), alors que l'atteinte musculaire semble être sensible à ce traitement (Aure et al., 2004 ; Horvath et al., 2006 ; Lalani et al., 2005 ).

Ce n'est que très récemment que des mutations ont été identifiées chez certains des patients présentant un déficit en coenzyme Q<sub>10</sub>. Les gènes impliqués codent soit pour des protéines ayant un rôle direct dans la voie de biosynthèse du CoQ (*PDSS1*, *PDSS2*, *COQ2*) et dont les mutations sont responsables de « déficits primaires en CoQ », soit pour des protéines qui ne sont pas directement impliquées dans cette voie (*AOA1*, *ETFDH*) et dont les mutations sont responsables de « déficits secondaires en CoQ » (Gempel et al., 2007).

## 2. Mutations dans le gène *COQ2*

Quinzii et al. ont réalisé une approche de cartographie par homozygotie ciblée en génotypant uniquement des microsatellites localisés autour des gènes candidats *COQ1* à *COQ8* dans une famille consanguine avec deux enfants atteints d'un déficit en CoQ (Quinzii et al., 2006). Chez ces deux enfants, une mutation faux-sens homozygote (p.Tyr297Cys) au niveau d'un acide aminé conservé dans le gène *COQ2* a été identifiée (Figure 13) (Quinzii et al., 2006). Un des deux patients avait développé une encéphalomyopathie sévère associée à une néphropathie avant l'âge d'1 an, alors que sa sœur présentait une néphropathie isolée à l'âge de 9 mois. La biopsie musculaire ne retrouvait pas de « ragged red fibers », mais l'étude des complexes enzymatiques était en faveur d'un déficit en CoQ avec une diminution des activités combinées des complexes I+III et II+III. Ce déficit a été confirmé par un dosage du CoQ sur la biopsie musculaire et les fibroblastes, ainsi que par deux tests d'incorporation d'un précurseur radioactif montrant un déficit de la biosynthèse du CoQ. Les deux patients ont présenté une amélioration clinique après un traitement oral en CoQ. Cette étude correspond à la première identification d'un gène responsable d'un déficit primaire en CoQ (Quinzii et al., 2006).

Puis, Mollet et al. (2007) ont décrit une deuxième famille dans laquelle 2 enfants ont présenté une atteinte multisystémique néonatale fatale à 1 et 12 jours de vie. Chez la patiente pour laquelle l'ADN était disponible, ils ont identifié une délétion homozygote d'une paire de base avec un décalage du cadre de lecture et un codon stop prématuré dans la partie C-terminale de *COQ2* (c.1198delT, Asn401fsX415). Ils ont montré une accumulation de décaprenyl-pyrophosphate, le substrat de *COQ2*, dans les fibroblastes de cette patiente. De plus la transfection de levures mutantes *Coq2* par un plasmide contenant le gène *COQ2* humain permet de restaurer un phénotype normal avec une croissance sur un milieu riche en éthanol et glycérol. Lorsque la transfection est réalisée avec le gène humain porteur de la mutation c.1198delT, la complémentation fonctionnelle n'a pas lieu confirmant l'effet délétère de cette mutation.

Très récemment, Diomedi-Camassei et al. ont décrit 2 nouveaux patients avec des mutations de *COQ2* (Diomedi-Camassei et al., 2007). Un des 2 patients est décédé à l'âge de 6

mois d'une encéphalopathie associé à une néphropathie, alors que le second présente un tableau moins sévère caractérisé par une néphropathie sans atteinte extra-rénale à l'âge de 18 mois.

### **3. Mutations dans le gène *PDSS1***

Par une approche de cartographie par homozygotie dans une famille consanguine avec deux patients présentant un déficit en CoQ<sub>10</sub>, Mollet et al. ont identifié une mutation faux sens homozygote (Asp308Glu) dans le gène *PDSS1* (Mollet et al., 2007). L'atteinte chez ces deux patients était multisystémique, mais moins sévère que celle observée chez les patients mutés pour *COQ2*. En effet, les patients âgés de 14 et 22 ans présentaient un retard mental modéré, une macrocéphalie, une surdité diagnostiquée à 1 an, une atrophie optique, une neuropathie périphérique, une ob sitt  et une valvulopathie. L'acide aminé Asp308 est conservé au cours de l'évolution, cependant afin de démontrer l'effet pathogénique de la mutation, les auteurs ont réalisé des expériences de complémentation fonctionnelle de la souche mutante de levure *coq1*. Chez l'homme l'activité de COQ1 (Figure 13) est réalisée par deux sous unités, PDSS1 et PDSS2 (Saiki et al., 2003). La transfection du gène humain *PDSS1* wild-type dans le levure mutante *coq1* ne permet pas une restauration fonctionnelle. La mutation faux-sens a donc été insérée dans plasmide contenant le gène *COQ1* de levure. La transfection des souches *coq1* avec un plasmide contenant le gène wild-type permet une restauration de la croissance sur un milieu riche en glycérol et éthanol. Au contraire, le plasmide contenant la mutation faux sens ne permet pas cette restauration, soulignant l'effet délétère de ce changement d'acide aminé.

### **4. Mutations dans le gène *PDSS2***

Par une approche « gène candidat », Lopez et al. ont identifié deux mutations (Gln322X et Ser382Leu)   l'état hétérozygote composite dans le gène *PDSS2* chez un patient présentant un tableau sévère associant un syndrome de Leigh à une néphropathie (Lopez et al., 2006). Les lactates sériques étaient élevés et la biopsie musculaire avait mis en évidence une accumulation excessive sous-sarcolemmale de mitochondries avec un déficit isolé de l'activité combiné des



complexes II+III. Les taux du CoQ musculaire étaient effondrés. Cependant, aucune amélioration clinique n'a été observée après un apport oral en CoQ chez ce patient qui est décédé à l'âge de 8 mois.

## 5. Mutations dans le gène *AOA1*

Quinzii et al. (Quinzii et al., 2005) ont entrepris une analyse de liaison dans une grande famille dont les patients présentaient un déficit en CoQ associé à une ataxie cérébelleuse et avaient été précédemment décrits par Musumeci et al. (Musumeci et al., 2001). Cette étude leur a permis d'identifier une liaison entre la maladie et une région en 9p13 dans cette famille. Cette région contenait le gène *APTX* responsable de l'ataxie avec apraxie oculomotrice de type 1 (*AOA1*) (Date et al., 2001; Moreira et al., 2001b), et Quinzii et al. ont alors identifié une mutation (W279X) déjà décrite chez des patients *AOA1* (Quinzii et al., 2005). Rétrospectivement, le tableau clinique des patients était compatible avec celui d'*AOA1*, cependant aucune étude du CoQ<sub>10</sub> n'avait été précédemment réalisée chez les patients avec une ataxie de type *AOA1*. Après la publication de cette observation, Le ber et al. ont confirmé la présence d'un déficit modéré en CoQ<sub>10</sub> musculaire chez les patients *AOA1* en particulier en présence de la mutation tronquante W279X (Le Ber et al., 2007). Ce déficit n'est cependant pas accompagné de signes de mitochondriopathie à la biopsie musculaire et en particulier n'est pas associé à des anomalies de la chaîne respiratoire mitochondriale. De plus le déficit n'est pas corrélé à la sévérité de la maladie. Le lien entre l'aprataxine, une protéine nucléaire impliquée dans la réparation de l'ADN, et le déficit en CoQ<sub>10</sub> n'est pas compris. Ce déficit est secondaire, cependant les patients *AOA1* pourraient bénéficier d'un apport oral en CoQ. Les patients décrits par Quinzii et al semblent avoir été amélioré sous traitement, cependant des essais cliniques appropriés seront nécessaires pour évaluer l'intérêt de ce traitement substitutif.

## 6. Mutations dans le gène *ETFDH*

Gempel et al. ont montré un déficit musculaire en CoQ chez des patients présentant la forme adulte de l'acidurie glutarique de type II et des mutations faux sens dans le gène *ETFDH* (Gempel et al., 2007). Les 7 patients décrits présentaient tous une intolérance à l'exercice, et une myopathie proximale avec élévation des CPK ayant débutée entre 12 et 32 ans. L'histologie musculaire retrouvait une accumulation lipidique et des signes discrets de myopathie mitochondriale. Les activités des complexes I+III et II+III étaient abaissés avec un déficit significatif en CoQ. Le bilan métabolique par spectrométrie de masse reflétait un déficit multiple en Acyl-CoA déshydrogénase, ce qui a amené les auteurs à séquencer le gène *ETFDH* codant pour l'électron transfer flavoprotein dehydrogenase (ETFDH). Ils ont ainsi montré que la forme adulte de l'acidurie glutarique de type II et une forme de déficit en CoQ avec atteinte musculaire isolée sont alléliques. L'ETFDH est une protéine à centres Fe-S dont le rôle est d'oxyder l'ETF pour transmettre des électrons au CoQ de la chaîne respiratoire. Le déficit en CoQ est secondaire et pourrait être dû à un rétro-contrôle négatif de sa synthèse du fait d'un déficit en ETFDH (Gempel et al., 2007). Gempel et al. ont observé chez tous leurs patients une nette régression de l'atteinte musculaire sous traitement associant du coQ et de la riboflavin (Gempel et al., 2007).

*Le clonage positionnel et la stratégie de  
cartographie par homozygotie*

#### **IV. Le clonage positionnel et la stratégie de cartographie par homozygotie**

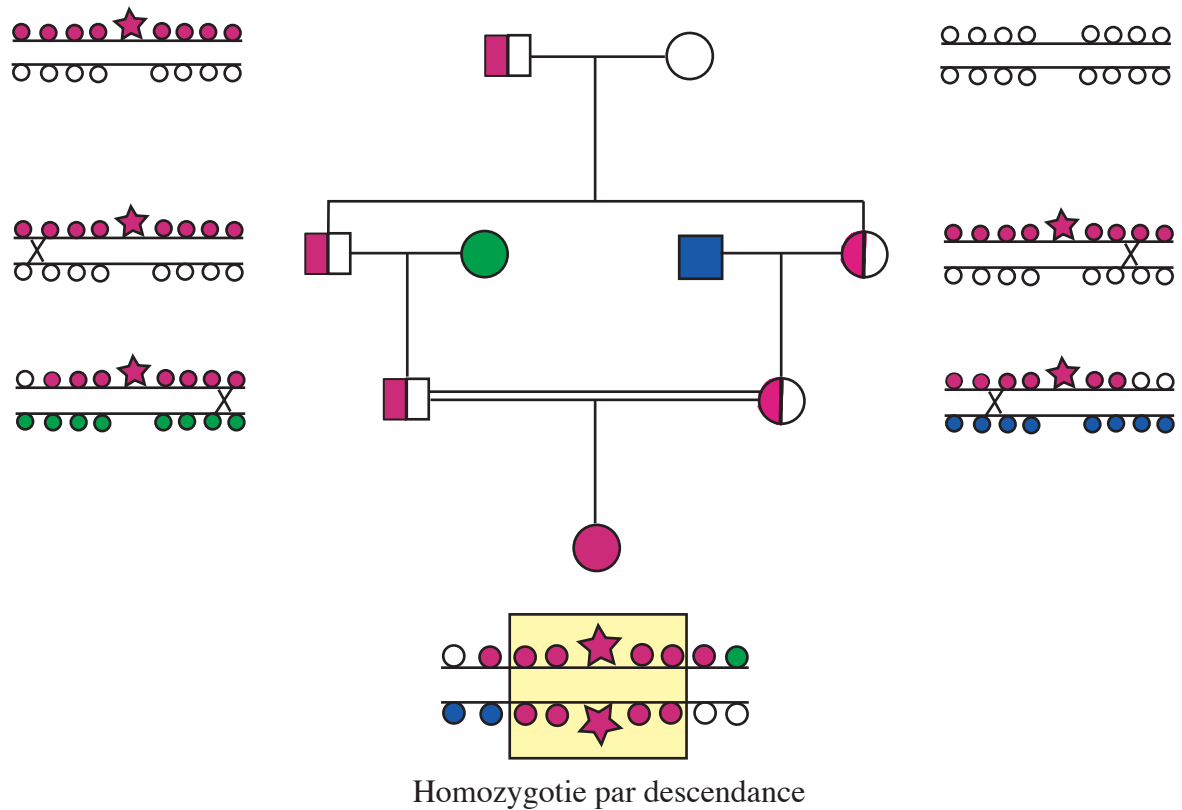
Deux approches distinctes peuvent être utilisées pour l'identification du gène responsable d'une maladie de transmission mendélienne : le clonage fonctionnel (Gitschier et al., 1984) et le clonage positionnel (Collins, 1992; Royer-Pokora et al., 1986).

Le *clonage fonctionnel* est basé sur la connaissance préalable du déficit biochimique en cause dans la maladie étudiée. Plusieurs techniques permettent alors de cloner le gène à partir de la protéine déficiente. Une variante de cette méthode appelée « étude de gènes candidats » consiste à directement rechercher des mutations dans des gènes dont la perte de fonction pourrait expliquer le spectre clinique de la maladie. Un gène peut par exemple être un bon candidat s'il est muté dans un modèle animal présentant un phénotype compatible avec la maladie étudiée. Cette approche peut par exemple être réalisée dans le cas des déficit en coenzyme Q<sub>10</sub>, par un séquençage direct chez les patients des gènes codants pour des protéines impliquées dans la voie de biosynthèse du CoQ.

Cependant, les données physiopathologiques et les modèles animaux ne sont pas toujours disponibles. L'alternative du *clonage positionnel* s'est donc imposée pour de nombreuses maladies héréditaires et en particulier pour l'identification des gènes responsables d'ataxie. Le clonage positionnel permet d'identifier un gène sans connaître la protéine pour laquelle il code (Collins, 1992), par opposition au clonage fonctionnel qui identifie au préalable le défaut biochimique. Cette approche permet de déterminer la localisation chromosomique du gène muté par analyse de liaison entre des marqueurs polymorphiques et la maladie. En effet, plus deux loci sont éloignés sur un même chromosome, plus la probabilité de recombinaisons méiotiques entre ceux-ci est importante. Des loci physiquement proches sur un chromosome vont donc avoir tendance à être transmis ensemble plutôt que séparément. Le taux de recombinaisons méiotiques entre un marqueur et le locus de la maladie permet donc d'évaluer la distance génétique qui les sépare (1cM correspond à 1 % de recombinaison pour de petites distances) (Ott, 1991). Si un marqueur polymorphique est proche du locus morbide, les mêmes allèles de ce marqueur seront partagés par les individus atteints d'une famille et non par les individus sains. L'analyse de

marqueurs polymorphiques chez les différents individus d'une famille permet donc de déterminer quels marqueurs co-ségrégent avec la maladie. Cependant cette co-ségrégation peut survenir par hasard et la liaison d'un locus à une maladie n'est prouvée que si le nombre de méioses étudiées est suffisamment grand, en d'autres termes, si le nombre d'individus testés permet d'obtenir un risque de liaison au hasard inférieur à 1 : 20 ( $p < 0.05$ ). Ce risque est évalué par un test statistique appelé Lod score (logarithm of the odds ratio for linkage) (Morton, 1955). Le clonage positionnel a permis ces 20 dernières années d'identifier un grand nombre de gènes responsables de maladies héréditaires qui n'auraient pu être identifiés par clonage fonctionnel car aucune piste physiopathologique n'était disponible. Ainsi, au sein du laboratoire, au moins 5 gènes dont les gènes de l'ataxie de Friedreich, de la neuropathie à axones géants, des ataxies avec apraxie oculomotrice de type 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 (Bomont et al., 2000 ; Campuzano et al., 1996 ; Moreira et al., 2001b ; Moreira et al., 2004; Ouahchi et al., 1995 ).

Une variante de cette stratégie, la *cartographie par homozygotie*, a été proposée afin d'identifier les gènes de maladies autosomiques récessives rares, où l'analyse de liaison est limitée par le petit nombre de familles disponibles (Ben Hamida et al., 1993a; Lander and Botstein, 1987 ). Cette méthode est basée sur l'étude de liaison de marqueurs polymorphiques dans des familles consanguines. Elle s'appuie sur l'hypothèse selon laquelle chez un enfant atteint d'une maladie rare et dont les parents sont consanguins, les deux allèles mutés du gène proviennent d'un ancêtre commun. En effet, en raison de la fréquence des mutations dans la population, la probabilité que cet enfant soit homozygote pour une mutation héritée d'un ancêtre commun est bien plus élevée que la probabilité d'avoir hérité deux mutations différentes. Du fait des différents évènements de recombinaison méiotique, les patients sont homozygotes par descendance non seulement pour le locus morbide mais aussi pour toute une région chromosomique autour de ce locus (Figure 14). Cependant, dans une famille consanguine, une homozygotie par descendance peut également être retrouvée dans une région chromosomique non liée à la maladie. En fonction du degré de consanguinité de ses parents, le nombre de régions homozygotes observées chez un individu sera plus ou moins important. L'étude par génotypage de marqueurs polymorphiques sur l'ensemble du génome doit donc être réalisée dans de grandes



**Figure 14: Principe de la cartographie par homozygotie.**

Un patient atteint d'une maladie génétique rare et issu de parents consanguins a probablement hérité sur ses deux chromosomes d'une mutation (étoile rose) présente à l'état hétérozygote chez un ancêtre commun de ses parents (arrière grand-père sur ce schéma).

Les marqueurs polymorphiques localisés dans la région chromosomique autour du gène sont représentés par des ronds de couleurs différentes en fonction des allèles. Du fait des différents événements de recombinaisons méiotiques (représentées par des croix), les allèles des marqueurs proches du gène muté sont également hérités de l'arrière grand père et sont donc à l'état homozygote chez le patient. Ils définissent une région d'homozygotie par descendance (en jaune).

familles avec plusieurs enfants atteints, afin d'identifier la ou les régions d'homozygotie communes à tous les enfants atteints. Idéalement, l'identification d'une région commune unique permettra d'établir la liaison entre la maladie et ce locus.

Afin de localiser les gènes responsables du syndrome de Marinesco-Sjögren et d'une nouvelle forme d'ataxie récessive, j'ai utilisé cette stratégie de cartographie par homozygotie qui comporte quatre étapes distinctes :

- La *première étape* est une étude « pangénome » par génotypage de marqueurs polymorphiques présents sur l'ensemble du génome dans une grande famille consanguine afin d'identifier la ou les régions d'homozygotie communes à tous les individus atteints et pour lesquelles les individus sains sont hétérozygotes. En ce qui concerne le projet sur le syndrome de MS, cette étape a été réalisée par le Centre National de Génotypage (CNG, Evry), à l'aide du kit ABI Prism Linkage Mapping set permettant le génotypage de 400 microsatellites. Dans un second temps, j'ai participé à la mise en place au sein du laboratoire de la technique de génotypage pangénome à l'aide de puces Affymétrie permettant l'étude d'au moins 10 000 SNP (Single Nucleotide Polymorphisms). La localisation du gène impliqué dans une nouvelle forme d'ataxie a donc été réalisée en utilisant cette technique.
- La *deuxième étape* consiste à confirmer ou exclure l'homozygotie par descendance et éventuellement à réduire l'intervalle critique. En effet, lorsque l'étude pangénome est réalisée à l'aide des microsatellites, il est nécessaire de génotyper de nouveaux marqueurs dans les régions identifiées lors de la première étape, afin de confirmer ou d'exclure l'homozygotie par descendance. Lorsque l'étude pangénome a été réalisée en utilisant des puces uniquement chez les individus atteints, l'étude par génotypage de microsatellites des individus sains de la famille peut également permettre de réduire l'intervalle critique.
- La *troisième étape* essaie d'identifier de nouvelles familles, souvent plus petites, potentiellement liées au même locus. Au cours de ma thèse, nous avons dans un premier

temps réalisé cette étape par le génotypage de marqueurs microsatellites sélectionnés dans la (ou les) régions identifiée(s) lors de la première étape. Cependant, depuis la mise en place au laboratoire de la technique de génotypage de SNP, nous avons entrepris la constitution d'une banque de données pour l'ensemble des patients atteints d'ataxie et dont les parents sont consanguins. Ces données nous permettent d'identifier les différentes familles qui sont homozygotes au niveau d'un même locus.

- La *quatrième étape* correspond à la recherche de mutations chez les patients dans les gènes de la région afin d'identifier le gène responsable de la maladie.

Deux types de marqueurs polymorphiques ont donc été utilisés au cours de cette étude : les microsatellites et les SNP. Je présente ci-dessous les caractéristiques de ces deux approches.

Les *microsatellites* sont des répétitions en tandem de motifs de 2 à 6 nucléotides, présents sur l'ensemble du génome. Les répétitions les plus fréquentes sont les dinucléotides CA. Par un probable mécanisme de dérapage de la polymérase lors de la réplication, ces séquences ont une tendance relativement fréquente à muter ( $10^{-6}$  à  $10^{-2}$  par génération) (Schlotterer, 2000). Le nombre de répétitions diffère donc d'un individu à l'autre et d'un chromosome homologue à l'autre chez un même individu, définissant le caractère polymorphique de ce type de marqueur. L'informativité d'un marqueur est directement corrélée à son taux d'hétérozygotie dans la population. La transmission au sein d'une famille est mendélienne, et l'étude de la ségrégation des allèles dans une famille est possible grâce à une amplification de la séquence répétée par PCR avec des amorces spécifiques l'encadrant. L'électrophorèse des produits PCR sur un gel d'acrylamide dénaturant permet de discriminer des variations de taille de 2 nucléotides. Chaque allèle est défini par la taille du fragment amplifié, illustrant le nombre de répétitions.

Une carte génétique du génome humain organisant 5264 microsatellites a été publiée en 1996 par Dib C et al. (Dib et al., 1996). Celle-ci a été établie grâce à l'étude par le Génethon de huit grandes familles d'origine caucasienne (familles du CEPH, Centre d'Etude des Polymorphismes Humains). Les marqueurs sont ordonnés les uns par rapport aux autres en fonction de leur taux de recombinaison. L'intervalle moyen entre deux marqueurs est de 1.6 cM permettant de couvrir l'ensemble du génome humain.



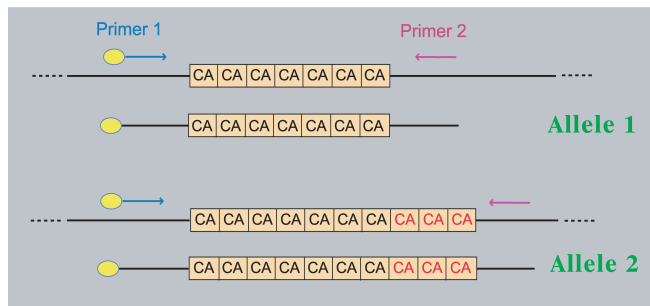
Le kit ABI Prism Linkage Mapping Set (Version 2) utilisé lors du projet sur le syndrome de Marinesco-Sjögren comprend 400 couples d'amorces fluorescentes, permettant l'amplification de microsatellites hautement informatifs, sélectionnés dans la carte du Généthron (Dib, 1996). Le taux moyen d'hétérozygotie est de 76%, donc l'informativité de chaque marqueur est élevée, cependant l'intervalle entre chaque marqueur est important (en moyenne 5.6Mb) et il existe un risque de ne pas identifier une petite région d'homozygotie pouvant contenir le gène muté (Figure 15).

Afin de réaliser le génotypage de microsatellites localisés dans les régions chromosomiques sélectionnées lors de la première étape, nous avons mis en place au laboratoire une méthode permettant d'utiliser une même amorce dite "universelle" marquée avec un fluorophore pour l'amplification de n'importe quel microsatellite (Lagier-Tourenne et al., 2003). Dans cette technique, trois amorces sont utilisées dans la même réaction de PCR : l'amorce universelle (Com), une des deux amorces spécifiques à laquelle a été ajoutée en 5' une queue complémentaire de l'amorce universelle (Spe2+com), et la deuxième amorce spécifique (Spe1). Lors des premiers cycles de la PCR, une amplification spécifique du microsatellite a lieu grâce aux amorces Spe1 et Spe2+com. Puis, du fait d'un ratio de 10 :1 entre l'amorce Com et Spe2+com, cette dernière est épuisée et l'amplification se fait avec les amorces Spe1 et Com, en prenant comme matrice les premières amplifications (Figure 16). L'amorce universelle a pour séquence : TAC GCA TCC CAG TTT GAG ACG (Warner et al., 1996). Afin de tester plusieurs microsatellites en même temps, elle a été marquée par 3 types de fluorophores (FAM, bleu ; TET, vert ; NED, jaune).

Les *SNP* ou *Single Nucleotide Polymorphisms* sont des modifications d'une paire de base le plus souvent caractérisées par deux allèles au sein de la population. Ils sont présents en très grand nombre (plusieurs millions) sur l'ensemble du génome (Sachidanandam et al., 2001). Le taux d'hétérozygotie de chaque SNP est faible, cependant les technologies d'hybridation sur puce permettent de génotyper de très nombreux SNP chez un même individu et donc d'augmenter l'informativité et de réduire les régions chromosomiques non explorées. Au cours de cette étude nous avons utilisé des puces GeneChip Human Mapping 10K 2.0 Xba d'Affymetrix permettant le génotypage de 10 000 SNP avec un espace moyen entre 2 marqueurs de 258 Kb (Figure 15) (Matsuzaki et al., 2004). Les nouvelles générations de puces permettent d'obtenir un

### Kit ABI PRISM Linkage Mapping Set

- 400 marqueurs microsatellites
- Amplification par des amorces fluorescentes.
- Espace moyen entre 2 marqueurs 5.6 Mb
- Marqueurs multialléliques: taux d'hétérozygotie 76 %



### Puce GeneChip Human Mapping 10K (Affymetrix)

- 10 000 SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms)
- Hybridation allèle spécifique
- Espace moyen entre 2 marqueurs 258 Kb
- Marqueurs bialléliques: taux d'hétérozygotie 38%

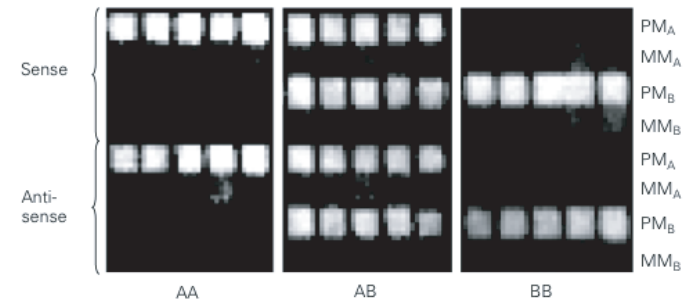
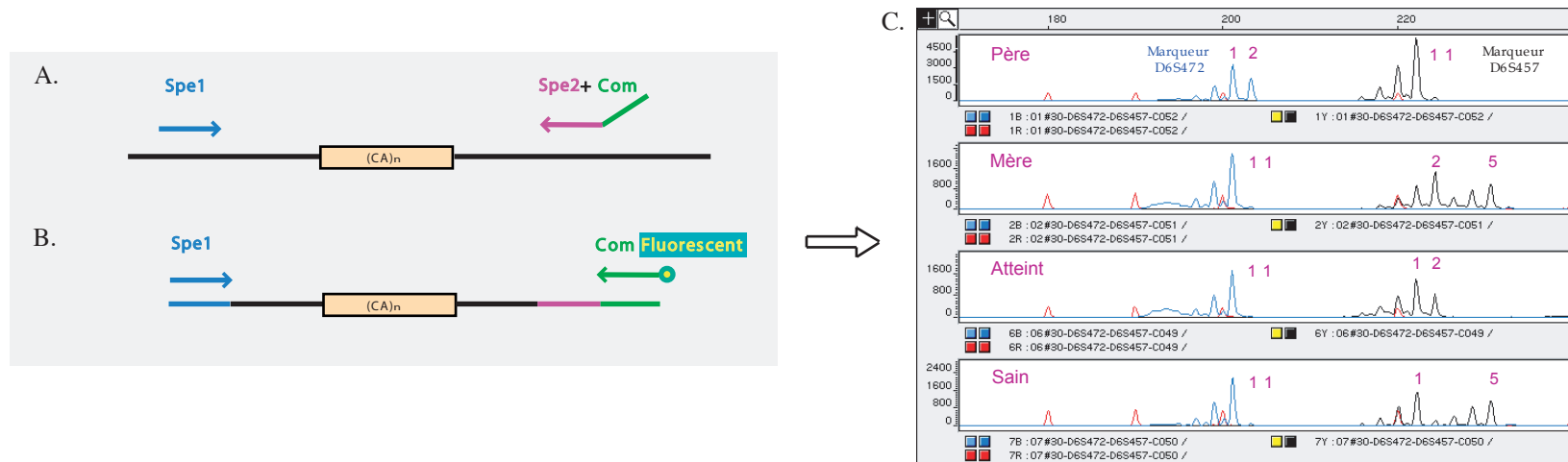


Figure 15: Comparaison des deux technologies utilisées pour l'étude pangéome



**Figure 16: Méthode de génotypage de marqueurs microsatellites à l'aide d'une amorce universelle**

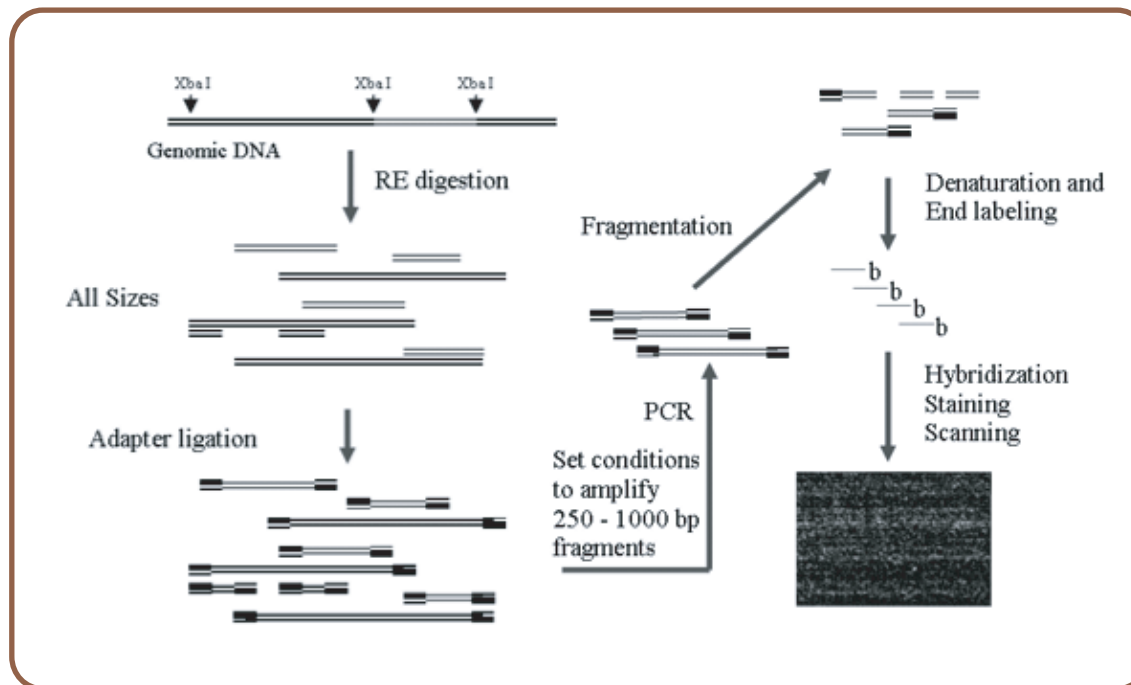
A. Premiers cycles de la PCR utilisant les amorces spécifiques Spe1 et Spe2 à laquelle est ajoutée la séquence complémentaire de l'amorce universelle Com (Spe2+Com).

B. Epuisement de l'amorce Spe2+Com utilisée en faible concentration et amplification avec l'amorce Com fluorescente utilisant comme matrice les fragments amplifiés lors des premiers cycles.

C. Electrophorégramme après migration sur séquenceur de deux marqueurs microsatellites marqués par des fluorochromes différents. Génotypage en fonction de la taille des allèles. Le marqueur de taille correspond aux pics rouges et l'échelle de taille est indiquée en haut

nombre de génotypage toujours plus important et par exemple nous avons également utilisé des puces 50K contenant environ 50 000 SNP.

Les puces de génotypages sont basées sur un principe d'hybridation allèle spécifique (Kennedy et al., 2003). Pour chaque SNP biallélique, des sondes oligonucléotidiques de 25 pb, spécifiques de chacun des 2 allèles, sont fixées sur la puce. L'ADN génomique est amplifié à l'aide d'une amorce universelle après avoir subi une digestion enzymatique et la ligation d'une séquence homologue de l'amorce universelle (Figure 17). L'ADN amplifié correspond à des fragments Xba d'environ 250 à 1000 pb dans lesquels ont été choisis les SNP présents sur la puce. Après une fragmentation et un marquage, l'ADN amplifié est hybridé sur la puce. La détermination du génotype est réalisée à partir de l'intensité d'hybridation au niveau de chaque oligonucléotide spécifique d'un allèle. Chez un individu homozygote pour l'allèle A, seules les sondes spécifiques de cet allèle seront hybridées, et inversement chez un homozygote pour l'allèle B, alors qu'une hybridation sera retrouvée sur les deux types de sondes chez un individu hétérozygote AB (Figure 15). Le génotype de chaque SNP est déterminé par le logiciel fourni par Affymetrix (GeneChip DNA Analysis Software, GDAS, ou plus récemment le GeneChip Genotyping Analysis Software, GTYPE). Les génotypes peuvent être organisés en fonction de la localisation chromosomique de chaque SNP, et les haplotypes de plusieurs individus peuvent donc être comparés. La comparaison manuelle à la recherche de régions d'homozygotie est possible mais laborieuse. Certaines équipes utilisent un logiciel d'analyse de LOD score pour définir les régions potentiellement liées à la maladie dans une famille. Cependant dans le laboratoire nous utilisons essentiellement la stratégie de cartographie par homozygotie, et afin de pouvoir visualiser et comparer facilement les régions d'homozygotie entre différentes familles, Frédéric Plewniak a développé au sein de l'institut un logiciel appelé homoSNP. L'utilisation de ce logiciel nous permet également de ne pas réaliser, au moins en première intention, l'étude pangénome sur les parents et les frères et sœurs sains. Ce logiciel correspond à une interface graphique permettant de visualiser les régions pour lesquelles un nombre défini de SNP consécutifs sont homozygotes (Figure 18). Les régions homozygotes sont représentées en mauve, bleu clair et bleu selon le nombre de SNPs consécutifs homozygotes. Pour une puce 10K, ces couleurs correspondent respectivement à un nombre de SNPs de [15,20[, [20,25[, [25,...[, et pour une puce 50k à [20,25[, [25,30[, [30,...[. Ce logiciel permet de localiser les gènes déjà connus pour une maladie et nous avons par exemple constitué une base donnée avec l'ensemble des



**Figure 17: Etapes expérimentales de l'étude pangéome par puces de génotypage Affymetrix**  
 250 ng d'ADN génomique sont digérés avec une enzyme de restriction; un adaptateur est ligé aux fragments; une PCR avec une amorce complémentaire de l'adaptateur amplifie préférentiellement des fragments d'environ 250 à 1000 pb; l'ADN amplifié est fragmenté; puis marqué et hybridé sur la puce. D'après GeneChip® Mapping 10K 2.0 Assay Manual, Affymetrix.



**Figure 18: HomoSNP, une nouvelle interface graphique pour comparer les résultats de puces de génotypage obtenus chez différents individus.**

Les résultats de puces 10K (Affymetrix) réalisées chez 5 frères et soeurs issus de parents consanguins sont présentés pour certains chromosomes.

Les régions d'homozygotie sont représentées en bleu (plus de 25 SNPs consécutifs homozygotes), violet (entre 20 et 24 SNPs consécutifs homozygotes) ou en rose (entre 15 et 19 SNPs consécutifs homozygotes). Les régions d'hétérozygotie (moins de 15 SNP consécutifs homozygotes) sont en vert.

La localisation de certains gènes d'ataxies autosomiques récessives est représentée par les barres verticales oranges. Seule une région d'homozygotie est commune aux 4 individus atteints et hétérozygote chez leur frère sain sur le chromosome 1qter.

gènes et loci d'ataxie autosomique récessive connus. La présence d'un tel gène dans une région d'homozygotie doit directement orienter l'analyse moléculaire à la recherche d'une mutation dans ce gène. Cette approche est donc également une aide diagnostic et permet de ne pas entreprendre de longues études de liaison dans des familles pour lesquelles le gène muté est déjà identifié. Je ne décrirai pas ces résultats dans le cadre de cette thèse, mais notre expérience a permis de montrer l'efficacité d'une telle approche dans un cadre diagnostic, même chez un cas sporadique, pour différentes maladies génétiquement hétérogènes, dont les dystrophies musculaires.

## *Résultats*



## *Le syndrome de Marinesco-Sjögren*

## V. Résultats

### A. Le syndrome de Marinesco-Sjögren

#### Manuscrit 1 :

*Linkage to 18qter differentiates two clinically overlapping syndromes : Congenital Cataracts Facial Dysmorphism Neuropathy and Marinesco-Sjögren syndromes.*

Lagier-Tourenne Clotilde, Chaigne Denys, Gong Ji, Flori Jean, Mohr Michel, Ruh Danielle, Christmann Dominique, Flament Jacques, Mandel Jean-Louis, Koenig Michel, Dollfus Hélène.  
*Journal of Medical Genetics.* 2002 Nov; 39(11) :838-43

#### Manuscrit 2 :

*Homozygosity mapping of Marinesco-Sjögren syndrome to 5q31.*

Lagier-Tourenne Clotilde, Tranebjaerg Lisbeth, Chaigne Denys, Gribaa Moez, Dollfus Hélène, Silvestri Gabriela, Bétard Christine, Warter Jean-Marie, Koenig Michel.  
*European Journal of Human Genetics.* 2003 Oct; 11(10):770-8

#### Manuscrit 3 :

*The gene disrupted in Marinesco-Sjögren syndrome encodes SIL1, an HSPA5 co-chaperone*

Anttonen Anna-Kaisa , Mahjneh Ibrahim, Hämäläinen Riikka H., Lagier-Tourenne Clotilde, Kopra Outi, Waris Laura, Anttonen Mikko, Joensuu Tarja, Kalimo Hannu, Paetau Anders, Tranebjaerg Lisbeth, Chaigne Denys, Koenig Michel, Eeg-Olofsson Orvar, Udd Bjarne, Somer Mirja, Somer Hannu, Lehesjoki Anna-Elina.  
*Nature Genetics.* 2005 Dec; 37(12):1309-11.

## 1. Analyse de liaison

### a. Le syndrome de MS et le syndrome CCFDN sont deux entités génétiquement distinctes

A mon arrivée au sein du laboratoire, aucun locus n'était connu pour le syndrome de Marinesco-Sjögren. Cependant, Merlini et al. venaient de proposer l'existence d'une homogénéité génétique entre le syndrome de MS et le syndrome CCFDN (Merlini et al., 2002). En effet, ils avaient montré que des familles d'origine tzigane dans lesquelles les patients présentaient une forme particulière de MS associée à des épisodes de rhabdomyolyse, étaient liées en 18qter où le gène du syndrome CCFDN avait été localisé.

J'ai donc réalisé une analyse de liaison au locus 18qter dans deux familles consanguines, respectivement d'origine turque et d'origine tzigane (Manuscript 1).

Les deux patients de la famille d'origine turque présentaient un tableau clinique typique du syndrome de MS avec une hypotonie, une ataxie dès les premiers mois de vie avec atrophie cérébelleuse (Manuscrit 1, Figure 2), un retard de croissance global, un retard des acquisitions, des déformations squelettiques, un hypogonadisme hypergonadotrope et l'apparition d'une cataracte bilatérale à 4 et 6 ans. De plus, ces patients avaient développé une myopathie avec des CPK légèrement augmentées et des anomalies à la biopsie musculaire caractérisées par la présence de vacuoles bordées et de structures membranaires denses périnucléaires identiques aux structures décrites par Sewry et al. (Sewry et al., 1988) (Manuscrit 1, Figure 3).

Les trois patients de la famille d'origine tzigane avaient initialement été diagnostiqués comme atteints d'un syndrome de MS atypique. En effet, ils présentaient tous les trois un syndrome associant une cataracte congénitale bilatérale, un retard psychomoteur et statur pondéral, une ataxie et des déformations squelettiques majeures. Cependant, l'origine ethnique, ainsi que la présence d'une neuropathie périphérique démyélinisante et d'une microcornée (Manuscrit 1, Figure 4), et l'absence d'atrophie cérébelleuse majeure à l'IRM (Manuscrit 1, Figure 2) étaient compatibles avec un syndrome CCFDN.

J'ai testé quatre marqueurs microsatellites de la région 18qter (D18S1122, D18S1141, D18S1390 et D18S70) pour chaque individu de ces deux familles. L'analyse a été effectuée par un marquage radioactif d'une des amorces et une révélation par autoradiographie.

Les deux patients de la famille d'origine turque ne présentent pas d'homozygotie par descendance au locus 18qter (Manuscrit 1, Figure 1). De plus, ils n'ont pas hérité des mêmes haplotypes, et ils partagent respectivement les mêmes haplotypes que leurs frères sains II.7 et II.1 excluant une liaison à ce locus. L'atteinte des patients de la famille MS1 est donc distincte des syndromes CCFDN et Marinesco-Sjögren/rhabdomyolyse liés à la région 18qter.

Au contraire, les 3 patients de la famille d'origine tzigane sont homozygotes pour les 4 marqueurs consécutifs de la région, et les trois enfants sains sont hétérozygotes pour cet haplotype. Le calcul du LOD score, donne une valeur maximale de 2.57 à  $\theta = 0$  pour une liaison à l'haplotype D18S1122-D18S70 (fréquence de l'haplotype estimée à 0.05). La liaison de la famille MS2 au locus du CCFDN est donc prouvée (Ott, 1991). L'étude moléculaire permet donc de corriger le diagnostic initial de syndrome de Marinesco-Sjögren dans cette famille et d'attribuer les signes cliniques des patients au syndrome CCFDN.

L'observation d'une famille, avec un syndrome de MS typique, non liée au locus du CCFDN nous a permis d'exclure l'hypothèse d'homogénéité génétique entre ces deux syndromes.

### **b. Identification du locus du MS en 5q31**

Nous avons utilisé une stratégie de cartographie par homozygotie afin d'identifier le locus du MS.

La *première étape* qui correspond à l'étude pangénome dans une famille consanguine a été réalisée au CNG où environ 400 marqueurs microsatellites ont été génotypés chez tous les individus de la famille d'origine turque précédemment décrite. L'analyse des résultats a mis en évidence quatre régions compatibles avec une homozygotie par descendance. En effet, les microsatellites D5S407 en 5q11.2, D5S2115 et D5S436 en 5q31, D7S484 en 7p14.2, et D20S119 en 20q13.1 étaient homozygotes chez les deux atteints et hétérozygotes chez les trois enfants sains.

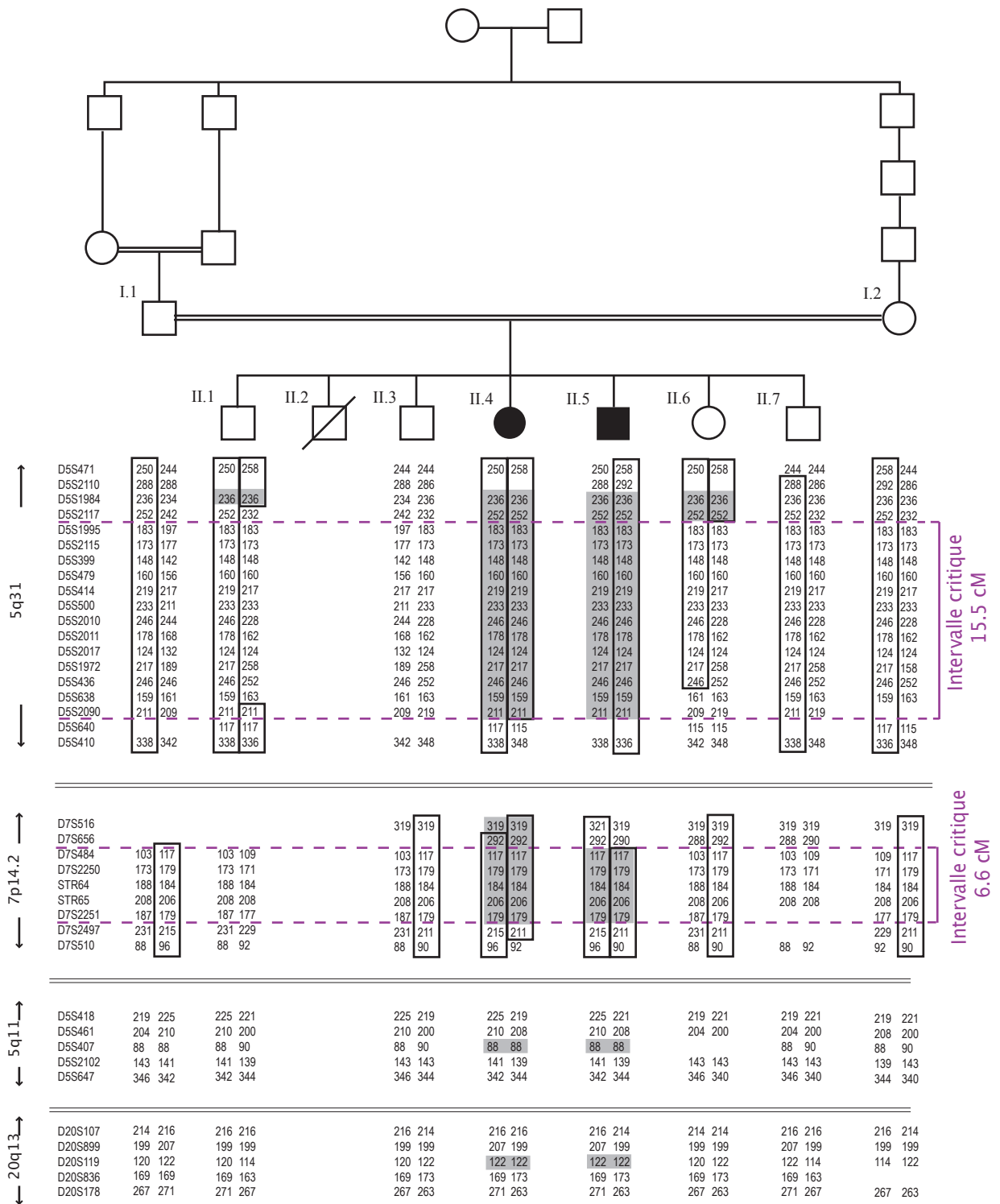
La *deuxième étape* de cette stratégie consiste à vérifier l'existence d'une réelle homozygotie par descendance au niveau des régions sélectionnées par l'étude pangéome. En effet, l'homozygotie observée pouvant être due au hasard, nous avons déterminé le génotype de plusieurs marqueurs dans chacune de ces régions. Les microsatellites encadrant D5S407 et D20S119 étant hétérozygotes chez les enfants atteints, l'homozygotie par descendance a été exclue en 5q11.2 et en 20q13.1. Au contraire, l'homozygotie par descendance a été confirmée en 5q31 et 7p14.2, où respectivement 15 et 5 marqueurs consécutifs étaient homozygotes chez les individus atteints, définissant des régions critiques de 15.5 cM et 6.6 cM (Figure 19). A ce stade de l'étude nous ne pouvions pas conclure laquelle de ces deux régions était liée à la maladie et laquelle correspondait à une homozygotie due au hasard. C'est l'étude de nouvelles familles qui nous a permis de déterminer le locus du syndrome de MS.

La *troisième étape* de cette stratégie correspond à l'étude de nouvelles familles en génotypant des marqueurs localisés au niveau des régions sélectionnées.

Le génotypage de microsatellites dans une grande famille consanguine d'origine norvégienne pour laquelle le Dr Tranebjaerg venait de nous envoyer des échantillons, a permis d'exclure la liaison entre le syndrome de MS et le chromosome 7 et a confirmé la localisation du gène du MS en 5q31. En effet, au locus 5q31, les 6 patients étaient homozygotes pour au moins 8 marqueurs consécutifs et le frère sain était hétérozygote pour 7 de ces marqueurs. Les marqueurs recombinants, D5S1995 du côté centromérique et D5S436 du côté télomérique, définissent un intervalle de liaison de 9.9 cM inclus dans la région définie par la famille d'origine turque (Manuscrit 2, Figure 2). Le calcul du LOD score donne une valeur de 2.9 et 5.6 respectivement pour les familles d'origine turque et norvégienne, indiquant une liaison entre la maladie et le locus 5q31 (Manuscrit 2).

La ségrégation au locus 5q31 était également compatible avec une liaison dans deux familles norvégiennes de petite taille (Manuscrit 2, Figure 3). Cependant, nous n'avons pas observé d'haplotype commun aux trois familles norvégiennes, ce qui aurait été en faveur d'un effet fondateur avec un déséquilibre de liaison entre cet haplotype et l'allèle muté du gène responsable de la maladie.

De plus, nous avons étudié une patiente présentant un syndrome de MS typique, fille unique d'un couple ne décrivant pas de consanguinité, mais issus d'un même village dans les



**Figure 19: Analyse de liaison en 5q31, 7p14.2, 5q11, 20q13 dans une famille consanguine avec un syndrome de Marinesco-Sjögren.**  
 Les marqueurs microsatellites génotypés dans chaque région sont indiqués sur la gauche et organisés du centromère vers le télomère.  
 Les enfants atteints sont homozygotes pour 15 marqueurs consécutifs en 5q31 et 5 marqueurs en 7p14.2 (régions grisées), définissant respectivement des intervalles critiques de 15.5 cM et 6.6 cM.  
 Les haplotypes parentaux partagés par les deux enfants atteints sont encadrés.  
 Les marqueurs proches des microsatellites D5S407 et D20S119 sont hétérozygotes excluant une homozygotie par descendance en 5q11 et 20q13.

Vosges. Le génotypage de microsatellites au locus 5q31 a retrouvé une homozygotie par descendance compatible avec une liaison à ce locus et à une consanguinité ancienne des parents (Manuscrit 3, Supplementary Figure 2, Famille M16).

Après la publication du Manuscrit 2, nous avons entrepris une collaboration avec l'équipe du Pr Lehesjoki à Helsinki. En effet, son équipe venait d'identifier de nouvelles familles liées au locus 5q31. Le génotypage de marqueurs localisés en 5q31 dans 4 familles d'origine finlandaise leur avait permis d'identifier un haplotype commun présent à l'état homozygote chez tous les patients, évocant un effet fondateur (Manuscrit 3, Supplementary Figure 2, Familles M1, M4, M5, M6). De plus, l'étude d'une famille d'origine suédoise avec deux enfants atteints retrouvait deux marqueurs microsatellites consécutifs dont les allèles étaient identiques à ceux retrouvés dans l'haplotype finlandais (Manuscrit 3, Supplementary Figure 2, Famille M2). L'hypothèse a été faite que les enfants suédois avaient hérité à l'état homozygote de la même mutation que les patients finlandais, ce qui permettait de réduire l'intervalle critique contenant le gène du MS à 1.98 Mb entre les marqueurs D5S500 et D5S2116 contenant 23 gènes annotés.

## **2. Le gène *SILI* est muté dans le syndrome de MS**

### **a. Mutations dans le gène *SILI***

La *quatrième étape* de la stratégie par homozygotie correspond au séquençage chez les individus atteints, des gènes localisés dans l'intervalle critique déterminé par l'étude de liaison.

L'équipe d'Anna-Elina Lehesjoki a identifié chez tous les patients finlandais une duplication homozygote de 4 pb dans l'exon 6 du gène *SILI* (MIM 608005) compris dans l'intervalle de 1.98 Mb (Manuscrit 3, Tableau 1, Familles M1, M4, M5, M6). La famille norvégienne qui avait permis l'identification du locus est également homozygote pour cette duplication (506\_509dupAAGA) illustrant un effet fondateur commun aux familles finlandaises et norvégienne (Manuscrit 3, Tableau 1, Famille M12). Les patients issus de la famille d'origine turque sont homozygotes pour une mutation troncante (R111X), et la patiente française est homozygote pour une duplication d'une paire de bases (212dupA) (Manuscrit 3, Tableau 1, Familles M11 et M16). Il faut noter que les patients de la famille suédoise ayant servi à réduire

l'intervalle critique à 1.98 Mb, ne sont pas, comme attendu, homozygotes pour la duplication de 4 pb fondatrice chez les finlandais et norvégiens. Ils sont hétérozygotes composites pour cette duplication et une mutation d'épissage (645+2T>C) (Manuscrit 3, Tableau 1, Famille M2). Cette mutation est responsable de la production de deux variants d'épissage entraînant respectivement une délétion de 30 et 64 acides aminés (Manuscrit 3, Figure 1). Il s'avère donc que la réduction de l'intervalle critique basé sur cette famille n'était pas tout à fait juste, mais n'a pas empêché l'identification rapide du gène.

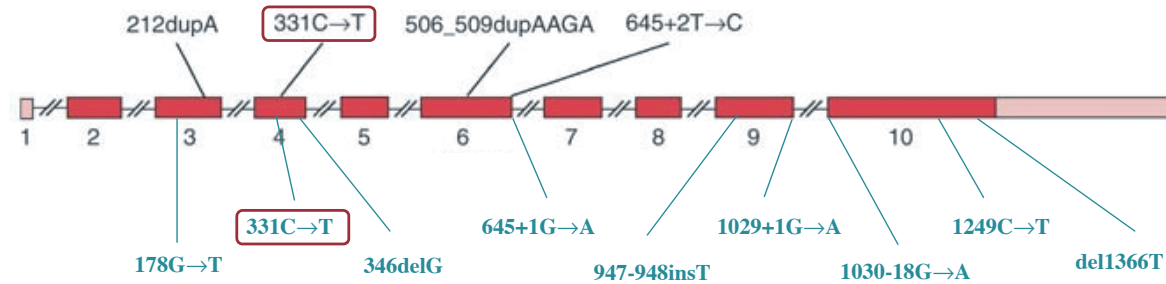
Il faut préciser que Senderek et al. ont également identifié des mutations dans le gène *SIL1* chez 11 patients issus de 8 familles de diverses origines géographiques (Senderek et al., 2005). Grâce à l'étude de marqueurs microsatellites dans 3 petites familles consanguines, ils avaient préalablement réduit à 2.8 Mb l'intervalle que nous avons défini en 5q31. Puis ils ont identifié 9 mutations pour lesquelles la formation d'une protéine tronquée est prédite (Figure 20).

### **b. Fonctions de la protéine SIL1**

Le gène *SIL1* code pour une protéine de 461 acides aminés, avec un signal d'adressage vers le réticulum endoplasmique dans la partie N-terminale, et une séquence de rétention dans le réticulum endoplasmique en C-terminal. SIL1 est un facteur d'échange nucléotidique pour la protéine BiP (aussi appelée HSPA5 ou GRP78) qui est un membre de la famille des chaperones HSP70 (Chung et al., 2002). En effet, BiP a une activité ATPase dépendante qui est régulée par SIL1 laquelle induit la libération de l'ADP et la fixation d'un nouvel ATP sur BiP. BiP est une chaperone impliquée dans la stabilisation et le repliement des polypeptides nouvellement synthétisés, et dans le transport rétrograde à travers la membrane du réticulum endoplasmique des protéines aberrantes destinées à être dégradées (Gething, 1999). De plus, dans certaines conditions cellulaires, des protéines de conformation anormale saturent l'équipement cellulaire en chaperones et en protéines de dégradation et s'accumulent dans le réticulum endoplasmique induisant une situation de « stress du réticulum endoplasmique ». La réponse des cellules à ce stress (UPR, unfolded protein response), permet d'augmenter la transcription de gènes cibles impliqués dans la machinerie de dégradation, et d'inhiber profondément la traduction, limitant



Antonnen et al. 2005



Senderek et al. 2005

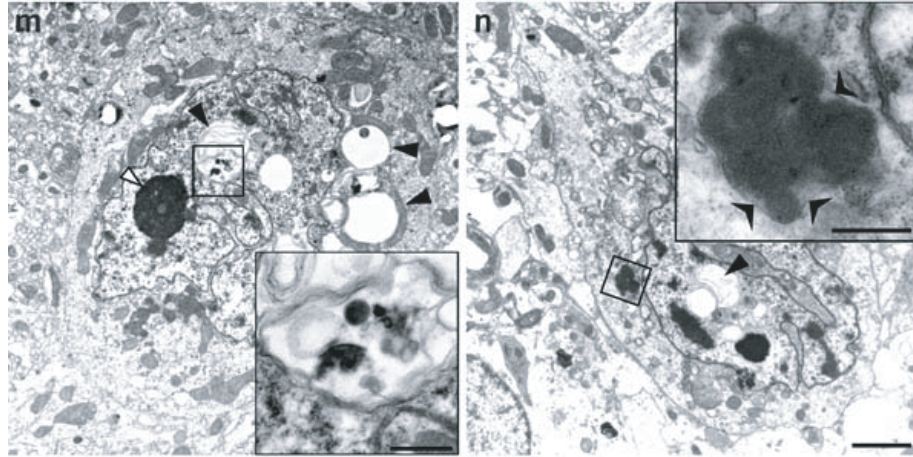
**Figure 20: Mutations du gène *SIL1***

Les mutations identifiés par Antonnen et al. (2005) (en noir) et Senderek et al. (2005) (en bleu) sont indiqués sur un schéma des 10 exons du gène *SIL1*. Seule la mutation 331C>T (R111X) est récurrente ayant été identifiée dans deux familles d'origine turque et une famille iranienne. Toutes les mutations identifiées sont tronquantes. Modifié d'après Antonnen et al. *Nature Genetics*, 2005.

ainsi l'arrivée de nouvelles protéines dans le RE. Cette réponse peut éventuellement aboutir à la mort cellulaire par activation de l'apoptose (Rao et al., 2004). Bip est impliquée dans la régulation de cette réponse UPR. En l'absence d'une situation de stress, BiP est fixée à son récepteur au niveau de la membrane du RE. En présence de nombreuses protéines de conformation anormale, BiP est séquestrée par ces protéines et libérée de son récepteur membranaire induisant l'activation de la réponse UPR (Zhang and Kaufman, 2004).

L'expression de *SIL1* est ubiquitaire, et l'équipe d'Anna-Elina Lehesjoki a montré une faible expression dans le cerveau (Manuscrit 3, Supplementary Figure 4). Je n'ai pas directement participé aux études fonctionnelles décrites dans le Manuscrit 3, qui ont permis de montrer une co-expression de SIL1 et BiP dans les différents tissus atteints dans le syndrome de Marinesco-Sjögren et en particulier dans les cellules de Purkinje (Manuscrit 3, Supplementary Figure 5). Le syndrome de Marinesco-Sjögren semble donc être dû indirectement à des anomalies de la fonction chaperonne de BiP, et ferait ainsi partie des maladies dues à des anomalies du repliement protéique secondaires à une dysfonction des chaperonnes moléculaires (Muchowski and Wacker, 2005).

Alors que le Manuscrit 3 était en préparation, Zhao et al. ont identifié une mutation spontanée dans *Sil1* chez les souris mutantes « wozy » qui développent une ataxie à l'âge adulte (Zhao et al., 2005). Il est intéressant de remarquer que ces souris présentent une dégénérescence des cellules de Purkinje avec des vacuoles autophagiques, des accumulations protéiques, et la présence de structures membranaires denses similaires à celles observées sur les biopsies musculaires des patients atteints d'un syndrome de MS (Figure 21). Le lien entre les souris « wozy » et le syndrome de MS n'a pas été fait par Zhao et al. (Zhao et al., 2005), et nous n'avons aucune donnée concernant la présence éventuelle d'une myopathie, ou d'une cataracte chez ces souris. L'étude de ce modèle devrait permettre une meilleure compréhension de la physiopathologie du syndrome de MS.



**Figure 21: Microscopie électronique des cellules de Purkinje des souris “woozy”**

Des vacuoles autophagiques sont indiquées par les flèches noires.

Une condensation de la chromatine est indiquée par une flèche blanche.

Des agrégats protéiques sont encadrés et agrandis dans les fenêtres sur le coté. Des structures membranaires entourent les agrégats protéiques et sont indiquées par les têtes de flèche noires.

D’après Zhao et al. *Nature Genetics*, 2005.

### 3. Corrélations génotype-phénotype

Les analyses de liaison dans des familles où les patients présentent un tableau associant une ataxie, un retard psychomoteur et une cataracte, ont montré que cette association correspondait à des syndromes distincts. Parmi les familles étudiées certaines étaient liées au syndrome de MS, d'autre au syndrome CCFDN, mais il est également important de noter que plusieurs familles n'étaient liées à aucun de ces deux syndromes. De nouveaux gènes responsables de cette association clinique restent donc à identifier.

La comparaison du tableau clinique des patients et des données de la littérature nous permet de mieux définir le spectre clinique de chacun des syndromes. En effet, une importante homogénéité clinique est observée parmi les patients porteurs de mutations du gène *SILI*, et il en est de même au sein des patients d'origine tzigane porteurs de la mutation fondatrice du gène *CTDPI*, responsable du CCFDN.

Il existe un chevauchement phénotypique entre ces deux syndromes incluant la présence d'une cataracte bilatérale, d'un nystagmus, d'un retard psychomoteur, d'une petite taille, d'une ataxie, de déformations squelettiques et d'un hypogonadisme. Cependant, les différences majeures entre ces deux affections sont la survenue d'une dysmorphie faciale, d'une microcornée, d'une neuropathie démyélinisante et de rares épisodes de rhabdomyolyse dans le syndrome CCFDN, et la présence d'une myopathie avec élévation des CPK et d'une atrophie cérébelleuse marquée avec une ataxie sévère dans le syndrome de MS (Manuscrit 1, Figure 2, Table 1).

La dysmorphie faciale décrite dans le syndrome CCFDN semble prédominer chez les hommes et s'accroître avec l'âge (Tournev et al., 1999a) (Figure 6). Ceci est retrouvé dans la famille que nous avons étudiée où le patient le plus âgé présente une dysmorphie alors que celle-ci n'est pas décrite chez ses sœurs atteintes. Aucune dysmorphie caractéristique n'est retrouvée dans le syndrome de MS.

Concernant les anomalies oculaires, la cataracte est congénitale dans le syndrome CCFDN. Dans le syndrome de MS cette cataracte a été décrite comme étant soit congénitale, soit se développant dans les premières années de vie avec une progression rapide (Alter and Kennedy, 1968 ; Ishikawa et al., 1993; Komiyama et al., 1989 ; Tachi et al., 1991 ). Il est intéressant de noter que tous les patients que nous avons décrits avec une mutation dans *SILI* ont développé une

cataracte uniquement dans les premières années de vie. Seuls deux patients décrits par Senderek et al. ont présenté une cataracte congénitale, les 9 autres patients ayant développé une cataracte entre 3 et 6 ans (Senderek et al., 2005). Contrairement au syndrome CCFDN où la présence d'une microcornée semble être un signe majeur et probablement un critère diagnostique (Manuscrit 1, Figure 4), aucune autre anomalie du développement oculaire n'est associée au syndrome de MS.

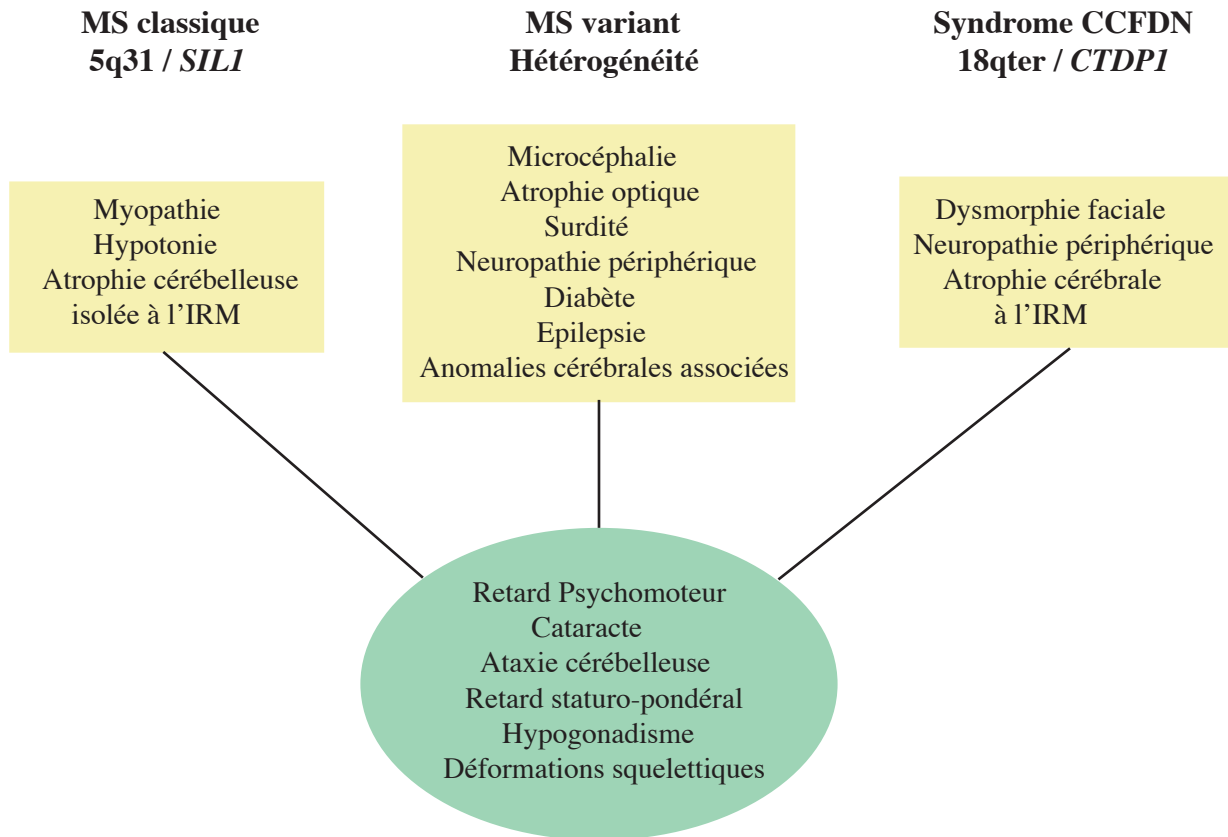
Une différence majeure entre les deux affections est leur symptomatologie musculaire. L'apparition progressive d'une faiblesse musculaire est un signe cardinal du syndrome de MS. Des modifications de type myopathique sont observées à la biopsie musculaire associées à la présence de vacuoles bordées et de structures membranaires dense en microscopie électronique, d'origine inconnue, et qui seraient pathognomoniques du syndrome de MS (Figure 5). Chez les patients CCFDN, seules des modifications d'origine neurogène, et non myogène, ont été décrites sur les biopsies musculaires (Tournev et al., 1999b).

Nous pensons cependant qu'une atteinte musculaire représentée par des épisodes de rhabdomyolyse aiguë est un signe rare, initialement non décrit, du syndrome CCFDN. En effet les patients décrits par Muller-Felber et al. (Muller-Felber et al., 1998), puis par Merlini et al. (Merlini et al., 2002) avec un syndrome de MS associé à une rhabdomyolyse présentent des signes évocateurs du syndrome CCFDN et sont liés au locus 18qter. Ils diffèrent du syndrome CCFDN classique par la présence d'un syndrome cérébelleux franc et d'une atrophie cérébelleuse. Or si l'ataxie est un signe majeur du syndrome MS, seule une ataxie cérébelleuse modérée est classiquement retrouvée dans le syndrome CCFDN. Selon Tournev et al. (Tournev, 1999), cette ataxie n'est que très rarement associée à une atrophie cérébelleuse, l'IRM cérébrale et spinale étant caractérisée par une dilatation des ventricules latéraux et une atrophie cérébrale et médullaire. Les familles de Merlini et al. (Merlini et al., 2002) étant liées en 18qter, la rhabdomyolyse aiguë et l'ataxie cérébelleuse doivent être considérées comme appartenant au spectre clinique du syndrome CCFDN.

La neuropathie périphérique est un critère diagnostique du syndrome CCFDN. Elle n'est pas classique dans le syndrome de MS, mais a été décrite dans la littérature chez quelques patients (Aguglia et al., 2000; Alexianu et al., 1983 ; Farah et al., 1997 ; Hakamada et al., 1981 ; Muller-Felber et al., 1998 ; Zimmer et al., 1992 ). Il est probable que certains de ces patients aient un syndrome CCFDN ou un syndrome apparenté, et non un syndrome de Marinesco-Sjögren. En

effet, aucun des patients porteurs de mutations de *SILI* n'a présenté une neuropathie périphérique, excluant ce signe du spectre clinique de la forme classique du MS.

Comme mentionné précédemment, une liaison au loci 5q31 et 18qter a été exclue dans plusieurs familles dont une famille avec des origines française et yougoslave (Manuscrit 2, Figure 4, Famille 5) et dans une famille italienne (Manuscrit 2, Figure 4, Famille 6). De plus, aucune mutation n'a été retrouvée dans *SILI* pour les 2 petites familles norvégiennes dont la ségrégation était compatible avec une liaison en 5q31 (Manuscrit 2, Figure 3, Familles 3 et 4). Enfin, Senderek et al. (Senderek et al., 2005) ont également exclu la présence de mutation de *SILI* chez 5 patients avec des signes atypiques de MS. En effet, aucun des patients exclus pour une mutation de *SILI* ne présentait une myopathie. Nos patients, comme ceux décrits par Senderek et al. ont une (des) maladie(s) distincte(s) du syndrome de MS, caractérisée(s) par la présence de signes additionnels incluant une neuropathie périphérique, une atrophie optique, une surdité, une épilepsie, une atrophie cérébrale, une microcéphalie, une leucoencéphalopathie, une microcornée ou un diabète insulino-dépendant (Figure 22). La liaison au locus 18qter étant exclue dans ces familles, les patients ont une (des) pathologie(s) également distincte(s) du syndrome CCFDN. Il existe donc au moins 3 gènes différents dont la perte de fonction est responsable de l'association d'une cataracte, d'une ataxie cérébelleuse et d'un retard mental.



**Figure 22: Chevauchement phénotypique entre le syndrome de MS, le syndrome CCFDN et des syndromes apparentés**

Les études moléculaires permettent de mieux définir les spectres cliniques de chaque entité.

les patients présentant l'association d'un retard psychomoteur, d'une cataracte, d'un retard staturo-pondéral d'un hypogonadisme, de déformations squelettiques peuvent être atteints d'un syndrome de MS, de CCFDN ou d'un syndrome non caractérisé sur le plan moléculaire. Les caractéristiques distinctives du syndrome de MS et du syndrome CCFDN sont indiquées.

## *Manuscrit 1*

*Linkage to 18qter differentiates two clinically overlapping syndromes : Congenital Cataracts Facial Dysmorphism Neuropathy and Marinesco-Sjögren syndromes.*

Lagier-Tourenne Clotilde, Chaigne Denys, Gong Ji, Flori Jean, Mohr Michel, Ruh Danielle, Christmann Dominique, Flament Jacques, Mandel Jean-Louis, Koenig Michel, Dollfus Hélène.

*Journal of Medical Genetics.* 2002 Nov; 39(11) :838-43



## LETTER TO JMG

# Linkage to 18qter differentiates two clinically overlapping syndromes: congenital cataracts-facial dysmorphism-neuropathy (CCFDN) syndrome and Marinesco-Sjögren syndrome

C Lagier-Tourenne, D Chaigne, J Gong, J Flori, M Mohr, D Ruh, D Christmann, J Flament, J-L Mandel, M Koenig, H Dollfus

*J Med Genet* 2002;**39**:838–843

The Marinesco-Sjögren syndrome (MSS) (MIM 248800) is an autosomal recessive condition characterised by cataracts, ataxia, and growth and mental retardation. Chronic myopathy is a common feature. Peripheral neuropathy and acute rhabdomyolysis have been described occasionally in MSS. To date, no gene for it has been localised.

Congenital cataracts-facial dysmorphism-neuropathy syndrome (CCFDN) (MIM 604168) is a recently delineated autosomal recessive condition,<sup>1</sup> so far only described in a specific gypsy group originating from Bulgaria. This disorder was localised by linkage analysis to 18qter, telomeric to the marker D18S1141.<sup>2</sup> CCFDN alleles showed a highly conserved haplotype in the region D18S1141-D18S70-D18S1268 consistent with genetic homogeneity and a single founder mutation. Since then, the disease locus has been reduced to the interval located between markers D18S1095 and D18S1390.<sup>3,4</sup>

MSS and CCFDN share common clinical features and are considered to be differential diagnoses.

Recently, Merlini *et al*<sup>5</sup> proposed that the CCFDN syndrome and one subtype of MSS (Marinesco-Sjögren/myoglobinuria), also only described in gypsy patients, are genetically identical. We report here the clinical and linkage analysis of one gypsy family and one Turkish family in which patients presented with congenital or juvenile cataracts and ataxia. Both families were initially diagnosed as MSS. However, our study shows that they are clinically and genetically distinct. We found that the gypsy family had CCFDN features and was linked to 18qter whereas the Turkish family had typical MSS features and was not linked to 18qter. Here, we confirm the clinical overlap between the CCFDN and MS syndromes and show that they are distinct genetic entities.

## CASE REPORTS

### Family 1

A sister (patient 1) and a brother (patient 2) of Turkish origin were referred to the neuropaediatric clinic because of failure to thrive, psychomotor delay, major ataxia, and hypotonia. They were the fourth and fifth children of healthy, consanguineous parents (fig 1A). Two paternal aunts, who died during adolescence, were reported by the parents to have had a similar phenotype to the index cases.

Both patients were born after a normal pregnancy and delivery. They underwent clinical evaluation at 1.5 and 3 years respectively and were followed up for 15 years.

Short stature and reduced head circumference were present from early childhood (–2 SD for weight, –3 SD for height, and –2 SD for head circumference). No facial dysmorphic feature was found.

A severe static and kinetic cerebellar syndrome has always been present. Deep tendon reflexes were present and there

## Key points

- Congenital cataracts-facial dysmorphism-neuropathy (CCFDN) syndrome and Marinesco-Sjögren syndromes are two entities with major clinical overlap including congenital cataracts, growth retardation, psychomotor delay, ataxia, skeletal deformities, and hypogonadism.
- Genetic identity of the two syndromes has been suggested but clinical and molecular studies of two families allowed us to show that these syndromes are clinically and genetically distinct.
- Major features of MSS that distinguish it from CCFDN are the occurrence of more severe mental retardation, marked cerebellar atrophy, chronic myopathy with specific ultrastructural features on muscle biopsy, and the absence of peripheral neuropathy, facial dysmorphism, microcornea, and linkage to 18qter.

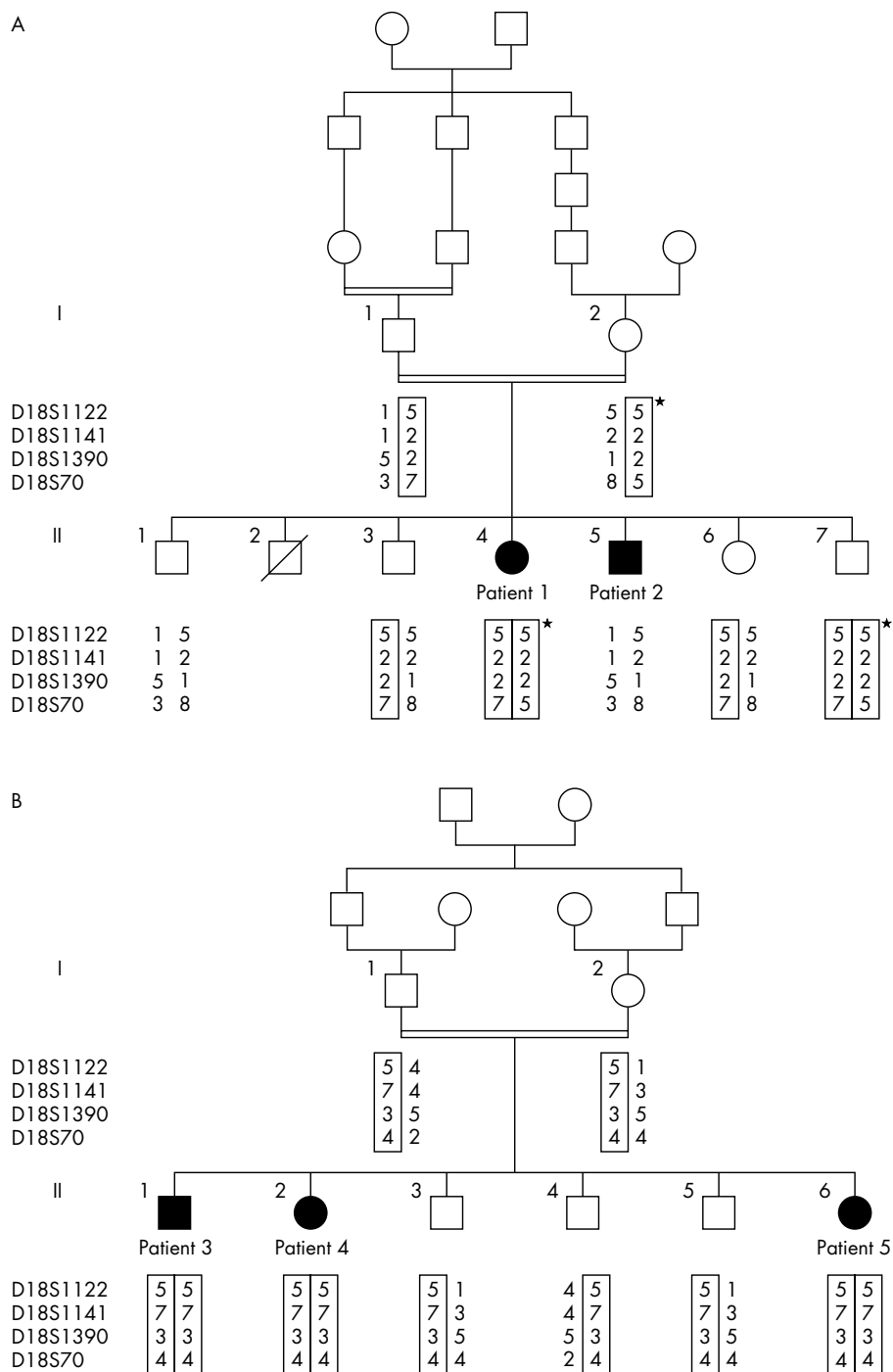
was neither sensory deficit nor pyramidal signs. Patient 1 acquired the sitting position at 2.5 years of age and independent walking at 6.5 years of age, but her stance and gait has remained unsteady. At 2.5 years of age, patient 2 was able to sit unsupported and he walked at 9 years of age.

Expressive language occurred at the ages of 4.5 and 7 years, respectively. Both sibs attended special education classes and reading acquisition occurred at 15 and 16.5 years, respectively.

For both patients, magnetic resonance imaging (MRI) of the brain showed marked cerebellar atrophy predominantly affecting the vermis. There was no ventricular dilatation and the corpus callosum was normal (fig 2). Bilateral pes planus valgus and kyphosis related to major hypotonia and muscle weakness were observed. Both patients had distal joint laxity and no muscular retraction. Despite physical therapy, patient 2 developed lumbar scoliosis at 16 years of age. At 16 and 17.5 years of age, respectively, hypotonia was less marked than in infancy and proximal and distal muscle weakness was mild (Medical Research Council scale grade 4/5).

Muscle biopsy performed at 5 and 6.5 years of age, respectively, showed similar myopathic changes including variation in muscle fibre size, acid phosphatase positive rimmed vacuoles, as well as rare necrotic and regenerating fibres. Electron microscopy disclosed several dense membranous structures surrounding myonuclei (fig 3). There were no abnormal mitochondria.

Cataracts developed rapidly and were operated on, in the two sibs, at 4.5 and 6.5 years of age, respectively. Ophthalmological examination disclosed nystagmus in both children, but vision



**Figure 1** Pedigree of the families and genotyping results. (A) Family 1. (B) Family 2. Markers are indicated on the left and are organised from top to bottom in the centromeric to telomeric order. The *CCFDN* locus is located between markers D18S1141 and D18S1390. One of the two parental haplotypes is boxed. For family 2, the haplotype linked to the disease is boxed.

was satisfactory (patient 1 6/6 for both eyes, patient 2 6/8 for both eyes). No ocular malformation or oculomotor apraxia were found.

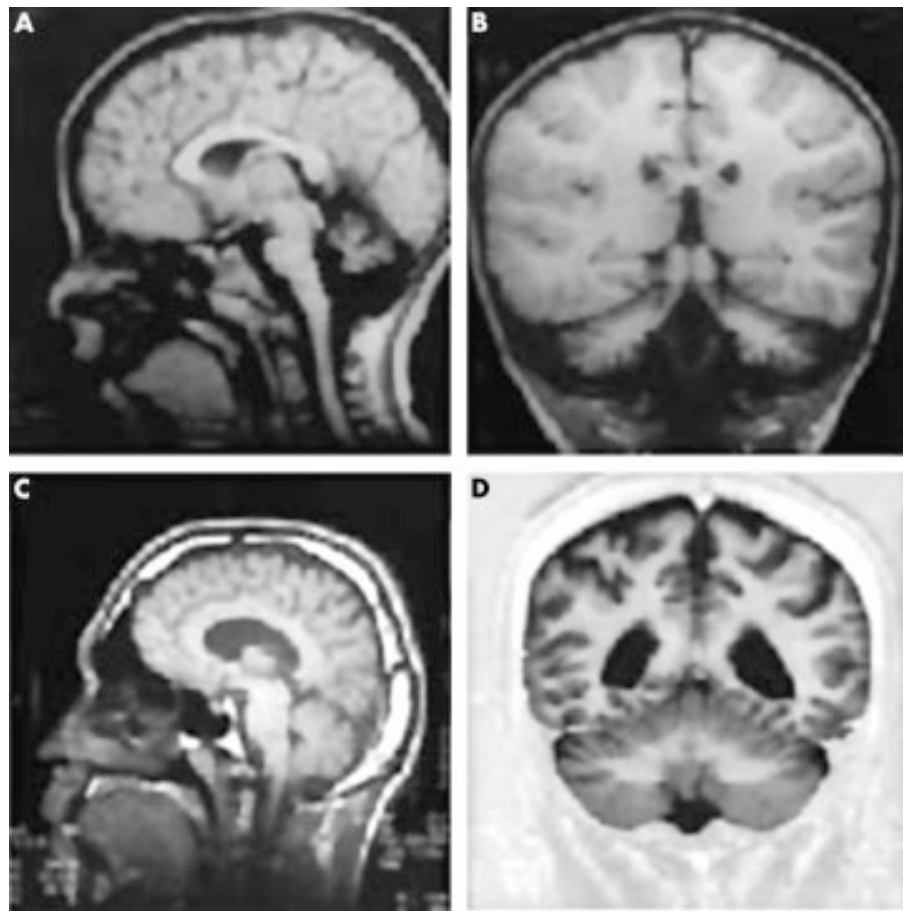
Both sibs had hypogonadism. At 17.5 years of age, patient 1 had primary amenorrhoea with secondary sexual development. Patient 2 presented with non-ectopic small testes and retarded pubic hair growth at 16 years of age. Endocrine investigations showed hypergonadotrophic hypogonadism for them both.

Metabolic, haematological, and lipid investigations were normal. At 16 and 17.5 years of age, respectively, serum creatine kinase levels were slightly increased at 305 UI/l (normal

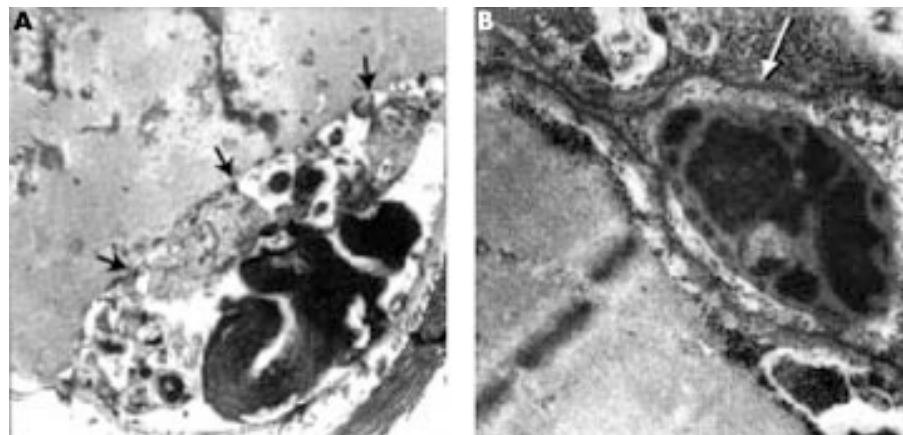
<200 UI/l) for patient 2 and within the normal range for patient 1.

#### Family 2

A gypsy family was referred for genetic counselling as three sibs out of six were affected with severe visual and neurological impairment (fig 1B). This family originated from eastern Europe (no other information on the country of origin is available) and has been based in France for at least three generations. The healthy parents were first cousins. Three sibs had a comparable past medical history.



**Figure 2** Brain lesions on MRI. (A, B) Patient 1 with MSS: marked cerebellar atrophy. (C, D) Patient 3 with CCFDN: diffuse cerebral atrophy with enlargement of the lateral ventricles, discrete cerebellar atrophy, and thin corpus callosum.



**Figure 3** Electron microscopy on muscular biopsy of patient 2. (A) Subsarcolemmal rimmed vacuole (arrows) containing numerous small sarcoplasmic debris and pseudomyelinic whorls. Foci of myofibrillar disorganisation close to the vacuole. (B) Dense membranous structure (arrows) surrounding an apoptotic nucleus with fragmented chromatin.

They were born after a normal pregnancy and delivery. The first manifestation of the condition was congenital cataracts operated on during the first months of life. The clinical course was marked by mild psychomotor delay with acquisition of walking between 2 and 3 years of age. Distal muscle weakness and skeletal deformities appeared during childhood.

We examined the patients at the age of 22 years (male patient 3), 16 years (female patient 4), and 12 years (female patient 5), respectively. The height of patients 3 and 5 was 1.50 m ( $-4$  SD) and 1.30 m ( $-3$  SD), respectively. The height of

patient 4 could not be measured because of major kyphoscoliosis. Weight was at  $-2$  SD for all three patients. The head circumference was within normal limits. Mild dysmorphic features with prominent midface and wide lips were only found in male patient 3. The three sibs presented with kyphoscoliosis, foot deformities (pes cavus or equinovarus), and genu recurvatum. Patient 4 needed surgery for major disabling kyphoscoliosis. Neurological examination showed in the three sibs lower limb areflexia and amyotrophy while these features were subtle for the upper limbs. The deficit was predominantly



**Figure 4** Close up photographs of the midface showing microcornea in all the affected sibs of family 2. The horizontal diameter of the cornea was respectively (A) 8 mm (the right eye, RE) in patient 3 (left eye (LE) is buphthalmic owing to an accidental trauma). (B) 8 mm (RE) and 10 mm (LE) in patient 4. (C) 9 mm (RE) and 10 mm (LE) in patient 5.

**Table 1** Comparison of MSS and CCFDN features

Clinical features	MSS	CCFDN	Family 1		Family 2		
			Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5
Short stature	+	+	+	+	+	+	+
Microcephaly	+/-	-	+	+	-	-	-
Facial dysmorphism	-	+	-	-	+	-	-
Microcornea	-	+	-	-	+	+	+
Cataracts	+	+	+	+	+	+	+
Nystagmus	+	+	+	+	+	+	+
Skeletal deformities	+	+	+	+	+	+	+
Psychomotor delay	Mild to severe	Mild	+	+	+	+	+
Hypotonia	+	-	+	+	-	-	-
Cerebellar ataxia	+	Mild	+	+	Mild	+	+
Peripheral neuropathy	+/-	+	-	-	+	+	+
Acute rhabdomyolysis	-	+/-	-	-	-	-	-
Raised serum creatine kinase	+/-	-	-	+	-	-	-
Myopathic changes on biopsy	+	-	+	+	NA	NA	NA
Hypogonadism	+ Hypergonadotrophic	+ Hypogonadotrophic?	+	+	-	-	-
Cerebellar atrophy	+	+/-	+	+	Discrete	NA	Discrete
Cerebral atrophy	+/-	+	-	-	+	NA	+

NA: not available.

motor but was associated with vasomotor disturbances and mild sensory deficit with hypoesthesia and decreased pallesthesia of the four extremities. These findings were consistent with a sensorimotor polyneuropathy. Moreover this polyneuropathy was associated with mild cerebellar ataxia more pronounced in patients 4 and 5 than in patient 3.

Nerve conduction studies performed in the three patients showed reduced motor and sensory nerve conduction velocities, at 30 m/s and 40 m/s, respectively, indicating a demyelinating neuropathy. Motor action potentials were of more reduced amplitude than sensitive action potentials. Electromyographic examination showed a neurogenic atrophy pattern affecting the distal segments. These findings were consistent with a predominantly motor demyelinating peripheral neuropathy.

Brain MRI, performed on patients 3 and 5, showed diffuse cerebral atrophy with enlargement of the lateral ventricles and discrete cerebellar atrophy. The corpus callosum of patient 3 was thin (fig 2).

Ophthalmological examination showed microcornea in all affected subjects. The axial length of the eyes was within normal limits on ultrasound examination, excluding associated micropthalmos (fig 4). Visual impairment with nystagmus was noted in the three sibs: patient 3 only had remaining light perception and the vision of the two sisters was no more than 6/60 in both eyes. Fundus examination showed optic atrophy in patient 3. No feature of hypogonadism was observed in the three patients.

Endocrine, biochemical, haematological, and lipid investigations were normal.

## MATERIAL AND METHODS

Genomic DNA was extracted from peripheral blood by standard methods. Samples were available from the parents and all the affected and healthy children. Informed consent was obtained from both families.

We genotyped the Genethon markers D18S1122, D18S1141, D18S70,<sup>5</sup> and marker D18S1390,<sup>3,4</sup> amplified by the forward

primer 5'-AACGGTTTGGTATTTCCTCA-3' and the reverse primer 3'-CAGTTCAACAAGGGATTGG-5'.

We amplified all markers by PCR using one of the primers labelled with  $\gamma$ -32P-dATP (3000 mCi/mmol/l). PCR was performed using for each reaction 150 ng of template DNA, 0.4  $\mu$ mol/l of each primer, 1 U of *Taq* polymerase (Sigma), and 2  $\mu$ l of buffer (10 mmol/l tris HCl, pH 8.3, 50 mmol/l KCl, 200  $\mu$ mol/l of each deoxynucleotide triphosphate, 1.5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>) in a final reaction volume of 10  $\mu$ l. PCR amplification consisted of 35 cycles (94°C for 10 seconds, 50°C-60°C for 15 seconds, 72°C for 20 seconds). PCR products were separated on 6% denaturing polyacrylamide gels followed by autoradiography. Alleles were scored manually with allele 1 being the smallest.

## RESULTS

The two families were tested for linkage at the CCFDN-MSS/myoglobinuria locus, which is located between markers D18S1095 and D18S1390 on chromosome 18qter.<sup>2,4</sup> Patients 1 and 2 from family 1 share no parental haplotype over the region distal to D18S1141, therefore excluding linkage to the CCFDN locus. In addition, the healthy children II.1 and II.7 share identical haplotypes with patients 1 and 2, respectively, further supporting exclusion of linkage to 18qter (fig 1A). In family 2 (fig 1B), all three affected sibs were homozygous for the four consecutive 18qter markers (D18S1122 to D18S70), while the three healthy children were heterozygous for the same haplotype. Lod score calculation, including the consanguinity loops,<sup>6,7</sup> gave a maximum value of 2.57 at  $\theta=0$  for linkage to the D18S1122-D18S70 haplotype (the frequency of the haplotype was estimated at a safe upper value of 0.05). Linkage of family 2 to the CCFDN locus is therefore considered proven,<sup>8</sup> a conclusion also supported by the ethnic origin and clinical features of the patients.

## DISCUSSION

The presence of congenital cataracts associated with mental retardation, ataxia, and peripheral neuropathy in an inbred family narrows the diagnostic search to a few syndromes:

Marinesco-Sjögren syndrome, Marinesco-Sjögren-like syndrome (MIM 248810),<sup>9</sup> CCFDN,<sup>1</sup> polyneuropathy-cataract-deafness-retardation syndrome (MIM 212710),<sup>10</sup> or cataract-deafness-cerebellar ataxia-psychosis and dementia (MIM 117300).<sup>11</sup>

The patients of family 1 were classified as presenting a classical MS syndrome in regard to the cerebellar atrophy on MRI and characteristic pathological findings on light and electron microscopy of the muscle.

The patients of family 2 were initially diagnosed as presenting a MSS phenotype because of the association of cataracts, mental retardation with ataxia, and skeletal findings, but they differed clinically from the previous family by the presence of microcornea, marked peripheral neuropathy, and a moderate cerebellar atrophy on MRI.

The clinical discordance between the two families was confirmed by molecular studies. Indeed the localisation of the disease gene in family 2 to the telomeric part of chromosome 18q indicates the diagnosis of CCFDN and will allow indirect prenatal diagnosis requested by the relatives. However, linkage to 18qter was ruled out for family 1 with typical MSS. Molecular studies in these two families allowed us to differentiate the MS and CCFDN syndromes as being distinct genetic entities. Whereas Merlini *et al*<sup>8</sup> proposed that the CCFDN syndrome and one subtype of MSS with acute rhabdomyolysis are genetically identical, we show here that a family with classical MSS is not linked to the 18qter region.

Comparison of the reported features of MS and CCFDN syndromes (table 1) shows a clinical overlap including congenital cataracts, nystagmus, somatic and mental retardation, ataxia, skeletal deformities, and hypogonadism. Major differences between the two syndromes are the occurrence of mild facial dysmorphism, microcornea, and demyelinating neuropathy in the CCFDN syndrome and the presence of myopathic changes and marked cerebellar atrophy leading to severe ataxia in the MSS.

Facial dysmorphism described in the CCFDN seems to become more obvious during late childhood and appears to be more prominent in males than in females.<sup>1</sup> Indeed, in family 2, the male patient was the only affected person presenting dysmorphic features.

Concerning ocular abnormalities, cataracts in MSS are usually congenital but may also occur during childhood. No other developmental abnormality of the eye has been reported in MSS, as opposed to microcornea which appears to be a major clinical and probably a diagnostic criterion of CCFDN.

Moreover MSS and CCFDN syndromes differ regarding myopathic changes. Progressive muscle weakness and muscle atrophy were reported to be among the cardinal signs of MSS.<sup>12</sup> Most muscle biopsy reports have described myopathic changes including variation in muscle fibre size, rimmed vacuoles, necrotic and regenerative fibres, numerous internal nuclei, nuclear degeneration, endomysial fibrosis, and fatty replacement.<sup>12-17</sup> Sewry *et al*<sup>13</sup> suggested that a unique dense membranous structure associated with nuclei in muscle fibres could be a specific ultrastructural feature of MSS. Sasaki *et al*<sup>16</sup> and Suzuki *et al*<sup>17</sup> confirmed its presence in MSS patients, whereas it was shown to be inconstant in other studies.<sup>15</sup> Muscle biopsy of the patients in family 1 showed structures characteristic of MSS (fig 3B). No muscle biopsy was available from the patients in family 2, but Tourné *et al*<sup>19</sup> described only neurogenic changes on muscle biopsy of a CCFDN patient.

Recently, patients with MSS and acute rhabdomyolysis without underlying chronic myopathy were shown to be linked to the CCFDN locus.<sup>4</sup> However, all patients from the three gypsy families reported had peripheral neuropathy, all males had facial dysmorphism, and one patient had microphthalmia. They differ from classical CCFDN patient by cerebellar dysfunction in all of them and cerebellar atrophy in two cases, these signs not usually being features of CCFDN. Even if these patients could be considered as atypical MS patients, we propose that rhabdomyolysis could, in fact, be a rare feature of CCFDN.

Ataxia is a leading feature of MSS usually because of marked cerebellar atrophy. Mild cerebellar ataxia has been described in CCFDN patients,<sup>1</sup> but MRI showed cerebral and spinal atrophy with enlargement of the lateral ventricles without cerebellar atrophy except in one case. We illustrate in fig 3 the differences between the MRI features of MSS and CCFDN.

Demyelinating peripheral neuropathy is a leading CCFDN feature but was also reported in several cases of MSS.<sup>18-20-24</sup> Again, the patients described by Muller-Felber *et al*<sup>20</sup> are the same as those who were subsequently reported by Merlini *et al*<sup>8</sup> as being linked to the CCFDN locus. Further genotype-phenotype correlation should clarify whether all Marinesco-Sjögren patients with peripheral neuropathy are linked to the CCFDN locus or not. However, we have proven by molecular studies that a family with classical MSS without peripheral neuropathy and a family with CCFDN syndrome are genetically distinct. Family 1 should help to identify the genetic localisation of the classical MSS gene, since the maximum expected lod score for this family alone is 2.9.

For the time being, we propose to restrict the diagnosis of Marinesco-Sjögren syndrome to patients with cerebellar atrophy, hypotonia, and myopathic changes but without facial dysmorphism, microcornea, or peripheral demyelinating neuropathy. However, clinical overlap between MSS and CCFDN is obvious and molecular investigations should help to achieve a final classification of these conditions.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to express our gratitude to all the patients and families for their collaboration. We are indebted to Maria-Céu Moreira for sharing her time and experience. We thank S Metz for the illustrations and E Troesch, F Ruffenach, and I Colas for oligonucleotide synthesis. 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, and the Hôpitaux Universitaires de Strasbourg.

## Authors' affiliations

**C Lagier-Tourenne, J-L Mandel, M Koenig**, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/Université Louis-Pasteur, Illkirch, CU de Strasbourg, France

**D Chaigne**, Neuropédiatrie, Clinique Sainte Odile, Strasbourg, France

**J Gong, J Flament**, Service d'Ophthalmologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France

**J Flori**, Centre Médico-Chirurgical et Obstétrical, Schiltigheim, France

**M Mohr**, Institut d'Anatomie Pathologique, Faculté de Médecine de Strasbourg, France

**D Ruh**, Cabinet de Neurologie, Strasbourg, France

**D Christmann**, Service de Radiologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France

**H Dollfus**, Fédération de Génétique, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, France

Correspondence to: Dr H Dollfus, Fédération de Génétique, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Hôpital de Hautepierre, Avenue Molière, 67098 Strasbourg, France; [helene.dollfus@medecine.u-strasbg.fr](mailto:helene.dollfus@medecine.u-strasbg.fr)

## REFERENCES

- Tourné I**, Kalaydjieva L, Youl B, Ishpekova B, Guergueltcheva V, Kamenov O, Katarova M, Kamenov Z, Raicheva-Terzieva M, King RH, Romanski K, Petkov R, Schmarov A, Dimitrova G, Popova N, Uzunova M, Milanov S, Petrova J, Petkov Y, Kolarov G, Aneva L, Radeva O, Thomas PK. Congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome, a novel complex genetic disease in Balkan Gypsies: clinical and electrophysiological observations. *Ann Neurol* 1999;**45**:742-50.
- Angelicheva D**, Tourné I, Dye D, Chandler D, Thomas PK, Kalaydjieva L. Congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy (CCFDN) syndrome: a novel developmental disorder in Gypsies maps to 18qter. *Eur J Hum Genet* 1999;**7**:560-6.
- Tourné I**, Thomas PK, Gooding R, Angelicheva D, King RH, Youl B, Guergueltcheva V, Ishpekova B, Blechsmidt K, Swoboda K, Petkov R, Molnar M, Kamenov Z, Siska E, Taneva N, Borisova P, Lupu C, Raycheva M, Trifonova N, Popova A, Corches A, Litvinenko I, Merlini L, Katarova M, Tzankov B, Popa G, Akkari P, Rosenthal A, Donzelli O, Kalaydjieva L. Congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome - clinical, neuropathological and genetic investigation. *Acta Myologica* 2001;**XX**:210-19.

- 4 **Merlini L**, Gooding R, Lochmuller H, Muller-Felber W, Walter MC, Angelicheva D, Talim B, Hallmayer J, Kalaydjieva L. Genetic identity of Marinesco-Sjogren/myoglobinuria and CCFDN syndromes. *Neurology* 2002;**58**:231-6.
- 5 **Dib C**, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal 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.
- 6 **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.
- 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. *Nat Genet* 1993;**5**:195-200.
- 8 **Ott J**. *Analysis of human genetic linkage*. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1991.
- 9 **Herva R**, von Wendt L, von Wendt G, Saukkonen AL, Leisti J, Dubowitz V. A syndrome with juvenile cataract, cerebellar atrophy, mental retardation and myopathy. *Neuropediatrics* 1987;**18**:164-9.
- 10 **Begeer JH**, Scholte FA, van Essen AJ. Two sisters with mental retardation, cataract, ataxia, progressive hearing loss, and polyneuropathy. *J Med Genet* 1991;**28**:884-5.
- 11 **Vidal R**, Revesz T, Rostagno A, Kim E, Holton JL, Bek T, Bojsen-Moller M, Braendgaard H, Plant G, Gliso J, Frangione B. A decamer duplication in the 3' region of the BRI gene originates an amyloid peptide that is associated with dementia in a Danish kindred. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:4920-5.
- 12 **Superneau DW**, Wertelecki W, Zellweger H, Bastian F. Myopathy in Marinesco-Sjogren syndrome. *Eur Neurol* 1987;**26**:8-16.
- 13 **Sewry CA**, Voit T, Dubowitz V. Myopathy with unique ultrastructural feature in Marinesco-Sjogren syndrome. *Ann Neurol* 1988;**24**:576-80.
- 14 **Borud O**, Aasly J, Lindal S. Mitochondrial myopathy in six patients with Marinesco-Sjogren syndrome. *Prog Clin Biol Res* 1989;**306**:135-9.
- 15 **Goto Y**, Komiyama A, Tanabe Y, Katafuchi Y, Ohtaki E, Nonaka I. Myopathy in Marinesco-Sjogren syndrome: an ultrastructural study. *Acta Neuropathol* 1990;**80**:123-8.
- 16 **Sasaki K**, Suga K, Tsugawa S, Sakuma K, Tachi N, Chiba S, Imamura S. Muscle pathology in Marinesco-Sjogren syndrome: a unique ultrastructural feature. *Brain Dev* 1996;**18**:64-7.
- 17 **Suzuki Y**, Murakami N, Goto Y, Orimo S, Komiyama A, Kuroiwa Y, Nonaka I. Apoptotic nuclear degeneration in Marinesco-Sjogren syndrome. *Acta Neuropathol (Berl)* 1997;**94**:410-15.
- 18 **Zimmer C**, Gosztanyi G, Cervos-Navarro J, von Moers A, Schroder JM. Neuropathy with lysosomal changes in Marinesco-Sjogren syndrome: fine structural findings in skeletal muscle and conjunctiva. *Neuropediatrics* 1992;**23**:329-35.
- 19 **Tournev I**, King RH, Workman J, Nourallah M, Muddle JR, Kalaydjieva L, Romanski K, Thomas PK. Peripheral nerve abnormalities in the congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy (CCFDN) syndrome. *Acta Neuropathol (Berl)* 1999;**98**:165-70.
- 20 **Muller-Felber W**, Zafiriou D, Scheck R, Patzke I, Toepfer M, Pongratz DE, Walther U. Marinesco Sjogren syndrome with rhabdomyolysis. A new subtype of the disease. *Neuropediatrics* 1998;**29**:97-101.
- 21 **Hakamada S**, Sobue G, Watanabe K, Kumagai T, Hara K, Miyazaki S. Peripheral neuropathy in Marinesco-Sjogren syndrome. *Brain Dev* 1981;**3**:403-6.
- 22 **Alexianu M**, Christodorescu D, Vasilescu C, Dan A, Petrovici A, Magureanu S, Savu C. Sensorimotor neuropathy in a patient with Marinesco-Sjogren syndrome. *Eur Neurol* 1983;**22**:222-6.
- 23 **Aguglia U**, Annesi G, Pasquinelli G, Spadafora P, Gambardella A, Annesi F, Pasqua AA, Cavalcanti F, Crescibene L, Bagala A, Bono F, Oliveri RL, Valentino P, Zappia M, Quattrone A. Vitamin E deficiency due to chylomicron retention disease in Marinesco-Sjogren syndrome. *Ann Neurol* 2000;**47**:260-4.
- 24 **Farah S**, Sabry MA, Khuraibet AJ, Anim JT, Quasrawi B, Al-Khatam S, Al-Busairi W, Hussein JM, Khan RA, Al-Awadi SA. Marinesco-Sjogren syndrome in a Bedouin family. *Acta Neurol Scand* 1997;**96**:387-91.

## Readers' favourite

Top 10

Click on the "Top 10" button on the homepage to see which are the best read articles each month

[www.jmedgenet.com](http://www.jmedgenet.com)

## *Manuscrit 2*

*Homozygosity mapping of Marinesco-Sjögren syndrome to 5q31.*

Lagier-Tourenne Clotilde, Tranebjaerg Lisbeth, Chaigne Denys, Gribaa Moez, Dollfus Hélène, Silvestri Gabriela, Bétard Christine, Warter Jean-Marie, Koenig Michel.

*European Journal of Human Genetics.* 2003 Oct; 11(10):770-8

**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 and M. Koenig

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

**Pages 144-152 :**

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

Les utilisateurs de l'ULP peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201068>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>



## *Manuscript 3*

*The gene disrupted in Marinesco-Sjögren syndrome encodes SIL1, an HSPA5 co-chaperone.*

Anttonen Anna-Kaisa , Mahjneh Ibrahim, Hämäläinen Riikka, Lagier-Tourenne Clotilde, Kopra Outi, Waris Laura, Anttonen Mikko, Joensuu Tarja, Kalimo Hannu, Paetau Anders, Tranebjaerg Lisbeth, Chaigne Denys, Koenig Michel, Eeg-Olofsson Orvar, Udd Bjarne, Somer Mirja, Somer Hannu, Lehesjoki Anna-Elina.

*Nature Genetics.* 2005 Dec; 37(12):1309-11.

**The gene disrupted in Marinesco-Sjögren syndrome encodes SIL1, an HSPA5 cochaperone**

Anna-Kaisa Anttonen, Ibrahim Mahjneh, Riikka H Hämäläinen, Clotilde Lagier-Tourenne, Outi Kopra, Laura Waris, Mikko Anttonen, Tarja Joensuu, Hannu Kalimo, Anders Paetau, Lisbeth Tranebjaerg, Denys Chaigne, Michel Koenig, Orvar Eeg-Olofsson, Bjarne Udd, Mirja Somer, Hannu Somer & Anna-Elina Lehesjoki

**Nature Genetics, Vol. 37, Pages 1309 - 1311 (01 Dec 2005), Brief Communications**

**Pages 154-163 :**

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

Les utilisateurs de l'ULP peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1038/ng1677>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

## Supplementary Methods

Subjects and clinical evaluation. The Institutional Review Board of the Kainuu Central Hospital, Finland approved the study. An informed consent was obtained from all subjects. The study included eight families with 21 affected individuals and 25 family members. The pedigrees of families are shown in **Supplementary Figure 2** online and the clinical features in the patients are summarized in **Supplementary Table 1** online. Cataracts were diagnosed in all patients after the age of 2.5 years and in some patients it progressed rapidly. On brain magnetic resonance imaging, cerebellar atrophy was more pronounced in the vermis than in the hemispheres. The identified mutations were screened by sequencing in 96 unrelated individuals from the CEPH family panel (all mutations), 42 unrelated Turkish individuals (the mutation in the Turkish family) and 96 unrelated Finnish individuals (the two mutations in Scandinavian patients).

Linkage analysis. We isolated genomic DNA using standard methods. Segregation of the phenotype with fluorescently labeled microsatellite markers, *D5S1995*, *D5S479*, *D5S1983*, *D5S414*, *D5S500*, *D5S476*, *D5S2009*, *D5S2116*, and *D5S1979*, covering the locus on 5q31 was studied in families M1, M2, M4, M5, and M6. The marker order, intermarker distances, and primer sequences were obtained from the deCODE genetic map and NCBI sequence based STS map (Map Viewer, NCBI Build 35.1). We separated PCR-amplified products with an ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) and determined allele sizes using GeneMapper v5.0 program (Applied Biosystems). We used the MLINK program to calculate pair-wise lod scores assuming full penetrance and a disease allele frequency of 0.001. Marker allele frequencies were determined from 42 Finnish control chromosomes and allele numbering is according to CEPH database (<http://www.cephb.fr/cephdb/php/eng/>). Haplotypes were constructed manually.

Mutation analysis. We examined the gene content of the interval spanning *D5S500* and *D5S2116* with the NCBI Map Viewer (<http://www.ncbi.nih.gov>), the Ensembl Human Genome Browser ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/)), and the University of California Santa Cruz (UCSC) Human Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>). We amplified the exons and exon-intron boundaries of 11 positional candidate genes from genomic DNAs of patient

M113, her parents, patient M203 and one Finnish control individual with intronic primers designed with Primer3 program. We purified the amplified products using the PCR Product Pre-Sequencing Kit (USB Corporation) and sequenced both strands using BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and an ABI 3730 DNA Analyzer. Sequences were analyzed using the Sequencher 4.2 program (Gene Codes Corporation).

We analyzed the c.645+2T>C mutation from patient and control RNA extracted from freshly obtained peripheral blood using the PAXgene Blood RNA System (PreAnalytiX). The RT reaction was performed with High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). We amplified the cDNA with primers in exons 5 and 8 and sequenced the products either directly (see above), after purification from gel (QIAquick Gel Extraction Kit; QIAGEN) or after TA-cloning into the pCRII vector using TA Cloning Kit (Invitrogen).

Bioinformatics. We identified alternatively spliced transcripts using NCBI AceView (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/index.html>). *SILI*, *HSPA5*, and *HYOUI* expression patterns based on GNF (Genomics Institute of the Novartis Research Foundation) Human Gene Expression Atlas 2 database were analyzed with the UCSC gene sorter (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgNear>). ESTs for *SILI* and *HSPA5* in different ocular regions were searched from the NEIBank Expressed Sequence Tag database (<http://neibank.nei.nih.gov/index.shtml>). Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) is available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>.

Expression analysis. Commercial multiple tissue Northern blots (Human Fetal II, Human Brain II, and Human Brain V; BD Biosciences Clontech) were hybridized with a 1,519 bp PCR-generated *SILI* cDNA probe covering the whole coding region as well as with *GAPDH* (BD Biosciences Clontech). The probes were labeled with <sup>32</sup>P-dCTP using RediPrimeII kit (Amersham Pharmacia) and blocked with human placental (0.5 mg/ml) and salmon sperm (0.25 mg/ml) DNA before hybridization. Hybridizations were carried out for 2 h at 65 °C in ExpressHyb solution (BD Biosciences Clontech), and filters were washed at 60 °C according to the manufacturer's

instructions. Semiquantitative RT-PCR was performed from BD™ MTC Multiple Tissue cDNA Panels (Human I, Human II, and Human Fetal; BD Biosciences Clontech) according to manufacturer's instructions. A 930 bp *SIL1* fragment (c.584\_+127) was PCR amplified and separated by gel electrophoresis.

Immunohistochemistry. Frozen sections from muscle biopsies taken for diagnostic examinations from two Finnish (M114 and M603) and two Swedish (M203 and M204) patients and controls were stained with a polyclonal goat anti-human SIL1 antibody (Abcam Ltd) detecting a C-terminal epitope. Sections were shortly fixed in -20 °C acetone after which the protocol described below was followed with exception that no antigen retrieval was used. Primary antibody dilution was 1:200.

Paraffin-embedded sections of C57BL mouse tissues of embryonic day 12.5, 15.5, and 18.5, and of postnatal day 5, 14, 60, and 180 were deparaffinized, hydrated, and treated with 10 mmol/l citric acid in microwave oven for 5 min for endogenous antigen retrieval. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% hydrogen peroxide for 5 min, and nonspecific binding was blocked with 1.5% normal serum in 0.1% Tween-phosphate-buffered saline (PBS) for 30–60 min. The primary antibodies were incubated overnight at 4 °C in 0.1% Tween-PBS. Goat anti-human SIL1 antibody (Abcam Ltd) was used in 1:400 dilution (stock 0.50 mg/ml) and rabbit anti-human HSPA5 antibody (Sigma) in 1:1,500 dilution (stock 10.3 mg/ml). Western blot analyses were performed to verify specific cross-reactivity of both antibodies with mouse tissue (data not shown). An avidin-biotin immunoperoxidase system (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories) was utilized to visualize the bound antibody with diaminobenzidine (Sigma) as chromogen. The sections were counterstained with hematoxylin. Non-immune serum or PBS was used instead of the primary antibody for negative controls. The study was approved by the animal care and use committee of the National Public Health Institute, Helsinki, Finland. The work was carried out following the good practice in handling of laboratory animals.

Accession numbers. Human *SIL1*, NM\_022464; Partial human *SIL1*, BG697791, DQ059315, DQ173771, and DQ173772.

*Le gène ADCK3 est muté dans une nouvelle forme  
d'ataxie récessive associée à un  
déficit en coenzyme Q<sub>10</sub>*

## **B. Le gène *ADCK3* est muté dans une nouvelle forme d'ataxie récessive associée à un déficit en coenzyme Q<sub>10</sub>**

### **Manuscrit 4**

*ADCK3, an ancestral kinase involved in coenzyme Q biosynthesis, is mutated in a new form of recessive ataxia.*

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

*En révision.*

### **1. Identification d'un nouveau locus d'ataxie récessive en 1q41-q42**

J'ai utilisé l'approche de cartographie par homozygotie dans une grande famille consanguine d'origine algérienne (Famille 1) suivie par le Dr Meriem Tazir. Cinq frères et sœurs issus de parents cousins au deuxième degré étaient décrits comme atteints d'une ataxie cérébelleuse modérée ayant débuté entre 4 et 11 ans chez les quatre patients les plus âgés. Il faut noter que le plus jeune frère était indiqué comme atteint sur les arbres généalogiques, car à l'âge de 16 ans il décrivait des troubles de l'équilibre avec des chutes. Cependant, l'examen neurologique était normal en dehors d'une abolition des réflexes ostéo-tendineux rotuliens. L'ataxie de Friedreich et l'ataxie avec apraxie oculomotrice de type 1 (AOA1) avaient été préalablement exclues chez ces patients.

J'ai entrepris la *première étape* de localisation à l'aide de puces de génotypage pangénome d'Affymetrix chez les 5 patients. Les résultats ont été visualisés sur une interface graphique développée dans l'institut (HomoSNP) afin de comparer les régions d'homozygotie

entre différents individus. Une seule région d'homozygotie était partagée par les 5 frères et sœurs en 3pter (Manuscrit 4, Supplementary Figure 1). Avec l'aide de Mirna Assoum et de Nathalie Drouot, nous avons réalisé de nombreuses études de génotypage de microsatellites chez les membres sains de cette famille et dans de nombreuses familles consanguines afin d'identifier de nouvelles familles potentiellement liées à ce locus (*étapes 2 et 3*). Cependant, alors que cette étude était en cours, le Dr Meriem Tazir qui a eu l'occasion de réexaminer le plus jeune des patients a pu nous affirmer qu'il avait un examen clinique totalement normal à l'âge de 19 ans, excluant l'hypothèse qu'il ait hérité la même maladie que ses 4 frères et sœurs. Nous avons donc réanalysé les données de génotypage et nous avons identifié une région en 1q41-q42 homozygote chez les 4 patients et hétérozygote chez leur frère sain (Manuscrit 4, Figure 1a).

La *deuxième étape* a été de confirmer la liaison au locus 1q41-q42 dans cette famille par le génotypage de marqueurs microsatellites localisés dans cette région chez l'ensemble de individus de la famille pour lesquels de l'ADN était disponible. En particulier l'étude du père, d'un frère et d'une sœur sains non testés en puces de génotypage, a permis de confirmer la liaison de la maladie en 1q41-q42 dans cette famille (Manuscrit 4, Figure 1b). L'étude des microsatellites n'a pas permis de réduire l'intervalle critique de 12.6 Mb défini par les évènements de recombinaisons survenus chez les patients 1 et 2 (Manuscrit 4, Figure 1b).

La *troisième étape* a été l'étude du locus 1q41-q42 dans de nouvelles familles. Cette étape a été réalisée, avec l'aide de Nathalie Drouot et Mirna Assoum, en génotypant des microsatellites de la région dans 18 familles consanguines et 186 cas isolés issus de parents consanguins. Nous avons identifié une homozygotie en 1q41-q42 chez 13 patients. Il faut noter que cette étape a été réalisée à l'aide de microsatellites car la Famille 1 était la première famille chez laquelle nous avons utilisé des puces de génotypage. Depuis, nous avons réalisé un génotypage pangénome dans de nombreuses familles et certains cas isolés consanguins. L'utilisation du logiciel homoSNP nous permet de comparer les résultats obtenus dans ces familles et de rechercher directement les patients homozygotes à un locus.



## 2. Identification de mutations dans le gène *ADCK3*

La *quatrième étape* de la cartographie par homozygotie correspond à la recherche de mutations dans les gènes localisés dans l'intervalle critique défini par l'analyse de liaison.

L'intervalle de 12.6 Mb identifié contient 89 gènes annotés. J'ai dans un premier temps sélectionné pour le séquençage les gènes codant pour des protéines mitochondriales, car comme nous l'avons vu précédemment, 4 gènes impliqués dans des ataxies récessives codent pour des protéines mitochondriales (Allikmets et al., 1999 ; Campuzano et al., 1996 ; Nikali et al., 2005 ; Van Goethem et al., 2003 ; Winterthun et al., 2005). J'ai identifié une mutation du site donneur d'épissage de l'exon 11 du gène *ADCK3* (pour *aarf Domain Containing Kinase 3* ; également appelé *CABC1* ou *COQ8*) à l'état homozygote chez tous les patients de la Famille 1 (Manuscrit 4, Figure 2a). Cette mutation est responsable d'un épissage aberrant de l'exon 11. En effet, les RT-PCR réalisées à partir de l'ARN extrait des fibroblastes du Patient 3 montrent la présence de trois transcrits anormaux (Manuscrit 4, Figure 2b-d). Un des transcrits correspond au saut de l'exon 11, et les deux autres correspondent à l'utilisation de deux sites cryptiques d'épissage dans l'intron 11, responsables respectivement de l'insertion de 68 et 70 nucléotides. Dans tous les cas, la production d'une protéine tronquée est prédite.

Nous avons séquencé les 14 exons codants du gène *ADCK3* chez 130 patients présentant une ataxie ayant débuté dans l'enfance et chez lesquels l'ataxie de Friedreich avait été préalablement exclue. Nous avons identifié une délétion homozygote de 19 pb avec un décalage du cadre de lecture (c.500\_521del22insTTG) chez un patient algérien issu de parents consanguins, chez qui nous avons trouvé une homozygotie en 1q41-q42 lors de la *troisième étape* (Manuscrit 4, Table 1, Patient 5). Nous avons également identifié à l'état hétérozygote une mutation faux sens (Gly549Ser) dans l'exon 14 associée à un changement nucléotidique dans l'exon 8 ne modifiant pas l'acide aminé codé (993C>T), chez une patiente suivie par le Pr. Christine Tranchant (Manuscrit 4, Table 1, Patient 7). L'analyse de la séquence normale et de la séquence mutée de l'exon 8 avec le logiciel « Exonic Splicing Enhancers Finder (ESEFinder) » prédit l'altération par le changement nucléotidique d'un site exonique régulateur de l'épissage (Cartegni 2003). J'ai confirmé cette prédiction par l'étude en RT-PCR à partir d'ARN extrait d'une lignée lymphoblastoïde de la Patient 7 qui a montré que ce changement nucléotidique était

responsable d'un épissage aberrant avec un saut de l'exon 8 et une délétion en phase de 47 acides aminés (p.Lys314\_Gln360del) (Manuscrit 4, Figure 2e).

Comme je l'ai décrit dans le chapitre sur la biosynthèse du CoQ, les homologues bactériens et de levures d'*ADCK3*, respectivement *UbiB* et *ABC1/COQ8*, codent pour des protéines impliquées dans cette voie de biosynthèse. Nous avons donc établi une collaboration avec l'équipe du Pr Michio Hirano, à l'Université de Columbia, qui venait d'identifier les premières mutations dans des gènes impliqués dans cette voie chez des patients avec un déficit en CoQ<sub>10</sub> (Lopez et al., 2006; Quinzii et al., 2006). Ils ont alors séquencé *ADCK3* chez 11 patients atteints d'une ataxie associée à un déficit en CoQ<sub>10</sub> mesuré sur la biopsie musculaire. Ils ont identifié à l'état hétérozygote composite une mutation faux sens (Tyr514Cys) et une délétion d'un acide aminé (Thr584del) chez un patient précédemment décrit par Lamperti et al. (Lamperti et al., 2003) (Manuscrit 4, Table 1, Patient 6).

Les 7 patients que nous avons décrits présentent un tableau clinique similaire avec une ataxie cérébelleuse modérée ayant débuté entre 3 et 11 ans, et atrophie cérébelleuse à l'IRM (Manuscrit 4, Figure 1c). L'ataxie peut être associée à des réflexes vifs (4/7 patients), des pieds creux (4/7 patients), un retard mental modéré (3/7 patients) et une intolérance à l'exercice avec des lactates sanguins légèrement élevés (3/7 patients) (Manuscrit 4, Table 1). L'évolution des patients est lentement progressive, avec une sévérité qui reste modérée puisqu'après 12 à 34 ans d'évolution de la maladie, tous les patients sont ambulants. L'ataxie cérébelleuse étant au premier plan de cette affection nous avons proposé de l'appeler ARCA2 en référence au syndrome ARCA1 (Autosomal Recessive Cerebellar Ataxia de type 1) récemment décrit et également dominé par une ataxie cérébelleuse (Gros-Louis et al., 2007).

### **3. Exploration de la biosynthèse du CoQ<sub>10</sub> chez les patients ARCA2**

Parmi les 7 patients que nous avons décrits, une biopsie musculaire n'a été réalisée que chez le Patient 6. Un déficit en CoQ<sub>10</sub> ayant été mis en évidence chez ce patient (Lamperti et al., 2003), et en nous basant sur la fonction connue des homologues d'*ADCK3*, nous avons été

amenés à explorer la biosynthèse du CoQ à partir de fibroblastes et/ou de lymphoblastes des autres patients. Le dosage du CoQ<sub>10</sub> par HPLC et une évaluation de la biosynthèse par incorporation d'un précurseur marqué radioactivement ont été réalisés par l'équipe du Pr Michio Hirano. Le CoQ<sub>10</sub> est abaissé dans les fibroblastes des Patients 5 et 6 et dans les lymphoblastes de la Patiente 7. L'incorporation du précurseur est diminué dans les fibroblastes des Patients 5 et 6 (Manuscrit 4, Table 2). Par contre, le dosage du CoQ et l'incorporation du précurseur sont normaux dans les fibroblastes du Patient 3.

L.C. López, de l'équipe de Michio Hirano, a alors utilisé une méthode indirecte pour investir le pool endogène de CoQ<sub>10</sub> à savoir la mesure de l'activité combinée des complexes I+III de la chaîne respiratoire. Celle ci s'est avérée être diminuée dans les fibroblastes des Patients 5, 6, mais également du Patient 3, et cette activité est fortement augmentée en présence de CoQ exogène (Manuscrit 4, Table 2). Les mutations d'*ADCK3* sont donc responsables d'un déficit de la biosynthèse du CoQ<sub>10</sub>. Ce déficit est modéré, en particulier en comparaison au déficit observé sur les fibroblastes de patients porteurs de mutations dans les gènes *COQ2* ou *PDSS2* (Manuscrit 2, Table 2).

#### **4. La famille des protéines ADCK est conservée au cours de l'évolution et appartient à la « super-famille » des kinases atypiques**

Nous avons réalisé une étude bioinformatique des homologues d'*ADCK3* en collaboration avec l'équipe d'Oliver Poch à l'IGBMC. Dans un premier temps, la réalisation de comparaisons de séquences a montré qu'*ADCK3* appartenait à une famille conservée jusque chez les procaryotes, avec 1 homologue chez *E. coli* (UbiB), 3 homologues chez *S. cerevisiae* (ABC1/COQ8, mais également 2 protéines non caractérisées dans la littérature : YLR253W et YPL109C), et 5 paralogues chez l'homme (*ADCK1* à 5). Les homologies de séquences permettent de définir 3 groupes : *ADCK3* et *ADCK4* sont très homologues entre eux et avec d'ABC1/COQ8 ; UbiB et YL253W sont plus proches d'*ADCK1* et 5 ; alors qu'*ADCK2* chez l'homme est homologue à YPL109C chez la levure.

Tous les membres de cette famille possèdent des motifs conservés qui correspondent aux motifs I, II, VIb et VII caractérisant le « noyau universel » des kinases et nécessaire pour la

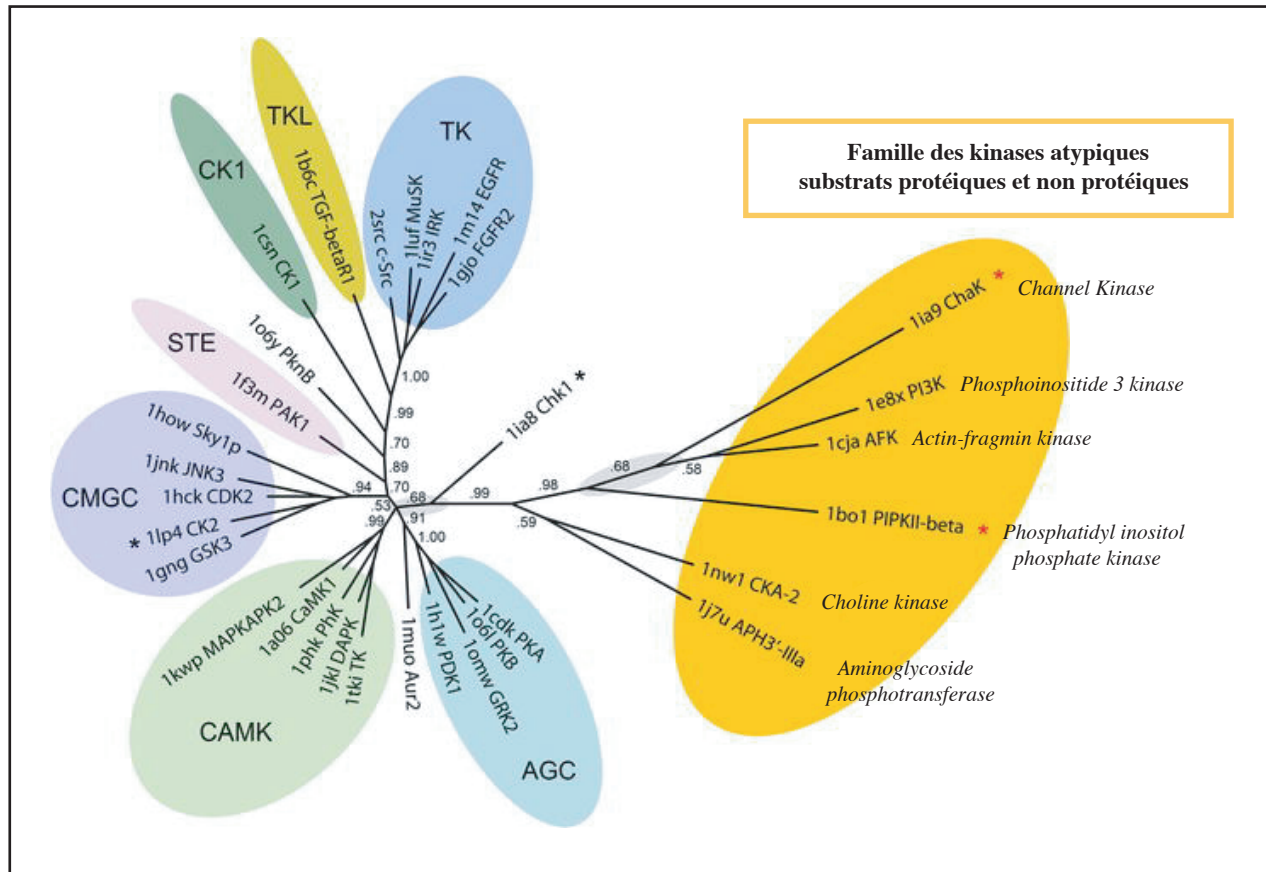
fixation de l'ATP et le transfert du phosphore (Leonard et al., 1998). Cependant, les membres de la famille ADCK ne possèdent pas les motifs C-terminaux VIII à XI habituellement retrouvés dans les protéines kinases classiques (Manuscrit 4, Figure 4a). Ceci est une caractéristique également retrouvée chez les membres de la superfamille des kinases atypiques, ou « protein kinase-like superfamily » décrite par Scheeff et Bourne (Scheeff and Bourne, 2005) (Figure 23). Nous avons réalisé l'alignement de 61 protéines eucaryotes homologues des ADCK, que nous avons comparé à l'alignement de 54 protéines kinases et 106 kinases atypiques. La construction d'un arbre phylogénétique à partir de ces alignements montre que la famille ADCK appartient effectivement à la superfamille des kinases atypiques (Manuscrit 4, Figure 4b et Supplementary Figure 2). Il est intéressant de noter que les substrats de ces kinases atypiques peuvent être des protéines (la protéine ATM mutée dans l'ataxie télangiectasie appartient à cette superfamille), mais qu'ils sont souvent non-protéiques comme pour les choline kinases et les phosphoinositides kinases (Manuscrit 4, Figure 4b et Supplementary Figure 2).

De plus, nous avons identifié un domaine N-terminal commun à toutes les protéines de la famille ADCK avec les résidus invariables Lys276, Glu278 et Gln279 qui n'a d'homologie avec aucun domaine connu. Un domaine en C-terminal est également fortement conservé au sein de chaque sous-groupe décrit précédemment (Manuscrit 4, Figure 4a et Figure 3).

## **5. Analyse de l'effet délétère des mutations non-tronquantes par complémentation de la souche mutante de levure *coq8***

Nous avons identifié trois mutations non-tronquantes chez les patients ARCA2, toutes localisées dans le domaine C-terminal de la protéine (Manuscrit 4, Figure 4a et Figure 3). Nous avons établi une collaboration avec le Dr Mario Barros à Sao Paulo, afin qu'il étudie chez la levure l'impact de ces mutations sur la fonction de la protéine.

Il a introduit les trois mutations (p.Tyr514Cys ; p.Gly549Ser ; p.Thr584del) dans des plasmides contenant le gène *COQ8* de *S. cerevisiae*. Les plasmides wild-type ou porteurs d'une mutation ont été transfectés dans des levures déficientes pour *COQ8*. Comme nous l'avons vu précédemment les levures mutantes *coq* ne poussent pas sur un milieu riche en éthanol et glycérol

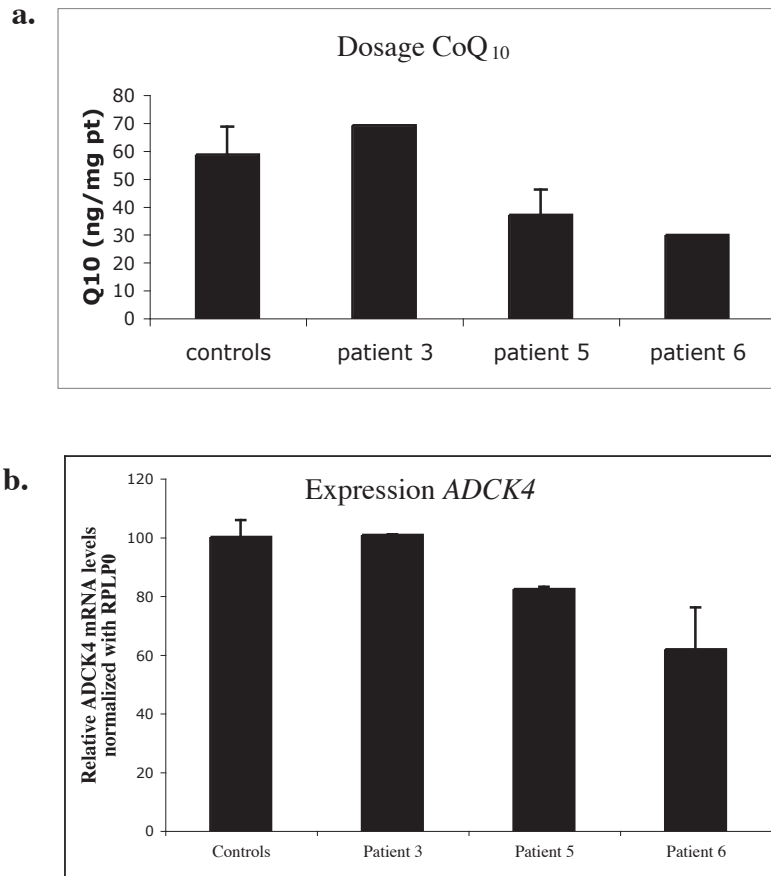


**Figure 23: Phylogénie de la superfamille des kinases atypiques**  
Modifié d'après Sheeff and Bourne, *PLOS Computational Biology*, 2005.

du fait d'un défaut de la respiration qui peut être rétabli par un apport exogène de CoQ. Les souches transfectées avec le plasmide porteur du gène Wild-type ou avec un gène « humanisé » (avec un acide aminé normal correspondant à celui de la protéine humaine à la place du correspondant de la levure) retrouvent leur capacité à pousser sur ce milieu, à l'inverse des souches transfectées avec les différents plasmides mutés (Manuscrit 4, Figure 5a). De même, les souches mutantes *coq8* sont caractérisées par une consommation d'oxygène faible, et une production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> élevée. Un phénotype normal est rétabli lors de la transfection du plasmide wild-type et non lors de la transfection des plasmides mutés (Manuscrit 4, Figure 5b-c). Il faut également noter que l'ajout de CoQ exogène dans le milieu de culture permet de rétablir une croissance sur un milieu riche en éthanol et glycérol, cependant cette croissance reste lente lorsque la transfection est réalisée avec les plasmides mutés, et cette croissance est bien plus lente dans les souches *coq8* que dans les souches *coq2* et *coq7* respectivement caractérisées par une délétion du gène *COQ2* et du gène *COQ7* (Manuscrit 4, Figure 5d).

## 6. Etude de l'expression d'*ADCK4* chez les patients ARCA2

Nous avons identifié *ADCK4* comme étant le paralogue le plus proche d'*ADCK3*. Le phénotype modéré des patients ARCA2, en particulier en comparaison avec les patients présentant des mutations dans *PDSS1*, *PDSS2* ou *COQ2*, pourrait être expliqué par un phénomène de redondance avec la possibilité d'une surexpression compensatrice des paralogues. Nous avons testé cette hypothèse en mesurant l'expression d'*ADCK4* dans les fibroblastes de 3 patients ARCA2. Nous n'avons pas retrouvé de surexpression d'*ADCK4* (Manuscrit 4, Figure 6), et au contraire son expression est diminuée chez les patients qui présentent les taux les plus bas de CoQ<sub>10</sub> (Figure 24). Nous n'expliquons pas ce résultat, mais il est possible qu'une anomalie de l'expression d'*ADCK4* fasse partie des mécanismes physiopathologiques d'ARCA2.



**Figure 24: Dosage du CoQ<sub>10</sub> et expression d'ADCK4 chez les patients ARCA2**

a. Dosage du CoQ dans les fibroblastes de 3 patients ARCA2

Baisse du taux de CoQ chez les patients 5 et 6 et non chez le patient 3.

b. Expression d'ADCK4 dans les fibroblastes de 3 patients ARCA2.

L'expression d'ADCK4 semble corrélée avec les taux de CoQ chez les patients ARCA2

## 7. Conclusion

Pour conclure, nous avons identifié le gène *ADCK3* comme étant responsable d'une nouvelle forme d'ataxie associée à un déficit en coenzyme Q<sub>10</sub> que nous avons appelée ARCA2. L'étude phylogénétique des protéines ADCK montre qu'elles appartiennent à la superfamille des kinases atypiques et qu'elles sont conservées également chez tous les procaryotes (archaebactéries et eubactéries) ce qui n'est pas habituel pour des kinases. L'observation d'un déficit modéré en CoQ<sub>10</sub> chez les patients ARCA2, et l'homologie avec les kinases, permet d'évoquer l'hypothèse qu'*ADCK3* a un rôle régulateur plutôt qu'un rôle enzymatique directement impliqué dans la voie de la biosynthèse du CoQ.



## *Manuscrit 4*

*ADCK3, an ancestral kinase involved in coenzyme Q biosynthesis, is mutated in a new form of recessive ataxia.*

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

*En révision.*

ADCK3, an ancestral kinase, is mutated in a new form of recessive ataxia associated with coenzyme Q<sub>10</sub> deficit.

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

<sup>1</sup>Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/Université Louis Pasteur, 67404 Illkirch ; Hôpitaux Universitaires de Strasbourg; et Collège de France, Paris, France.

<sup>2</sup>Service de Neurologie, Centre Hospitalo-Universitaire Mustapha, Alger 16000, Algeria.

<sup>3</sup>Department of Neurology, Columbia University Medical Center, New York, USA.

<sup>4</sup>Departamento de Microbiologia - ICB-II - Universidade de São Paulo, 05508-900, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>5</sup>Service de Neurologie, Hôpital Ait Idir, Alger, Algeria.

<sup>6</sup>Institut Pasteur d'Alger, Algeria.

<sup>7</sup>Service de Neurologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67091 Strasbourg, France.

<sup>8</sup>Department of Neurology, University of Pennsylvania School of Medicine, and Children's Hospital of Philadelphia, PA 19104-4318, USA.

Running Title: *ADCK3* mutations in recessive ataxia.

Correspondence should be addressed to M.K. ([mkoenig@igbmc.u-strasbg.fr](mailto:mkoenig@igbmc.u-strasbg.fr))

**Abstract:**

Muscle Coenzyme Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub> or ubiquinone) deficiency has been identified in more than 20 patients with presumed autosomal recessive ataxia. However, mutations in genes required for CoQ<sub>10</sub> biosynthetic pathway have been identified only in patients with infantile-onset multisystemic diseases or isolated nephropathy. Our SNP-based genome-wide scan in a large consanguineous family revealed a new locus for autosomal recessive ataxia at chromosome 1q41. The causative mutation is a homozygous splice-site mutation in the Aarf domain contain kinase 3 gene (*ADCK3*). Five additional mutations in *ADCK3* were found in three patients with sporadic ataxia, including one known to have CoQ<sub>10</sub> deficiency in muscle. All of the patients have childhood-onset cerebellar ataxia with slow progression and three of six have mildly elevated lactate levels. *ADCK3* is a mitochondrial protein homologous to the yeast *COQ8* and the bacterial *UbiB* proteins which are required for CoQ biosynthesis. Three out of 4 patients tested showed low endogenous pool of CoQ<sub>10</sub> in their fibroblasts or lymphoblasts and 2 out of 3 patients showed impaired ubiquinone synthesis, strongly suggesting that *ADCK3* is also involved in CoQ<sub>10</sub> biosynthesis. The deleterious nature of the three identified missense changes was confirmed by introducing them at the corresponding positions of the yeast *COQ8* gene. Finally, a phylogenetic analysis shows that *ADCK3* belongs to the family of atypical kinases, which includes phosphoinositide and choline kinases, suggesting that *ADCK3* plays an indirect regulatory role in ubiquinone biosynthesis possibly as part of a feed-back loop that regulates ATP production.

## Introduction

Recessive ataxias are a heterogeneous group of inherited neurodegenerative disorders that affect the cerebellum or the spinocerebellar and sensory tracts of the spinal cord. Several recessive ataxias, including Friedreich ataxia (FRDA [MIM 229300]), appear to be due to defective mitochondrial proteins. In FRDA and sideroblastic anemia/ataxia (ASAT [MIM 301310]), the defective proteins are involved in iron-sulfur cluster biogenesis, while in sensory ataxic neuropathy with dysarthria and ophthalmoparesis (SANDO [MIM 607459]) and in infantile onset spinocerebellar ataxia (IOSCA [MIM 271245]) the defective proteins control mitochondrial DNA homeostasis<sup>1-5</sup>. In addition, recently reported new forms of recessive ataxia are associated with muscle Coenzyme Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) deficiency<sup>6,7</sup> [MIM 607426] and might also involve genes encoding mitochondrial proteins because CoQ<sub>10</sub> is synthesized in mitochondria. CoQ<sub>10</sub> deficiency causes mitochondrial dysfunction since CoQ<sub>10</sub> carries electrons from complex I and complex II to complex III in the mitochondrial respiratory chain. Several forms of human coenzyme Q<sub>10</sub> deficiencies, all characterized by infantile encephalomyopathy, renal failure, or both, have recently been attributed to mutations in specific CoQ<sub>10</sub> biosynthetic proteins (COQ2, PDSS2 and PDSS1)<sup>8-10</sup>. As these were not null mutations, they should allow the production of either partially functional proteins or reduced levels of normal proteins, supporting the view that complete block of CoQ<sub>10</sub> synthesis would not be viable. The genes involved in CoQ (ubiquinone) synthesis were identified by analysis of yeast and bacterial complementation groups of ubiquinone-deficient strains designated *coq1-coq10* and *ubiA-ubiH*, respectively. Most of them (COQ 1-3, 5-7, Ubi A, E-H) correspond to specific enzymatic steps of ubiquinone synthesis<sup>11,12</sup>. Here, we describe the first recessive ataxia due to mutations in a COQ8-UbiB homologue, which most likely has an ancestral regulatory, rather than enzymatic, function.

## Material and Methods

### *Subjects*

We obtained clinical evaluation, blood samples and skin biopsies after written informed consent as defined by the local ethics committees of the University Hospital of Alger, Strasbourg, and the Children's Hospital of Philadelphia. Affected individuals from Family 1 were referred for autosomal recessive cerebellar ataxia and DNA testing for Friedreich ataxia and AOA1 mutations was performed prior to linkage analysis. Primary fibroblasts from skin biopsies were obtained from patients 3, 5 and 6 and immortalized lymphoblastoid cell lines were obtained from patients 3, 5 and 7.

### ***Linkage analysis***

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

### ***Mutational analysis***

Mutational analysis was performed by PCR and direct sequencing of the 14 coding exons and the adjacent intronic junctions of human *ADCK3* gene [NM\_020247] (primers and conditions available on request). PCR products were purified on Montage PCR<sub>96</sub> Cleanup Plates (Millipore, Bedford, MA) and used in sequencing reactions with the ABI BigDye terminator kit (Applied Biosystems), which were subsequently run on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer. Computational analyses of mutations were carried out using Seqscape 2.5 software (Applied Biosystems). Parental segregation of the identified mutations was investigated in all available family members. *ADCK3* exons 8 and 11 splicing was analyzed by RT-PCR. Total RNA was extracted from primary fibroblasts or immortalized lymphoblastoid cells using Trizol according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). Total RNA was reverse transcribed using the Superscript II kit (Invitrogen). PCR amplification was performed using primers located in exon 10 and exon 15 (forward 5'-CACCTGATTGACGTGCTGAG-3', reverse 5'-ATCTTCTCGGTGGTGCTCTG-3') and in exon 7 and exon 12 (forward 5'-CAACCCACCTGGCTAAG-3', reverse 5'-GGGGTCATAGAAGAAGTTGGA-3'). PCR products were separated on a 2% agarose gel and eluted with the Nucleospin extract II kit (Macherey-Nagel) before sequencing with the PCR forward and reverse primers.

### ***ADCK4 mRNA expression analyses by quantitative RT-PCR***

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

### ***CoQ<sub>10</sub> determination and CoQ<sub>10</sub> biosynthesis assay***

Coenzyme Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) in both fibroblasts and lymphoblasts ( $2-3 \times 10^6$  cells) was extracted in hexane and measured by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-EQ)<sup>8,9</sup>. An aliquot of the sample was used for protein determination using the BCA<sup>TM</sup> protein assay kit (Pierce). The results were expressed in ng of CoQ<sub>10</sub>/mg prot. CoQ<sub>10</sub> biosynthesis in fibroblasts was measured by incorporation of labeled parahydroxybenzoate (<sup>14</sup>C-PHB) (450 Ci/mol)<sup>8,9</sup>. After 48 hours of incubation with <sup>14</sup>C-PHB (0.02 mCi/ml) in the culture medium, radiolabeled CoQ<sub>10</sub> was extracted by hexane, isolated by HPLC with a C18 reverse-phase column, and collected and quantified in a scintillation counter. An aliquot of the sample was used for protein determination using the BCA<sup>TM</sup> protein assay kit (Pierce). The results were expressed in DPM/mg-prot/day.

### ***Respiratory chain enzyme activities***

To measure the complex activities, fibroblasts were suspended in cold PBS ( $4-12 \times 10^6$  cells) and sonicated during 10 secondes to disrupt the membranes. An aliquot of the sample was used for protein determination using the BCA<sup>TM</sup> protein assay kit (Pierce). Complexes I + III (CI+III) activity was measured following the reduction of cytochrome c (cyt c) at 550 nm<sup>14</sup>. Briefly,  $4-12 \times 10^4$  cells were incubated at 30°C in a medium containing 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.8), 2 mM EDTA, 1 mg/ml BSA, 500 mM KCN and 100 mM cyt c. After 2 minutes of incubation, the reaction started by addition of 200 mM NADH, and the increase of absorbance is followed for an additional 2 minutes. The residual activity in presence of rotenone (10 mg/ml) was subtracted from total activity. The results were expressed in nmol of reduced cyt c/min/mg-prot. Complex IV (or COX) activity was measured following the reduction of cyt c at 550 nm<sup>14</sup>. Briefly,  $8-24 \times 10^4$  cells were incubate at 30°C in a medium containing 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6.5), 0.25 M sucrose, 1 mg/ml BSA and 0.1 % reduced cyt c, and the reaction was followed during 3 minutes. To inhibit the reaction, 500 mM KCN was used. The results were expressed in nmol of oxidized

cyt *c*/min/mg prot. Citrate synthase (CS) activity was measured following the reduction of 100 mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) at 412 nm (30°C) in the presence of 8-24 x 10<sup>4</sup> cells, 300 mM acetyl CoA, 10 mM Tris-Cl (pH=7.5) and 500 mM oxaloacetic acid<sup>14</sup>. The results were expressed in nmol of TNB/min/mg prot. The results of CI +III and COX activities were normalized to CS activity.

Complex II + III activity was measured by following the reduction of cytochrome *c* at 550 nm.<sup>14</sup> Briefly, 4-12 x 10<sup>4</sup> cells were incubate at 30 °C in medium containing 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> /K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.5), 20 mM succinate, 1.5 KCN, and 2.5 μM rotenone KCN. After 10 min of incubation, the reaction was started adding 50 μM cyt *c*, and increase of absorbance was followed for 2 minutes. The results were expressed in nmol of reduced cyt *c*/min/mg prot and normalized to citrate synthase activity.

Complex III activity was measured following the reduction of cytochrome *c* at 550 nm.<sup>14</sup> Briefly, 8-24 x 10<sup>4</sup> cells were incubate at 30 °C in a medium containing 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.2), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mg/ml BSA, 50 mg/ml Rotenone and 15 μM reduced cyt *c*. After 3 minutes of incubation, the reaction was started by adding 350 μM ubiquinol and the reaction was followed for 2 minutes. The results were expressed in nmol of oxidized cyt *c*/min/mg prot and normalized to citrate synthase activity.

### ***Phylogenetic tree and multiple alignment***

The Uniprot protein sequence database was searched with ADCK3\_HUMAN (647 residues) as a query and a multiple alignment of the detected homologous sequences was constructed with the PipeAlign tool<sup>15</sup>. A structural multiple alignment of the catalytic core domain of representative kinases has been previously proposed<sup>16</sup>, in which 6 atypical kinases and 25 protein kinases were aligned. For each of the 6 structurally aligned atypical kinase sequences, we downloaded from the PFAM<sup>17</sup> database, seed alignments containing atypical kinase core domains, including 16 sequences of phosphatidylinositol phosphate kinase (PIP2K) (PF01504), 8 sequences of Transient receptor potential channel kinase domain (ChaK) (PF02816), 42 sequences of the Phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit (PI3K-PI4K) (PF00454), 7 sequences of the Actin-fragmin kinase (AFK) (PF09192) and 33 sequences of Choline Kinase (CKA-2) (PF01633). In addition, we downloaded a PFAM seed alignment of protein kinases (PF00069) containing 54 sequences. All collected seed alignments and the alignment obtained using ADCK3\_HUMAN as a query were concatenated and aligned on the basis of known protein kinase motifs. The resulting multiple alignment of 221 sequences was manually refined in the SeqLab editor (Wisconsin package, Accelrys).

A phylogenetic tree was constructed with the Neighbor-Joining algorithm implemented in the phylowin program<sup>18</sup> from the aligned sequences using the global gap removal option and 500 bootstrap replicates. The iTOL tool<sup>19</sup> was used to generate the phylogenetic tree.

### ***Yeast experiments***

The *coq8* yeast point mutants were created by PCR using specific primers containing the related human mutations. These new yeast *coq8* alleles were then excised and cloned at the *HindIII* site of YIp352. These constructions were sequenced and the mutations confirmed. The recombinant plasmids were linearized using the internal *NcoI* site of *URA3*, and the linear fragment used to transform the yeast strain W303DelCOQ8 by homologous recombination<sup>20</sup>. Purified individual transformants, the null mutant and the wild type W303-1A (Dr. R Rothstein, RJ – Columbia University) were checked for growth on YPEG (1% yeast extract, 2% peptone, 2% ethanol, 3% glycerol, 2% agar) and YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, 2% agar). Oxygen consumption and peroxide production were measured in yeast spheroplasts, isolated from cells grown on 2% galactose rich media as described elsewhere<sup>21</sup>. Exogenous coenzyme Q<sub>6</sub> was added to a final concentration of 15  $\mu$ M, in YPEG liquid media<sup>22</sup>, growth was monitored by absorbance at 600 nm measurements for 10 days, at the end of which samples were taken and plated on YPD to check for possible contamination.

## **Results**

### ***ADCK3 mutations in ARCA2, a novel ataxia syndrome***

We performed linkage studies on a large consanguineous Algerian family with four individuals affected with childhood onset cerebellar ataxia (Family 1). We analyzed the four patients and one healthy sibling with 10K Affymetrix SNP arrays and identified, with a novel display program (Fig. 1a), a unique region of homozygosity shared by all affected while the healthy sibling was heterozygous. The smallest region of overlap spanned 12.6 Mb on chromosome 1q41-q42 and did not overlap with the posterior column ataxia and retinitis pigmentosa locus (AXPC1 [MIM 609033])<sup>23</sup>, located immediately centromeric (Fig. 1a). The study of a dense set of microsatellite markers from the region in all available members of the family, including the father and 2 additional healthy siblings, confirmed linkage to the 1q41-42 locus (Fig. 1b) with LOD score calculation yielding a maximum 2-point value of 3.9 ( $\theta=0$ ). Since four genes encoding mitochondrial proteins are already known to cause recessive ataxia when defective<sup>1-4</sup>, we prioritized sequencing of genes on the basis of the mitochondrial localization of their encoded products.



We found a homozygous donor splice site mutation (c.1398+2T>C, Fig. 2a) in intron 11 of *ADCK3* (NM\_020247; aarf domain containing kinase 3; also known as *CABC1* [MIM 606980]) that was not present in 192 control chromosomes of North African origin. We carried out RT-PCR analysis of *ADCK3* from fibroblast RNA of Patient 3 and found three splice variants expressed from the mutant allele (Fig. 2b-d). In the shorter variant, exon 10 was skipped resulting in a frameshift (p.Asp420TrpfsX40) (Fig. 2c). In the other variants, two cryptic splice sites in intron 11 were used, resulting in insertions of 68 and 70 nucleotides, with a stop codon after 21 residues (p.Ile467AlafsX22) (Fig. 2d).

Three hundred fifty-three families with non-Friedreich ataxia were either analyzed by homozygosity mapping at 1q41-q42 or by direct sequencing of *ADCK3* coding exons and flanking sequences. We identified five additional mutations (one single amino-acid deletion, one truncating and two missense mutations, and a predicted disruption of an SRp55 exonic splice enhancer) in three sporadic cases (Table 1). The three single amino-acid changes affect conserved residues of the *ADCK3* protein (Fig. 3) and were absent from 480 control chromosomes. Their pathogenicity was subsequently confirmed (see below). The nucleotide change in the predicted exonic splice enhancer<sup>24,25</sup> in exon 8 was also absent from 480 control chromosomes and its consequence was analyzed by RT-PCR from the patient's lymphoblastoid cell line. *ADCK3* transcript analysis revealed an abnormal product corresponding to skipping of exon 8 (Fig. 2e) and leading to an in-frame deletion of 47 amino acids (p.Lys314\_Gln360del). All affected individuals with mutations in *ADCK3* had childhood-onset gait ataxia and cerebellar atrophy (Fig. 1c), with slow progression and few associated features (Table 1). Some patients had brisk tendon reflexes and Hoffmann's sign. Three patients had mild psychomotor retardation, and one patient had mild axonal degeneration of the sural nerve. None had renal dysfunction. Exercise intolerance and elevated serum lactate was present in 3 patients. Since cerebellar ataxia dominates the clinical presentation, we propose to name this entity *ARCA2* (autosomal recessive cerebellar ataxia 2), following the recent identification of *ARCA1* [MIM 610743]<sup>26</sup>.

### ***Coenzyme Q<sub>10</sub> deficiency in ARCA2 patients***

*ADCK3* is a mitochondrial protein<sup>27</sup>, that has yeast (*ABC1/COQ8*) and bacterial (*UbiB*) homologues, which are known to be involved in coenzyme Q (ubiquinone) synthesis on the basis of yeast and bacterial complementation groups of ubiquinone-deficient strains<sup>11,22</sup>. Patient 6 was previously reported to have marked CoQ<sub>10</sub> deficiency in muscle (12.6µg of CoQ<sub>10</sub>/g of fresh tissue; normal values 27.6µg/g ±4.4)<sup>6</sup>, therefore identification of *ADCK3* mutations in this individual indicated that *ADCK3* is also involved in

CoQ synthesis in humans. To confirm this result in the absence of muscle biopsies from the other patients, we analyzed CoQ<sub>10</sub> levels and synthesis in cultured skin fibroblast or lymphoblastoid cell lines from Patients 3, 5, 6 and 7, and found moderate but significant reduction in three (Table 2) and normal level in Patient 3. In addition, since CoQ<sub>10</sub> is the electron carrier from respiratory complexes I and II to complex III, measuring of the combined activity of these enzymes assesses endogenous pools of CoQ<sub>10</sub> in mitochondria. These activities were significantly reduced in the fibroblasts of Patients 5 and 6 and moderately reduced in those of Patient 3. Moreover, addition of a short chain quinone analogue increased significantly complexes I+III activity in the fibroblasts of all patient tested, an indirect demonstration of CoQ<sub>10</sub> deficiency in these cells (Table 2). *ADCK3* mutations were therefore associated with CoQ<sub>10</sub> deficiency, although the defect was very mild in unaffected tissues of ARCA2 patients.

### ***ADCK3 belongs to a superfamily of ancestral protein and non-protein kinases***

ADCK proteins possess the conserved protein kinase motifs<sup>28</sup> corresponding to regions required for ATP binding and for phosphotransfer reaction (the « universal core » consisting of motifs I, II, VIb, and VII), but do not conserve all of the usual kinase motifs (Fig. 4a). In order to gain insights on the origin of the ADCK proteins, we analyzed the sequence of 61 prokaryotic and eukaryotic ADCK homologues and compared them to the sequence of 54 protein kinases and 106 atypical kinases. Based on the phylogenetic analysis of the “universal core” of the ADCK kinases (Fig. 4b and Supplementary Fig. 2) and on the absence of the classical C-terminal motifs (Fig. 4a), we propose that ADCKs belong to the so-called “atypical kinases” of the protein kinase-like superfamily described by Scheeff and Bourne<sup>16</sup>. This superfamily comprises both non-protein kinases, such as phosphoinositide and choline kinases, and atypical protein kinases such as the actin/fragmin kinases (Fig. 4b and Supplementary Fig. 2). The ADCK family comprises five paralogues in human (*ADCK1-5*). *ADCK3* and *ADCK4* are highly similar and appear to result from a gene duplication in vertebrates. In contrast, *ADCK1*, 2, and 5 have split from *ADCK3* and 4 very early during evolution since all eukaryotes and several, but not all, gram-negative bacteria possess at least one representative of each subgroup (Supplementary Fig. 2). Yeast *ABC1/Coq8* is the orthologue of *ADCK3* and 4, while bacterial *UbiB* is more similar to the *ADCK1-ADCK5* subgroup. The “universal core” of ADCKs comprises a highly conserved lysine that binds the alpha phosphate and two highly conserved aspartates that bind the magnesium ions chelated by ATP. Interestingly, the p.Tyr514Cys mutation in Patient 6 is located immediately after the second aspartate (DFG motif or motif VII, Fig. 4a), strongly supporting a pathogenic effect of this amino acid change. The

p.Gly549Ser is located outside the “universal core” but is highly conserved among members of the ADCK3/ADCK4 sub-group (Fig. 3), also supporting a pathogenic effect of the p.Gly549Ser change in Patient 7. Gly549 is part of a C-terminal highly conserved segment, which is divergent not only from the classical protein kinase domain, but also among the different subgroups of the ADCK family (Fig. 4b and Supplementary Fig. 2), suggesting that proteins from each subgroup support a distinct function. On the other hand, all ADCK proteins share a common N-terminal domain (with invariable residues Lys276, Glu278 and Gln279; Fig3 and Fig. 4a ), which is absent from all other protein and non-protein kinases and appears specifically related with ubiquinone metabolism.

#### ***Non-truncating mutations introduced in the yeast ADCK3 homologue result in impaired respiration***

To further assess their pathogenicity, the three mutations resulting in single amino-acid change (p.Tyr514Cys; p.Gly549Ser; and p.Thr584del) were introduced on the yeast *coq8* mutant background. Yeast *coq* mutants grow on glucose but display impaired growth on non-fermentable carbon source (ethanol and glycerol), indicating a defect in respiration that can be rescued by exogenous CoQ<sub>6</sub> supplementation<sup>22</sup>. They produce high levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and display impaired oxygen consumption. The corresponding missense changes and single amino-acid deletion (Phe372Cys ; Gly407Ser ; and Ser444del) were introduced into a yeast *COQ8* expression plasmid by site-directed mutagenesis. Transformation of yeast *Delcoq8* by mutant plasmids failed to restore growth on selective respiratory medium, whereas the wild-type sequence did, confirming the deleterious nature of the mutations (Fig. 5a). Interestingly, replacement of Phe372 by the homologous human amino-acid Tyr (corresponding to Tyr514) in the expression plasmid resulted in rescue when transfected in the *Delcoq8* mutant (Fig. 5a), indicating that these two aromatic residues are interchangeable, a view also supported by their equal occurrence during evolution at this position (Fig. 3). Moreover, oxygen consumption, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and rescue by exogenous CoQ<sub>6</sub> were similar in *Delcoq8* mutants and *Delcoq8* yeast transformed with plasmids carrying the deleterious missense mutations (Fig. 5b-d). However, rescue by exogenous CoQ<sub>6</sub> was not as efficient in *coq8* mutants as in *coq7* or *coq2* mutants (Fig. 5d), which are directly impaired in ubiquinone synthesis.

#### ***Reduced expression of the ADCK4 paralogue correlates with CoQ<sub>10</sub> deficiency in fibroblasts***

In order to test whether compensatory mechanisms regulate *ADCK4* expression in case of *ADCK3* deficiency, we compared *ADCK4* mRNA expression by quantitative RT-PCR in three patient fibroblasts

and in four control fibroblasts. *ADCK4* mRNA level was normal in Patient 3, but paradoxically, was mildly decreased in Patients 5 and 6 (Fig. 6). Since Patient 3 fibroblasts had normal CoQ<sub>10</sub> levels and only moderately reduced complexes I+III activity compared to fibroblasts of Patients 5 and 6 (Table 2), it appears that transcriptional downregulation of *ADCK4* parallels CoQ<sub>10</sub> levels in patient fibroblasts. The results suggest that *ADCK4*, the closest paralogue of *ADCK3*, might also be involved in regulation of CoQ<sub>10</sub> synthesis. Further studies are needed to validate this observation and assess its relevance in affected tissues.

## Discussion

Familial cerebellar ataxia associated with muscle CoQ<sub>10</sub> deficiency was first reported in 2001<sup>29</sup>. Genes coding for enzymes involved in CoQ synthesis were candidates for this new form of ataxia. These genes have been identified by analysis of yeast and bacterial complementation groups of ubiquinone-deficient strains designated *coq1-coq10* and *ubiA-ubiH*, respectively; all have at least one homolog in humans, supporting the concept that CoQ synthesis is a conserved pathway in all species. However, the first human mutations reported in genes encoding CoQ biosynthetic enzymes (PDSS1 and PDSS2 corresponding to COQ1; and COQ2, catalyzing the first two specific steps of CoQ synthesis) were identified in patients with severe infantile-onset encephalomyopathy, renal failure, or both<sup>8-10</sup>, suggesting that direct impairment of CoQ<sub>10</sub> synthesis might not be associated with the milder forms of cerebellar ataxia. In fact, muscle CoQ<sub>10</sub> deficiency was found in some patients with ataxia with ocular apraxia type 1<sup>30</sup> (AOA1 [MIM 208920]), which thus became the first form of genetically defined ataxia to be associated with partial ubiquinone deficiency<sup>31</sup>. The relationship between aprataxin, the nuclear protein defective in AOA1, and muscle CoQ<sub>10</sub> deficiency is not known. Our identification of mutations in *ADCK3*, homologous to yeast COQ8 and to bacterial UbiB, documents for the first time that the defect of a mitochondrial protein involved in CoQ<sub>10</sub> synthesis can cause an almost pure form of autosomal recessive cerebellar ataxia, which we named ARCA2. ARCA2 patients may be distinguished from other recessive ataxias by the presence of cerebellar atrophy with history of exercise intolerance in childhood and elevated serum lactate at rest or after moderate exercise. After excluding the index family, ARCA2 appears to be a rare cause of ataxia among European, US and North African patients. The fact that we found *ADCK3* mutations in a patient with previously reported muscle CoQ<sub>10</sub> deficiency<sup>6</sup> and that other ARCA2 patients had moderate CoQ<sub>10</sub> deficiency in their fibroblast or lymphoblastoid cell lines suggest that *ADCK3* is involved in CoQ synthesis, supporting the view that *ADCK3*, COQ8 and UbiB are

functional homologues. CoQ10 deficiency in ARCA2 patients raises the possibility of supplementation therapy. So far, only one patient (Patient 6)<sup>6</sup> has been treated with doses of CoQ10 from 60 to 700 mg/day over 8 years. The patient reported mild subjective improvement and stabilization of the cerebellar ataxia was observed on examination. In three families, the identification of ADCK3 mutations was made solely on the basis of the ataxic phenotype and without knowledge of muscle CoQ<sub>10</sub> level, indicating that ARCA2 corresponds to a homogeneous syndrome, distinct from syndromes due to direct enzymatic block of CoQ<sub>10</sub> synthesis. The milder presentation of ARCA2 patients compared to patients with enzymatic block of CoQ<sub>10</sub> synthesis might be explained both by the redundancy of ADCK members in the human genome and by an indirect role of ADCK3 in CoQ<sub>10</sub> synthesis. An indirect, regulatory, role is supported by the similarity of the ADCKs with members of the superfamily of the atypical kinases. This finding leaves open the possibility that ADCK substrates might be protein or non-protein molecules, making their identification an even more difficult task. The indirect role of ADCKs in CoQ synthesis is also supported by the delayed rescue by exogenous CoQ<sub>6</sub> of the yeast mutants strain *abc1/coq8*, compared to rescue of the *coq2* or *coq7* mutants, which are defective in *para*-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase and 5-demethoxyubiquinol hydroxylase, respectively<sup>32,33</sup>. The delayed rescue of the *abc1/coq8* mutants compared to *coq2* or *coq7* mutants suggests that ABC1/COQ8 may also act downstream of CoQ production and may regulate additional pathways. Given the central role of CoQ in ATP synthesis, it is tempting to speculate that ADCKs regulate CoQ synthesis by phosphorylating substrates as part of a feedback loop that controls the level of ATP produced. In support of this hypothesis, it was observed that overexpression of ABC1/COQ8 has the ability to rescue other *coq* mutants. Indeed, overexpression of ABC1/COQ8 rescued the growth of *coq10* mutant by doubling the amount of mitochondrial coenzyme Q<sup>34</sup>, and also suppressed a missense mutant of *coq9*<sup>35</sup>. Furthermore, in *coq* mutants there is global depletion of COQ3, COQ4, COQ6, COQ7 and COQ9, which appear to be part of a protein complex<sup>20,36</sup>, but not of COQ8, indicating that it is not part of the complex but affects its stability<sup>36</sup>. Despite the independent identification of aarF domain containing kinases (ADCKs) in 1998<sup>28,37</sup>, their substrates have remained elusive. The identification of mutations in one ADCK member in cerebellar ataxia patients will certainly stimulate research on this family of ancestral kinases, in order to decipher the corresponding regulation network and its relation with CoQ biosynthesis.

## **Acknowledgments**

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

## **Web Resources**

Accession numbers and URLs for data presented herein are as follows:

Ensembl Genome Browser, <http://www.ensembl.org/index.html>

Genebank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>

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

UCSC Genome Browser, <http://www.genome.ucsc.edu>

Exonic splicing enhancers Finder (ESEFinder), <http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>

Interactive Tree of Live (ITOL), <http://itol.embl.de/index.shtml>

## References

1. Campuzano V, Montermini L, Molto MD, Pianese L, Cossee M, Cavalcanti F, Monros E, Rodius F, Duclos F, Monticelli A, et al. (1996) Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 271:1423-1427
2. Allikmets R, Raskind WH, Hutchinson A, Schueck ND, Dean M, Koeller DM (1999) Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A). *Hum Mol Genet* 8:743-749
3. Nikali K, Suomalainen A, Saharinen J, Kuokkanen M, Spelbrink JN, Lonnqvist T, Peltonen L (2005) Infantile onset spinocerebellar ataxia is caused by recessive mutations in mitochondrial proteins Twinkle and Twinky. *Hum Mol Genet* 14:2981-2990
4. Van Goethem G, Martin JJ, Dermaut B, Lofgren A, Wibail A, Ververken D, Tack P, Dehaene I, Van Zandijcke M, Moonen M, et al. (2003) Recessive POLG mutations presenting with sensory and ataxic neuropathy in compound heterozygote patients with progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscul Disord* 13:133-142
5. Winterthun S, Ferrari G, He L, Taylor RW, Zeviani M, Turnbull DM, Engelsens BA, Moen G, Bindoff LA (2005) Autosomal recessive mitochondrial ataxic syndrome due to mitochondrial polymerase gamma mutations. *Neurology* 64:1204-1208
6. Lamperti C, Naini A, Hirano M, De Vivo DC, Bertini E, Servidei S, Valeriani M, Lynch D, Banwell B, Berg M, et al. (2003) Cerebellar ataxia and coenzyme Q10 deficiency. *Neurology* 60:1206-1208
7. Aure K, Benoist JF, Ogier de Baulny H, Romero NB, Rigal O, Lombes A (2004) Progression despite replacement of a myopathic form of coenzyme Q10 defect. *Neurology* 63:727-729
8. Quinzii C, Naini A, Salviati L, Trevisson E, Navas P, Dimauro S, Hirano M (2006) A Mutation in Para-Hydroxybenzoate-Polyprenyl Transferase (COQ2) Causes Primary Coenzyme Q10 Deficiency. *Am J Hum Genet* 78:345-349
9. Lopez LC, Schuelke M, Quinzii CM, Kanki T, Rodenburg RJ, Naini A, Dimauro S, Hirano M (2006) Leigh syndrome with nephropathy and CoQ10 deficiency due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) mutations. *Am J Hum Genet* 79:1125-1129
10. Mollet J, Giurgea I, Schlemmer D, Dallner G, Chretien D, Delahodde A, Bacq D, de Lonlay P, Munnich A, Rotig A (2007) Prenyldiphosphate synthase, subunit 1 (PDSS1) and OH-benzoate

polyprenyltransferase (COQ2) mutations in ubiquinone deficiency and oxidative phosphorylation disorders. *J Clin Invest* 117:765-772

11. Poon WW, Davis DE, Ha HT, Jonassen T, Rather PN, Clarke CF (2000) Identification of *Escherichia coli* ubiB, a gene required for the first monooxygenase step in ubiquinone biosynthesis. *J Bacteriol* 182:5139-5146
12. Tran UC, Clarke CF (2007) Endogenous synthesis of coenzyme Q in eukaryotes. *Mitochondrion* 7 Suppl:S62-71
13. Lagier-Tourenne C, Tranebaerg L, Chaigne D, Gribaa M, Dollfus H, Silvestri G, Betard C, Warter JM, Koenig M (2003) Homozygosity mapping of Marinesco-Sjogren syndrome to 5q31. *Eur J Hum Genet* 11:770-778
14. Barrientos A (2002) In vivo and in organello assessment of OXPHOS activities. *Methods* 26:307-316
15. Plewniak F, Bianchetti L, Brelivet Y, Carles A, Chalmel F, Lecompte O, Mochel T, Moulinier L, Muller A, Muller J, et al. (2003) PipeAlign: A new toolkit for protein family analysis. *Nucleic Acids Res* 31:3829-3832
16. Scheeff ED, Bourne PE (2005) Structural evolution of the protein kinase-like superfamily. *PLoS Comput Biol* 1:e49
17. Finn RD, Mistry J, Schuster-Bockler B, Griffiths-Jones S, Hollich V, Lassmann T, Moxon S, Marshall M, Khanna A, Durbin R, et al. (2006) Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res* 34:D247-251
18. Galtier N, Gouy M, Gautier C (1996) SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci* 12:543-548
19. Letunic I, Bork P (2007) Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* 23:127-128
20. Hsu AY, Do TQ, Lee PT, Clarke CF (2000) Genetic evidence for a multi-subunit complex in the O-methyltransferase steps of coenzyme Q biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1484:287-297
21. Tahara EB, Barros MH, Oliveira GA, Netto LE, Kowaltowski AJ (2007) Dihydrolipoyl dehydrogenase as a source of reactive oxygen species inhibited by caloric restriction and involved in *Saccharomyces cerevisiae* aging. *Faseb J* 21:274-283
22. Do TQ, Hsu AY, Jonassen T, Lee PT, Clarke CF (2001) A defect in coenzyme Q biosynthesis is responsible for the respiratory deficiency in *Saccharomyces cerevisiae* abc1 mutants. *J Biol Chem* 276:18161-18168



23. Higgins JJ, Morton DH, Loveless JM (1999) Posterior column ataxia with retinitis pigmentosa (AXPC1) maps to chromosome 1q31-q32. *Neurology* 52:146-150
24. Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR (2003) ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res* 31:3568-3571
25. Smith PJ, Zhang C, Wang J, Chew SL, Zhang MQ, Krainer AR (2006) An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. *Hum Mol Genet* 15:2490-2508
26. Gros-Louis F, Dupre N, Dion P, Fox MA, Laurent S, Verreault S, Sanes JR, Bouchard JP, Rouleau GA (2007) Mutations in SYNE1 lead to a newly discovered form of autosomal recessive cerebellar ataxia. *Nat Genet* 39:80-85
27. Iizumi M, Arakawa H, Mori T, Ando A, Nakamura Y (2002) Isolation of a novel gene, CABC1, encoding a mitochondrial protein that is highly homologous to yeast activity of bc1 complex. *Cancer Res* 62:1246-1250
28. Leonard CJ, Aravind L, Koonin EV (1998) Novel families of putative protein kinases in bacteria and archaea: evolution of the "eukaryotic" protein kinase superfamily. *Genome Res* 8:1038-1047
29. Musumeci O, Naini A, Slonim AE, Skavin N, Hadjigeorgiou GL, Krawiecki N, Weissman BM, Tsao CY, Mendell JR, Shanske S, et al. (2001) Familial cerebellar ataxia with muscle coenzyme Q10 deficiency. *Neurology* 56:849-855
30. Le Ber I, Dubourg O, Benoist JF, Jardel C, Mochel F, Koenig M, Brice A, Lombes A, Durr A (2007) Muscle coenzyme Q10 deficiencies in ataxia with oculomotor apraxia 1. *Neurology* 68:295-297
31. Quinzii CM, Kattah AG, Naini A, Akman HO, Mootha VK, DiMauro S, Hirano M (2005) Coenzyme Q deficiency and cerebellar ataxia associated with an aprataxin mutation. *Neurology* 64:539-541
32. Ashby MN, Kutsunai SY, Ackerman S, Tzagoloff A, Edwards PA (1992) COQ2 is a candidate for the structural gene encoding para-hydroxybenzoate:polyprenyltransferase. *J Biol Chem* 267:4128-4136
33. Marbois BN, Clarke CF (1996) The COQ7 gene encodes a protein in *Saccharomyces cerevisiae* necessary for ubiquinone biosynthesis. *J Biol Chem* 271:2995-3004
34. Barros MH, Johnson A, Gin P, Marbois BN, Clarke CF, Tzagoloff A (2005) The *Saccharomyces cerevisiae* COQ10 gene encodes a START domain protein required for function of coenzyme Q in respiration. *J Biol Chem* 280:42627-42635

35. Johnson A, Gin P, Marbois BN, Hsieh EJ, Wu M, Barros MH, Clarke CF, Tzagoloff A (2005) COQ9, a new gene required for the biosynthesis of coenzyme Q in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280:31397-31404
36. Hsieh EJ, Gin P, Gulmezian M, Tran UC, Saiki R, Marbois BN, Clarke CF (2007) *Saccharomyces cerevisiae* Coq9 polypeptide is a subunit of the mitochondrial coenzyme Q biosynthetic complex. *Arch Biochem Biophys* 463:19-26
37. Macinga DR, Cook GM, Poole RK, Rather PN (1998) Identification and characterization of *aarF*, a locus required for production of ubiquinone in *Providencia stuartii* and *Escherichia coli* and for expression of 2'-N-acetyltransferase in *P. stuartii*. *J Bacteriol* 180:128-135

Table 1 : ADCK3 mutations and clinical features in ARCA2 patients.

	Family 1				Family 2	Family 3	Family 4
	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6 (a)	Patient 7
Sex	M	M	M	F	M	M	F
Origin	Algeria	Algeria	Algeria	Algeria	Algeria	USA	France/ Algeria
Mutation	Homo c.1398+2T>C	Homo c.1398+2T>C	Homo c.1398+2T>C	Homo c.1398+2T>C	Homo c.500_521 delinsTTG	Hetero c.[1541A>G] + [1750_1752delACC]	Hetero c.[993C>T] + [1645G>A]
location	Intron 11	Intron 11	Intron 11	Intron 11	Exon 3	Exons 13 and 15	Exons 8 and 14
Predicted amino acid change	p.[Asp420TrpfsX40,Ile467A1afsX22]	p.[Asp420TrpfsX40,Ile467A1afsX22]	p.[Asp420TrpfsX40,Ile467A1afsX22]	p.[Asp420TrpfsX40,Ile467A1afsX22]	p.Gln167LeufsX36	p.[Tyr514Cys]+[Thr584del]	p.[Lys314_Gln360del]+[Gly549Ser]
Age of onset	11	4	7	8	4	5	3
Disease duration	31	34	29	21	14	12	27
Cerebellar ataxia	+	+	+	+	+	+	+
Cerebellar atrophy	+	+	+	+	+	+	NA
Disability stage	3	3	3	3	3	3	3
Exercise intolerance	-	+	+	+	-	NA	NA
Reflexes	Absent ankle jerks	Normal	Brisk	Brisk	Normal	Brisk	Brisk
Hoffmann's sign	-	-	-	+	-	+	-
Babinski sign	-	-	-	-	-	-	-
Pes cavus	+	+	-	+	+	-	+
Mental retardation	-	Mild	-	-	Mild	-	Moderate IQ : 54
Lactic acidosis in mmol/l	NA	3.3 (N=0.5-2.2)	2.9 (N=0.5-2.2)	1.8-7.8 (N=0.5-2.2)	1.29 (N=0.5-2.2)	0.7 (N=0.5-2.2)	0.98 (N=1-1.7)
EMG	Normal	Normal	Normal	Normal	Mild axonal neuropathy	NA	Normal
Muscle biopsy	NA	NA	NA	NA	NA	Mild non specific changes	NA
Miscellaneous						Gynecomastia Feet and thumbs in dystonic position	Mild hearing loss

M=Male; F=Female; NA=not available; EMG=Electromyography; Disability stage grade 3: moderate, unable to run, limited walking without aid, in a scale from 0 (no signs or symptoms handicap) to 7 (bedridden). (a) Patient 6 is individual 8 in reference 6.

Table 2: Coenzyme Q<sub>10</sub> and respiratory chain enzyme activities in ARCA2 patients

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

Abnormal values are shown in bold. When experiments were done more than once, values are given as means +/-sem. CI= complex I (NADH ubiquinone oxidoreductase), CII= complex II (Succinate ubiquinone oxidoreductase), CIII= complex III (ubiquinol cytochrome c oxidoreductase), COX= cytochrome c oxidase, CS= citrate synthase, CoQ<sub>2</sub>= Coenzyme Q<sub>2</sub> (strong rescue by CoQ<sub>2</sub> is indicative of CoQ deficiency), DPM= Decays per minute. (a) This patient with *COQ2* mutations was previously described<sup>8</sup>. (b) This patient with *PDSS2* mutations was previously described<sup>9</sup>. (c) by incorporation of <sup>14</sup>C-PHB (parahydroxybenzoate).

## Figure legends

Figure 1: Genotyping and imaging results of ARCA2 families

- a. SNP results of Family 1 for the chromosome 1q41-q42 region. Graphic interface (HomoSNP software) for visualization of shared regions of homozygosity in consanguineous families. The top horizontal bar indicates the position of recessive ataxia loci and genes. Subsequent bars indicate individual results of the children represented on the left. The regions with more than 25 consecutive homozygous SNP are in black. The regions of heterozygosity (less than 25 consecutive homozygous SNP) are in grey. The 4 affected siblings in Family 1 share a region of homozygosity by descent on chromosome 1q41-q42. The *AXPC1* locus is centromeric to this region of homozygosity.
- b. Microsatellite analysis at chromosome 1q41-q42 in all available Family 1 members. Markers are indicated on the left and are organized from top to bottom in the centromeric to telomeric order. Results of the four critical SNPs that define the two recombination boundaries are also indicated. Parental haplotypes linked with the disease are boxed. The region of homozygosity by descent is shaded in grey. Haplotype segregation confirms linkage between the 1q41-q42 locus and the disease in this family and defines a 12.6 Mb critical interval.
- c. Sagittal T1-weighted brain magnetic resonance imaging of Patient 4 (Family 1) and Patient 5 (Family 2) showing cerebellar atrophy and mild cerebral atrophy.

Figure 2: Altered splicing of *ADCK3* exon 11 in Family 1 and exon 8 in Family 4.

- a. Genomic sequence of *ADCK3* exon-intron 11 boundary of a control individual, of the father and Patient 3 of Family 1. The patient is homozygous for the donor splice site mutation 1398+2T>C. The healthy father is heterozygous for this mutation.
- b. Analysis of RT-PCR products of Patient 3 fibroblasts. The 1398+2T>C mutation affects exon 11 splicing and results in the production of two major bands on agarose gel, of 442 and 654 bp, respectively, while the product obtained from a control individual has a size of 584 bp. A faint band migrating between products 1 and 2 was shown by sequencing to correspond to heteroduplexes of products 1 and 2 (data not shown).
- c. Sequence of product 1 after elution from agarose gel. Product 1 corresponds to skipping of exon 11 leading to a frameshift with a predicted truncated protein (p.Asp420TrpfsX40).

- d. Sequence of product 2 after elution from agarose gel. Product 2 corresponds to the use of two cryptic splice sites in intron 11 leading to the insertion of 68 and 70 nucleotides (nt), respectively. The sequence of the two alternative products is indicated above the chromatogram. The respective position of the two cryptic donor splice sites is indicated below the chromatogram (underlined). In both cases, 21 amino acids are inserted before an in frame stop codon (circled) leading to a predicted truncated protein (Ile467AlafsX22).
- e. Analysis of RT-PCR products of Patient 7 lymphoblastoid cells. The c.993C>T mutation partially affects exon 8 splicing and results in the production of an abnormal product of 487 bp on agarose gel while only a normal product of 628 bp is seen in control lymphoblastoid cells. The abnormal product corresponds to skipping of exon 8 leading to an in-frame deletion of 47 amino acids (p.Lys314\_Gln360del). The faint intermediate band was shown by sequencing to correspond to heteroduplexes (data not shown).

Figure 3: Conservation of amino-acids mutated in ARCA2 patients among ADCK3-ADCK4 protein sequences

SPTREMBL accession numbers are indicated on the left. *cabcl\_human* and *q96d53\_human* correspond to ADCK3 and ADCK4, respectively. *Xenla*=*Xenopus laevis*; *brare*=*Brachydanio rerio*; *tetng*=*Tetraodon nigroviridis*; *drome*=*Drosophila melanogaster*; *caeel*=*Caenorhabditis elegans*; *dicdi*=*Dictyostelium discoideum*; *yeast*=*Saccharomyces cerevisiae*; *schpo*=*Schizosaccharomyces pombe*; *arath*=*Arabidopsis thaliana*; *plaf7*=*Plasmodium falciparum*; *jansc*=*Jannaschia* sp. Amino-acid numbering corresponds to human ADCK3. Dots and stars indicate variable degrees of phylogenetic conservation. Conserved amino-acids are colored according to amino-acid class (ClustalX). The N-terminal motif conserved in all members of the ADCK family (KxGK at positions 276-9) and the kinase motif VII (DFG at positions 507-9) are overlined in red. Non-truncating mutations identified in ARCA2 patients (p.Tyr514Cys ; p.Gly549Ser ; and p.Thr584del) are indicated with arrows. a. ClustalX sequence alignments of ADCK specific N-terminal domain. b. ClustalX sequence alignments of ADCK3-ADCK4 specific C-terminal domain.

Figure 4: Domain organisation and phylogeny of ADCK proteins

- a. Motif conservation in typical protein kinases and in ADCK proteins. Consensus of the 8 most conserved motifs of the typical protein kinases are indicated on top. Motifs which share homology

with ADCKs motifs are indicated in red. Consensus of ADCK motifs are indicated below, with amino-acid positions corresponding to human ADCK3. ADCK domains are depicted on the diagram : blue rectangle, N-terminal domain conserved among all members of the ADCK family and containing the KxGQ motif; red ovals indicate the position of the conserved kinase motifs; yellow rectangle, C-terminal domain specific for each ADCK subgroups. The position of single amino-acid changes found in ARCA2 patients is indicated at the bottom.

- b. Phylogenetic tree of typical and atypical protein kinases. Typical protein kinases are clustered in a single group. ADCK proteins are clustered in four groups. The UbiB group corresponds to the bacterial ADCKs and to the chloroplastic bacterial-like ADCKs. PI4KII, Phosphatidylinositol 4 kinase type 2 ; AFK, Actin-Fragmin Kinase; ChaK, transient receptor potential Channel Kinase; PIPK, Phosphatidylinositol Phosphate Kinase; PI3K-PI4K, Phosphatidylinositol 3 and 4 Kinases and related protein kinases.

Figure 5: *Coq8* null yeast phenotype was not rescued by transfection with plasmids carrying the non-truncating mutations identified in ARCA2 patients.

- a. Serial dilutions of the wild type AW303, the *coq8* null mutant (*Dcoq8=Delcoq8*), and the mutant transformed with yeast wild type *COQ8* or with yeast *coq8* non-truncating mutations, were spotted on rich glucose (YPD) and rich ethanol/glycerol (YPEG) plates. Growth on non-fermentable carbon source (YPEG) was not restored by mutant *coq8*, but was rescued by the wild-type sequence and by the F372Y construct corresponding to the replacement of F372 by the homologous human amino-acid (Y at the human position 514).
- b. Oxygen consumption is impaired in *coq8* null mutant (*Dcoq8*) and in *Dcoq8* yeast transformed with plasmids carrying the deleterious mutations.
- c. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production is elevated in *coq8* deficient strains. Impaired oxygen consumption and increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production are indicative of respiratory chain dysfunction.
- d. Exogenous Coenzyme Q (CoQ<sub>6</sub>) respiratory growth rescue. Rescue was similar in *Dcoq8* strain and in *Dcoq8* yeast transformed with mutated plasmids, and was less efficient than rescue of *coq7* and *coq2* yeast mutants.

Figure 6: Absence of *ADCK4* induction in *ADCK3* deficient fibroblasts

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

#### Supplementary Figure 1: Genotyping results of the genomewide scan in Family 1

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

#### Supplementary Figure 2: Phylogenetic tree of typical and atypical protein kinases.

Enlargement of Figure 3b showing SPTREMBL accession numbers. For the non-ADCK proteins, the amino-acid position of the kinase "core domain" used for sequence alignment is also indicated. The human ADCKs are : ADCK1 = ADCK1, ADCK2 = Q7Z695, ADCK3 = CABC1, ADCK4 = Q96D53, ADCK5 = Q3MIX3; the *S. cerevisiae* (yeast) ADCKs are : ADCK1-5-like = YL253, ADCK2-like = YP109, ADCK3-4-like = ABC1; the *Jannaschia* sp. (gram negative bacteria) ADCKs are : ADCK1-5 like = Q28JI7, ADCK3-4-like = Q28MM0. Several other alpha-, beta-, and gamma- proteobacteria (gram negative bacteria) also had one representative of each subgroup (ADCK1-5 and ADCK3-4; not shown)



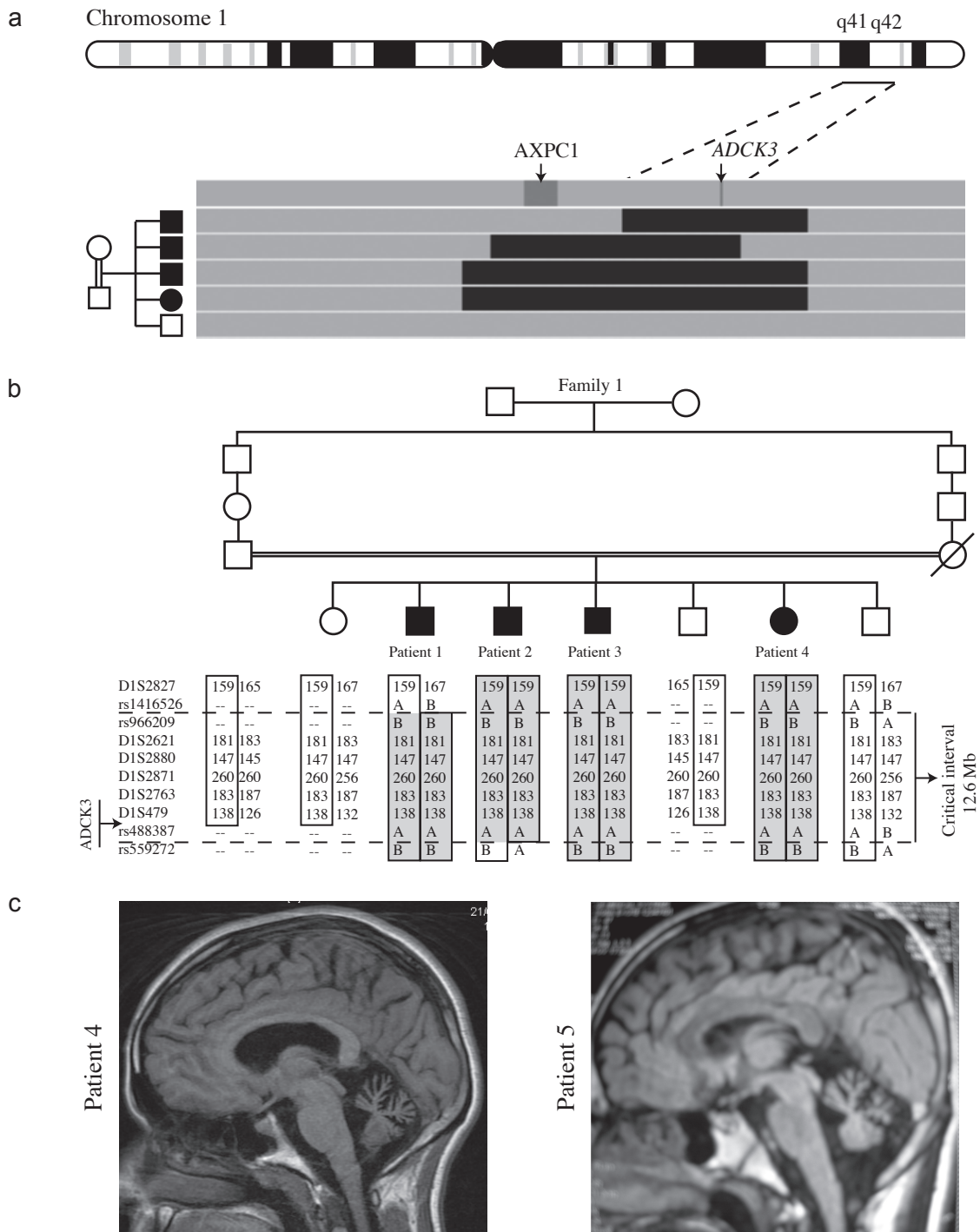


Figure 1: Genotyping and imaging results of ARCA2 families

a. SNP results of Family 1 for the chromosome 1q41-q42 region. Graphic interface (HomoSNP software) for visualization of shared regions of homozygosity in consanguineous families. The top horizontal bar indicates the position of recessive ataxia loci and genes. Subsequent bars indicate individual results of the children represented on the left. The regions with more than 25 consecutive homozygous SNP are in black. The regions of heterozygosity (less than 25 consecutive homozygous SNP) are in grey. The 4 affected siblings in Family 1 share a region of homozygosity by descent on chromosome 1q41-q42. The AXPC1 locus is centromeric to this region of homozygosity.

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

c. Sagittal T1-weighted brain magnetic resonance imaging of Patient 4 (Family 1) and Patient 5 (Family 2) showing cerebellar atrophy and mild cerebral atrophy.

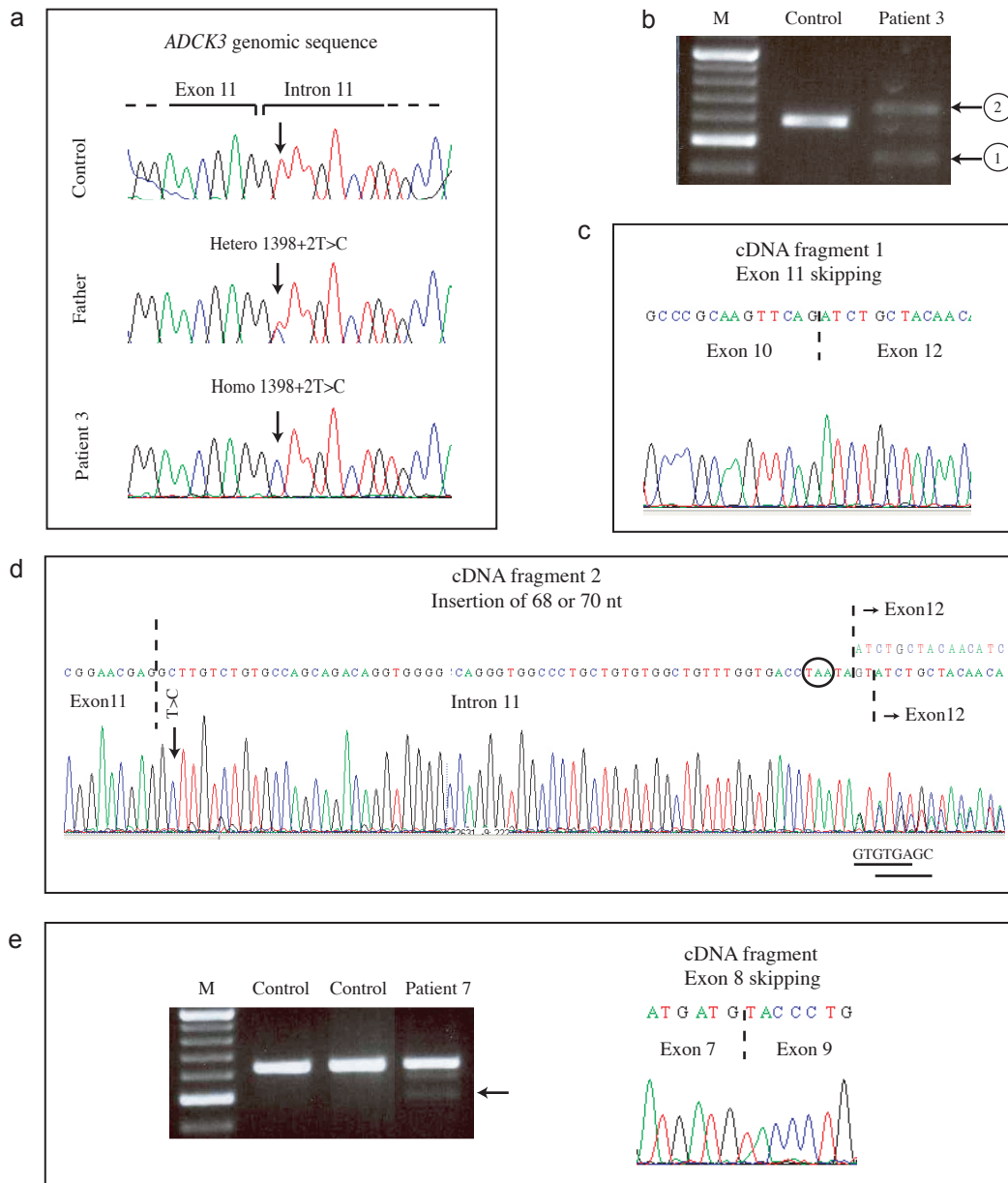


Figure 2: Altered splicing of *ADCK3* exon 11 in Family 1 and exon 8 in Family 4.

- a. Genomic sequence of *ADCK3* exon-intron 11 boundary of a control individual, of the father and Patient 3 of Family 1. The patient is homozygous for the donor splice site mutation 1398+2T>C. The healthy father is heterozygous for this mutation.
- b. Analysis of RT-PCR products of Patient 3 fibroblasts. The 1398+2T>C mutation affects exon 11 splicing and results in the production of two major bands on agarose gel, of 442 and 654 bp, respectively, while the product obtained from a control individual has a size of 584 bp. A faint band migrating between products 1 and 2 was shown by sequencing to correspond to heteroduplexes of products 1 and 2 (data not shown).
- c. Sequence of product 1 after elution from agarose gel. Product 1 corresponds to skipping of exon 11 leading to a frameshift with a predicted truncated protein (p.Asp420TrpfsX40).
- d. Sequence of product 2 after elution from agarose gel. Product 2 corresponds to the use of two cryptic splice sites in intron 11 leading to the insertion of 68 and 70 nucleotides (nt), respectively. The sequence of the two alternative products is indicated above the chromatogram. The respective position of the two cryptic donor splice sites is indicated below the chromatogram (underlined). In both cases, 21 amino acids are inserted before an in frame stop codon (circled) leading to a predicted truncated protein (Ile467AlafsX22).
- e. Analysis of RT-PCR products of Patient 7 lymphoblastoid cells. The c.993C>T mutation partially affects exon 8 splicing and results in the production of an abnormal product of 487 bp on agarose gel while only a normal product of 628 bp is seen in control lymphoblastoid cells. The abnormal product corresponds to skipping of exon 8 leading to an in-frame deletion of 47 amino acids (p.Lys314\_Gln360del).

The faint intermediate band was shown by sequencing to correspond to heteroduplexes (data not shown).

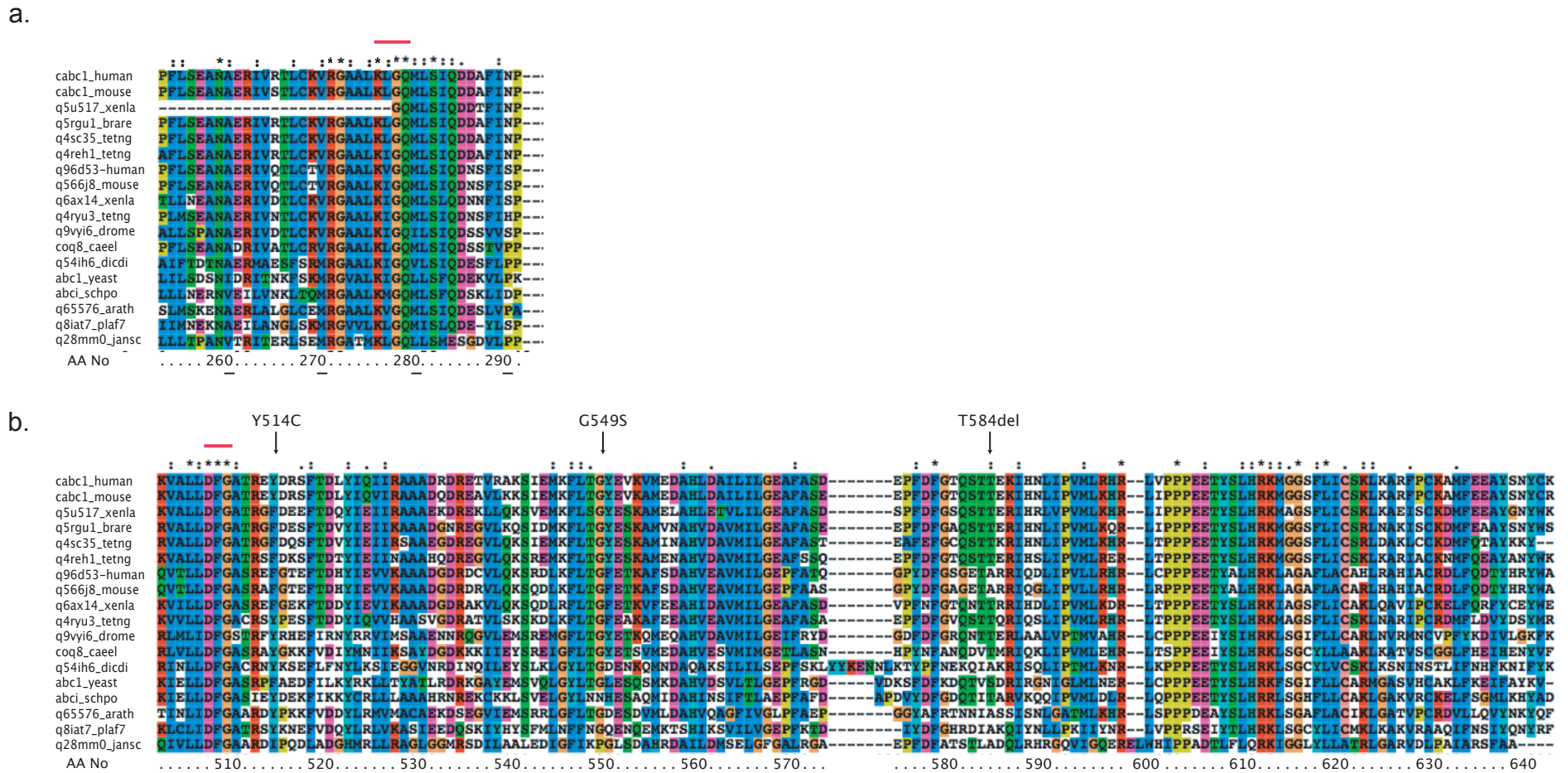


Figure 3: Conservation of amino-acids mutated in ARCA2 patients among ADCK3-ADCK4 protein sequences

SPTREMBL accession numbers are indicated on the left. cabcl1\_human and q96d53\_human correspond to ADCK3 and ADCK4, respectively. Xenla=Xenopus laevis; brare=Brachydanio rerio; tetng=Tetraodon nigroviridis; drome=Drosophila melanogaster; caehl=Caenorhabditis elegans; dicdi=Dictyostelium discoideum; yeast=Saccharomyces cerevisiae; schpo=Schizosaccharomyces pombe; arath=Arabidopsis thaliana; plaf7=Plasmodium falciparum; jansc= Jannaschia sp. Amino-acid numbering corresponds to human ADCK3. Dots and stars indicate variable degrees of phylogenetic conservation. Conserved amino-acids are colored according to amino-acid class (ClustalX). The N-terminal motif conserved in all members of the ADCK family (KxGK at positions 276-9) and the kinase motif VII (DFG at positions 507-9) are overlined in red. Non-truncating mutations identified in ARCA2 patients (p.Tyr514Cys ; p.Gly549Ser ; and p.Thr584del) are indicated with arrows.

a. ClustalX sequence alignments of ADCK specific N-terminal domain.

b. ClustalX sequence alignments of ADCK3-ADCK4 specific C-terminal domain.

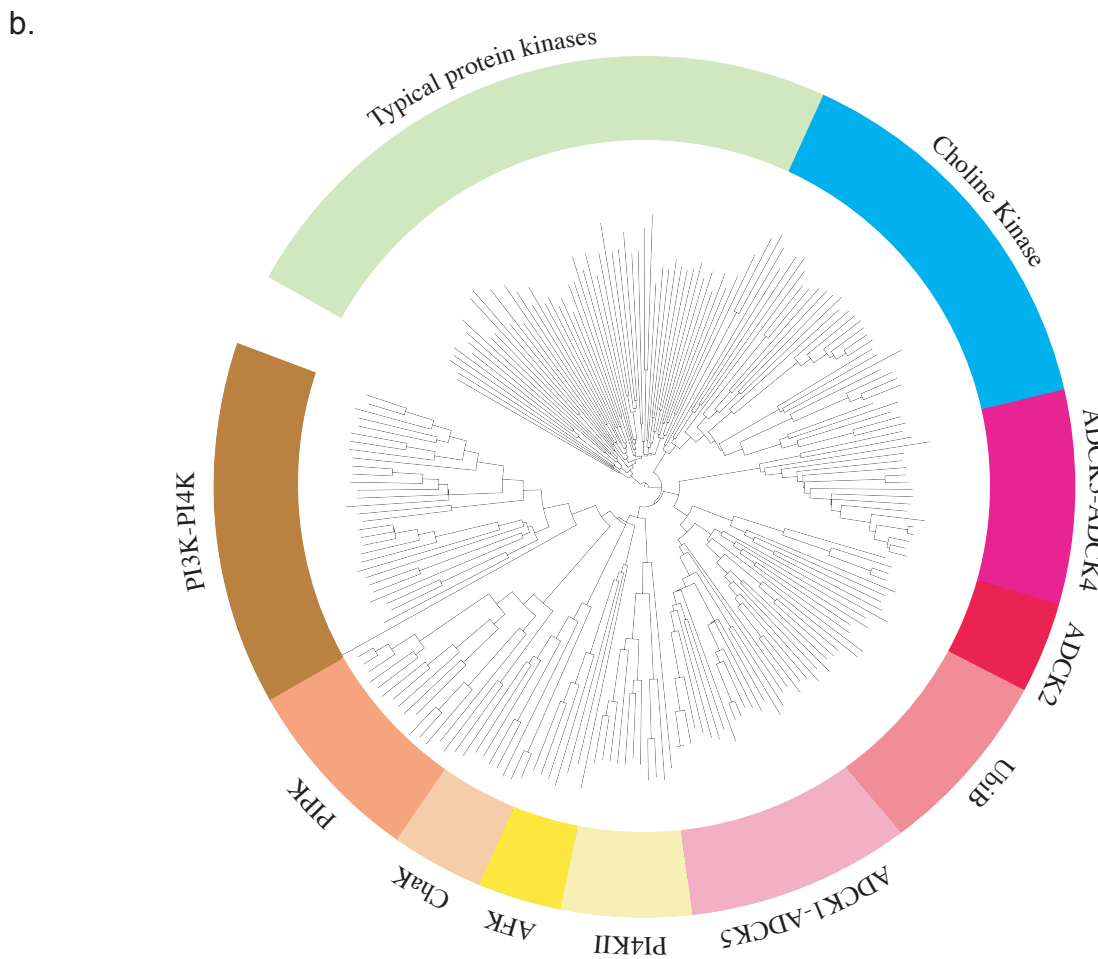
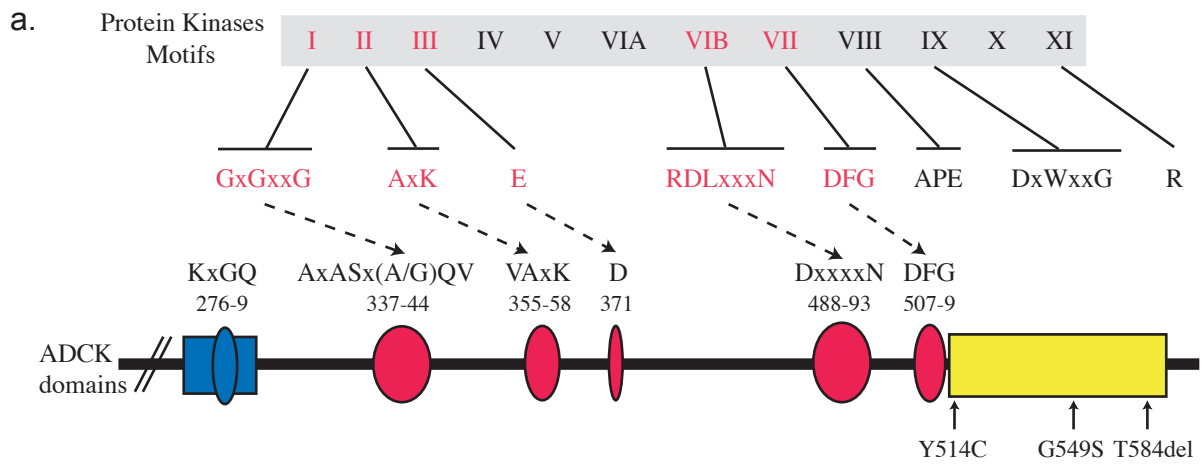


Figure 4: Domain organisation and phylogeny of ADCK proteins

a. Motif conservation in typical protein kinases and in ADCK proteins. Consensus of the 8 most conserved motifs of the typical protein kinases are indicated on top. Motifs which share homology with ADCKs motifs are indicated in red. Consensus of ADCK motifs are indicated below, with amino-acid positions corresponding to human ADCK3. ADCK domains are depicted on the diagram : blue rectangle, N-terminal domain conserved among all members of the ADCK family and containing the KxGQ motif; red ovals indicate the position of the conserved kinase motifs; yellow rectangle, C-terminal domain specific for each ADCK subgroups. The position of single amino-acid changes found in ARCA2 patients is indicated at the bottom.

b. Phylogenetic tree of typical and atypical protein kinases. Typical protein kinases are clustered in a single group. ADCK proteins are clustered in four groups. The UbiB group corresponds to the bacterial ADCKs and to the chloroplastic bacterial-like ADCKs. PI4KII, Phosphatidylinositol 4 kinase type 2; AFK, Actin-Fragmin Kinase; ChaK, transient receptor potential Channel Kinase; PIPK, Phosphatidylinositol Phosphate Kinase; PI3K-PI4K, Phosphatidylinositol 3 and 4 Kinases and related protein kinases.

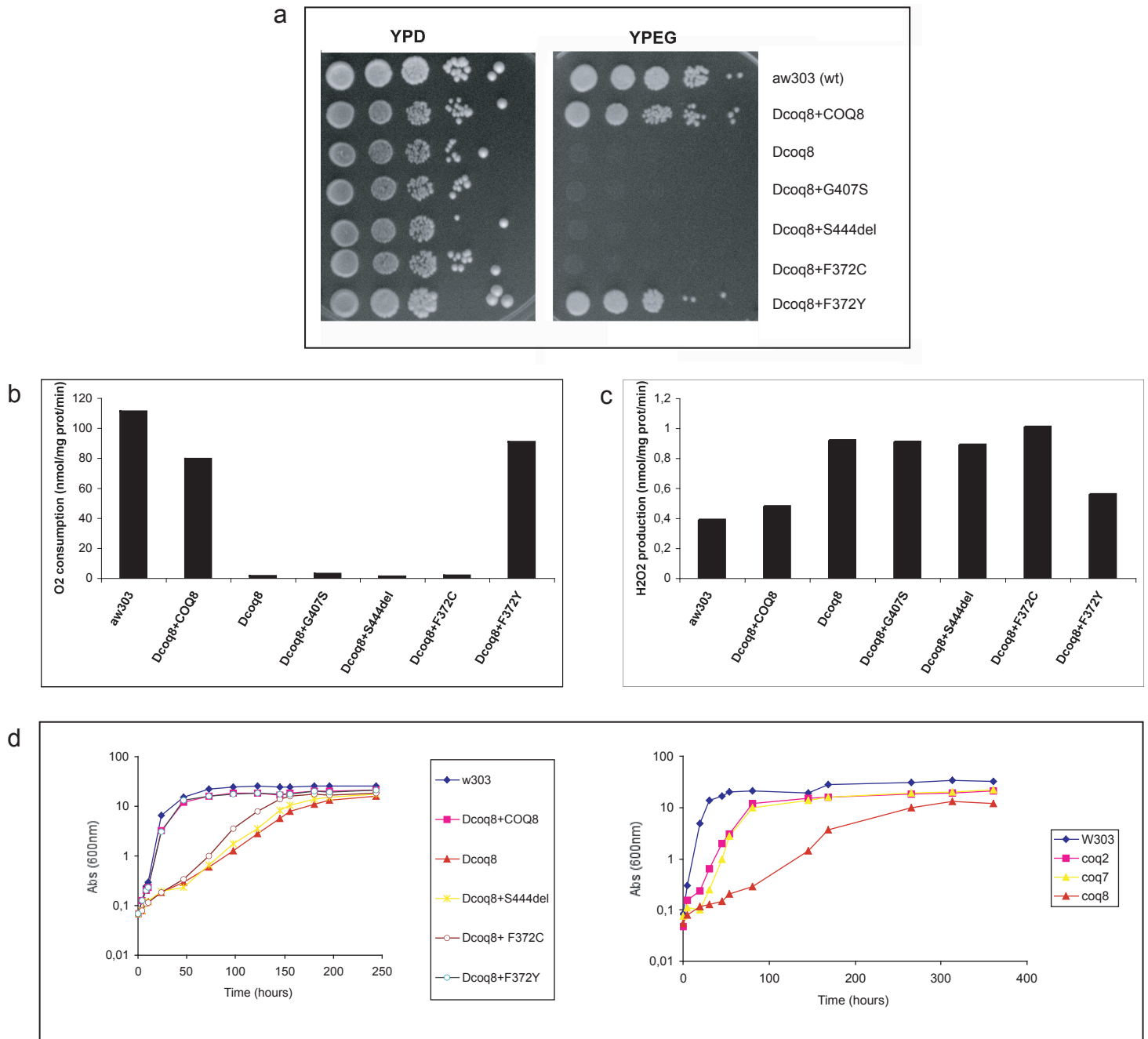


Figure 5: Coq8 null yeast phenotype was not rescued by transfection with plasmids carrying the non-truncating mutations identified in ARCA2 patients.

a. Serial dilutions of the wild type AW303, the *coq8* null mutant (Dcoq8=Delcoq8), and the mutant transformed with yeast wild type COQ8 or with yeast *coq8* non-truncating mutations, were spotted on rich glucose (YPD) and rich ethanol/glycerol (YPEG) plates. Growth on non-fermentable carbon source (YPEG) was not restored by mutant *coq8*, but was rescued by the wild-type sequence and

by the F372Y construct corresponding to the replacement of F372 by the homologous human amino-acid (Y at the human position 514).

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

c. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production is elevated in *coq8* deficient strains. Impaired oxygen consumption and increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production are indicative of respiratory chain dysfunction.

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

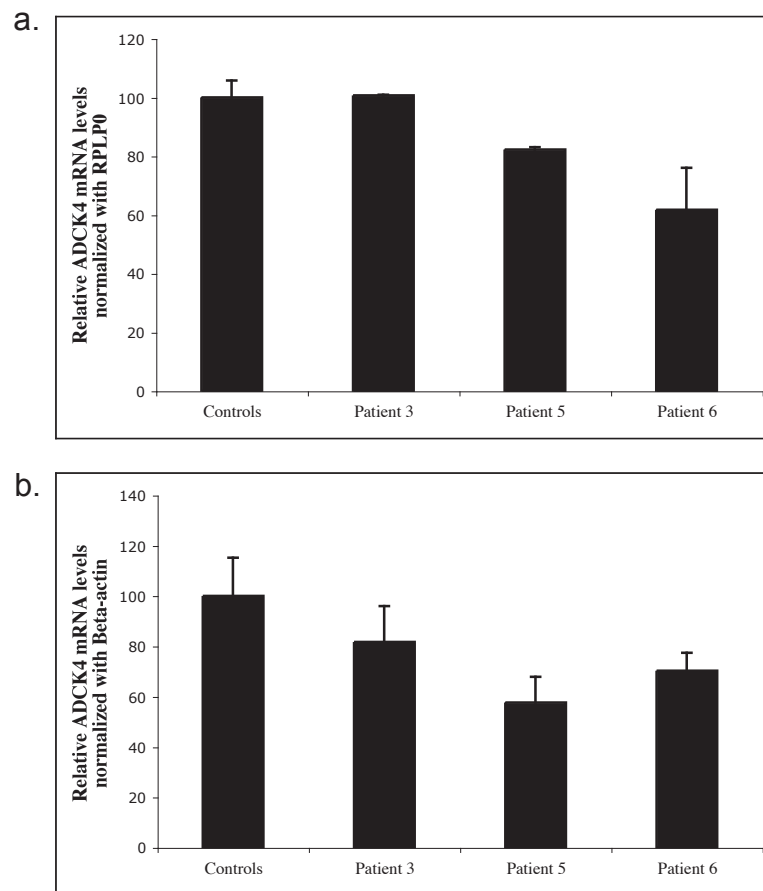
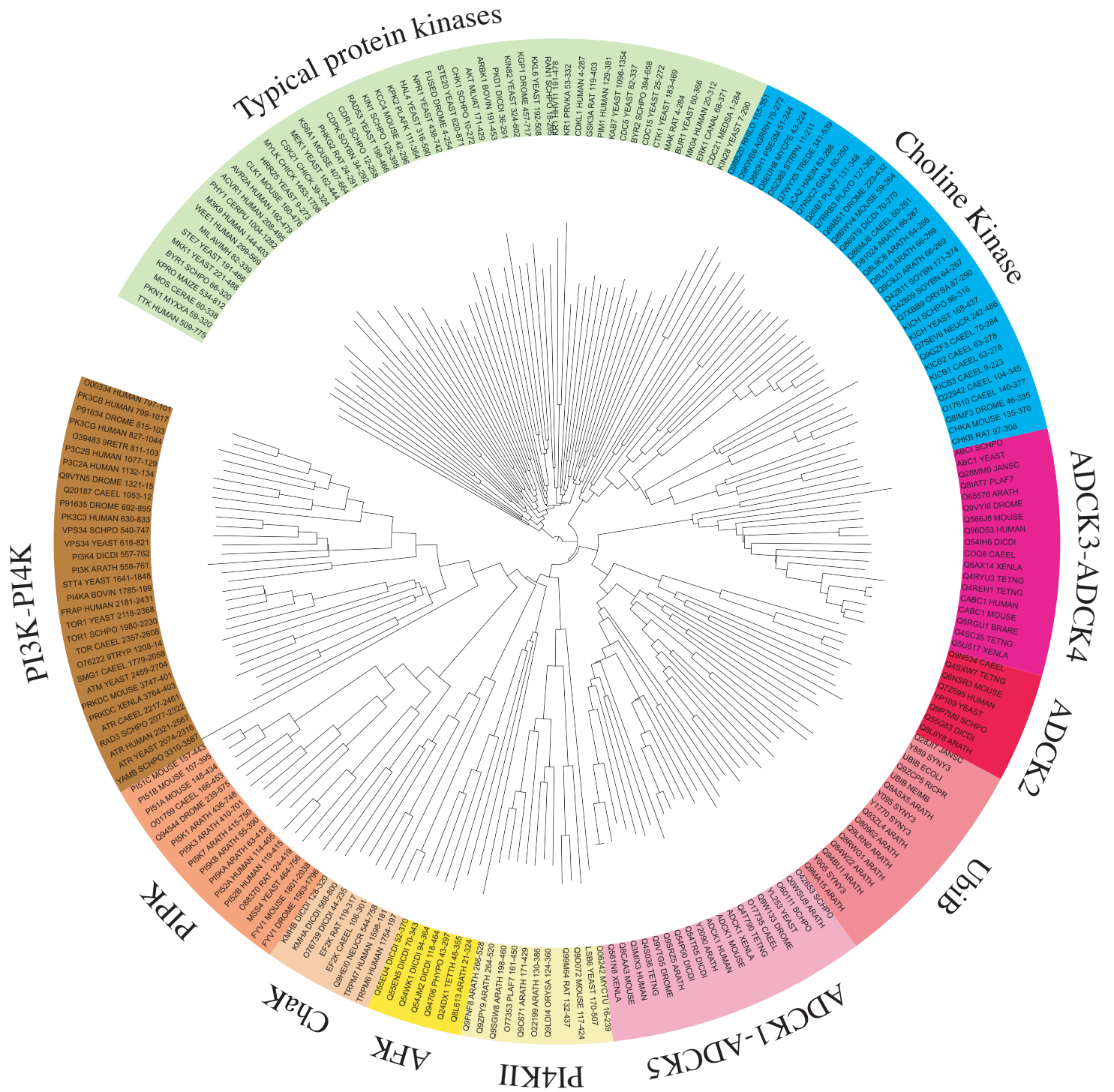


Figure 6 : Absence of ADCK4 induction in ADCK3 deficient fibroblasts  
 ADCK4 mRNA levels in control fibroblasts (n=4) and in patients 3, 5 and 6 fibroblasts were measured by quantitative real-time PCR. Expression levels of ADCK4 in patients 5 and 6 were slightly reduced. This slight reduction was not dependent on the type of house keeping reference RNA used: a. RPLP0 (Ribosomal protein P0); b. b-actin. Graphs represent means  $\pm$ SD of two independent experiments performed in duplicates.



Supplementary Figure 1: Genotyping results of the genomewide scan in Family 1



Supplementary Figure 2: Phylogenetic tree of typical and atypical protein kinases.

Enlargement of Figure 3b showing SPTREMBL accession numbers. For the non-ADCK proteins, the amino-acid position of the kinase "core domain" used for sequence alignment is also indicated. The human ADCKs are : ADCK1 = ADCK1, ADCK2 = Q7Z695, ADCK3 = CAB1, ADCK4 = Q96D53, ADCK5 = Q3MIX3; the *S. cerevisiae* (yeast) ADCKs are : ADCK1-5-like = YL253, ADCK2-like = YP109, ADCK3-4-like = ABC1; the *Jannaschia* sp. (gram negative bacteria) ADCKs are: ADCK1-5 like=Q28J17, ADCK3-4-like=Q28MM0. Several other alpha-, beta-, and gamma- proteobacteria (gram negative bacteria) also had one representative of each subgroup (ADCK1-5 and ADCK3-4; not shown).



## *Discussion et Perspectives*

## **VI. Discussion et Perspectives**

### **A. La stratégie utilisée**

Au cours de mon DEA et de ma thèse j'ai utilisé une stratégie de clonage positionnel et plus particulièrement de cartographie par homozygotie afin d'identifier deux gènes responsables d' ataxies autosomiques récessives. Le principe de cette stratégie a été énoncé il y a 20 ans (Lander and Botstein, 1987), et si la démarche reste identique, de nombreuses évolutions technologiques et méthodologiques ont permis l'identification d'un nombre croissant de gènes impliqués dans les pathologies héréditaires. Depuis mon arrivée au sein du laboratoire, nous avons modifié nos pratiques afin de bénéficier de ces avancées majeures.

Une des avancées fondamentales a été la mise en place des bases de données liées au séquençage du génome humain. Lorsque j'ai débuté le projet sur le syndrome de Marinesco-Sjögren, de nombreux « gaps » existaient dans la séquence du génome humain rendant parfois difficile la construction des haplotypes, la détermination exacte de l'intervalle critique et l'identification des gènes présents dans cet intervalle. Actuellement, ces bases de données sont utilisées à toutes les étapes de la stratégie. En particulier, les nombreux renseignements actuellement disponibles sur la fonction et/ou l'expression de chaque gène permettent de sélectionner des gènes candidats au sein de l'intervalle critique. De même, lors de l'étape de séquençage, l'annotation de nombreux polymorphismes sur l'ensemble du génome humain nous permet souvent de conclure sur l'absence de pathogénicité d'un changement nucléotidique identifié chez un patient.

L'étape ayant le plus bénéficié des progrès technologiques est certainement l'étape de génotypage. En effet, alors que nous réalisons le génotypage de marqueurs microsatellites marqués radioactivement, nous avons développé l'utilisation du marquage fluorescent, avec une migration sur gels d'acrylamide, puis sur séquenceurs capillaires, ayant permis la réalisation d'un nombre croissant de génotypes. Une avancée majeure a enfin été réalisée avec la mise en place des études pangénomiques à l'aide de puces de génotypage de SNP. Comme je l'ai déjà mentionné,

cette technique a de nombreux avantages outre le fait d'être techniquement plus rapide et donc réalisable au laboratoire pour un grand nombre de patients, ce qui n'était pas le cas de l'étude pangénome à l'aide de 400 microsatellites réalisée au Centre National de Génotypage. Ainsi, nous avons, à ce jour, réalisé au laboratoire une étude pangénome chez 126 patients ataxiques issus de 50 familles, et chez 49 patients isolés issus de parents consanguins. La première étape est de vérifier qu'il n'existe pas une homozygotie chevauchant un gène d'ataxie déjà connu. Cette étude est largement facilitée par l'utilisation du logiciel HomoSNP et la constitution d'une base de donnée permettant de localiser tous les gènes d'ataxie récessive, dont les syndromes métaboliques incluant ce symptôme. Cette étape peut permettre d'orienter le diagnostic, et nous avons de cette manière identifié 3 familles avec des mutations du gène *SACS* et 2 familles avec des mutations du gène *APTX*. De plus, le séquençage du gène *SACS* est en cours dans deux familles homozygotes au locus 13q12, ainsi que la recherche d'une mutation du gène *EPM1* chez des patients atteints d'une ataxie avec une épilepsie myoclonique et homozygotes au locus 21q22. Pour les familles consanguines, l'étude pangénome dans les petites familles ou les patients isolés permet donc de connaître l'ensemble des régions homozygotes et d'exclure une liaison au niveau d'un gène connu. Lors de l'identification d'un nouveau locus à partir d'une grande famille consanguine, nous pouvons désormais visualiser directement quels sont les patients présentant une homozygotie à ce locus et ainsi identifier de nouvelles familles potentiellement liées à cette région.

L'identification de nouveaux gènes reste cependant limitée par la dernière étape qui est la recherche des mutations causales dans l'un des gènes de l'intervalle critique. En effet, les loci actuellement identifiés correspondent à des formes rares d'ataxie et il est souvent difficile de trouver plusieurs familles liées au même locus. L'intervalle critique reste donc souvent de grande taille et contient de nombreux gènes. De plus, si le nombre de familles, et donc le nombre de mutations différentes, est réduit, il existe un risque important de ne pas la ou les identifier. Cette étape a bénéficié de certaines avancées technologiques comme par exemple l'utilisation des logiciels de lecture de séquences, ou la purification des séquences en plaques. Cependant, elle reste très laborieuse. Chaque exon n'est séquençé qu'un petit nombre de fois rendant difficile l'optimisation des conditions, et la mise en place de procédures de criblage à haut débit (« High-throughput screening »). C'est pourtant dans cette perspective que des efforts devront être

réalisés afin d'améliorer l'efficacité de cette approche. Une organisation des expériences en séries, l'utilisation d'amorces universelles lors du séquençage, l'utilisation d'un robot de pipettage, l'utilisation de logiciels permettant le suivi des expériences réalisées et le recueil des résultats sont des voies à développer.

D'autre part, cette recherche de mutations pourra peut être bénéficier des nouvelles techniques mises au point soit pour le criblage, soit pour le séquençage.

En effet, des outils tels que le « Light scanner » commercialisé par Bioké devraient permettre de réaliser un criblage à haut débit des mutations. Cette méthode basée l'analyse des courbes de dénaturation thermique (Dobrowolski et al., 2005) permet d'analyser 96 échantillons en très peu de temps. Cependant, au sein de l'équipe nous avons choisi pour l'instant de n'utiliser cette technique que pour rechercher la présence d'un changement nucléotidique précis dans un grand nombre d'ADN contrôles. Elle nous permet de tester rapidement de nombreux ADN afin d'évaluer si ce changement est un polymorphisme rare. La détection de nouvelles mutations est possible avec cette technologie et il conviendra d'évaluer son intérêt dans la démarche de clonage positionnel. Cependant, lors du criblage des gènes de l'intervalle critique chaque exon n'est testé qu'un petit nombre de fois. Or, l'utilisation du Light scanner nécessite la mise au point de PCR très spécifiques qu'il n'est pas évident d'obtenir pour chaque exon. De plus la sensibilité de cette technique reste à évaluer.

Enfin, cette étape devrait à l'avenir pouvoir largement bénéficier de l'apport des nouvelles techniques de séquençage haut débit qui ne sont plus basées sur la méthode de Sanger (Hodges et al., 2007 ; Margulies et al., 2005 ; Porreca et al., 2007).

Cependant, quelles que soient les avancées technologiques, une collaboration étroite entre les cliniciens et les généticiens moléculaires est à la base de la stratégie de clonage positionnel. La détermination du statut de chaque individu est primordiale pour l'analyse de liaison. Afin d'orienter les études moléculaires et d'interpréter les résultats obtenus, il est important pour le généticien de connaître l'origine géographique, les boucles de consanguinité, l'âge des individus de la fratrie, et les signes cliniques et paracliniques caractérisant les patients de chaque famille. Etant donné la durée des analyses, il est important que les généticiens soient tenus au courant de manière régulière de l'évolution des symptômes au sein des familles étudiées, comme par exemple de l'apparition des premiers signes de la maladie chez l'un des plus jeunes enfants de la

fratrie, ou encore l'obtention d'un résultat paraclinique décisif pour l'orientation diagnostique. Comme je l'ai décrit précédemment, nous avons mal interprété les résultats obtenus lors de l'étude pangénome d'une grande famille algérienne car le status d'atteint d'un membre de la fratrie était erroné. Cette erreur a pu être rétablie grâce aux interactions constantes que nous avons avec le Dr Meriem Tazir. De même, lors de l'étude d'une famille non décrite dans ce manuscrit, un membre de la fratrie était représenté comme atteint sur l'arbre généalogique et ce n'est qu'ultérieurement que nous avons appris qu'il était atteint d'une trisomie 21. Le généticien ne doit donc pas se contenter d'un arbre généalogique, mais doit intégrer à son interprétation un maximum de données cliniques. Inversement, il est indispensable que les résultats obtenus dans le cadre d'un projet de recherche soient régulièrement transmis aux cliniciens afin qu'il puisse adapter la prise en charge proposée aux patients et proposer un conseil génétique. Enfin, comme je l'ai décrit dans le syndrome du Marinesco-Sjögren ou le syndrome ARCA2, l'identification du gène responsable et les corrélations génotype-phénotype qui en résultent permettent une meilleure caractérisation du spectre clinique de chaque entité.

## **B. Les différents mécanismes moléculaires impliqués dans les ataxies héréditaires**

### **1. Les différentes voies moléculaires**

Comme nous l'avons vu dans ce manuscrit, de nombreux gènes déficitaires ont été associés à la survenue d'une ataxie héréditaire. L'étude des fonctions biologiques des protéines codées par ces gènes a un intérêt majeur pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques et l'orientation des stratégies thérapeutiques. Quelques grandes voies moléculaires apparaissent particulièrement impliquées dans la survenue d'une ataxie : les processus de réparation de l'ADN, les protéines du cytosquelette, les chaperonnes moléculaires, et le métabolisme mitochondrial. En effet, plusieurs gènes appartenant à chacune de ces voies ont été identifiés comme responsables d'ataxie. Il faut cependant rester prudent dans l'interprétation de ces observations, et en particulier quand à l'espoir de trouver des traitements efficaces communs aux différentes causes d'ataxies. En effet, au sein d'une même voie biologique plusieurs mécanismes peuvent être altérés, et de nouvelles études fonctionnelles ainsi que l'identification de nouveaux

gènes sont nécessaires avant de pouvoir réellement tirer des conclusions sur les mécanismes communs aux diverses ataxies. Il n'en demeure pas moins que les gènes codant pour des protéines impliquées dans ces voies peuvent être considérés comme de bons candidats lors de la recherche de nouveaux gènes responsables d'ataxie.

Nous avons identifié des mutations dans *SIL1* et *ADCK3* renforçant respectivement l'implication des chaperonnes moléculaires et du métabolisme mitochondrial dans les ataxies. Ces deux aspects seront discutés dans les chapitres suivants.

D'autre part, nous avons vu que plusieurs ataxies dégénératives de transmission autosomique récessive étaient dues à l'inactivation de protéines impliquées dans les processus de réparation de l'ADN. Ces ataxies appartiennent à un groupe hétérogène d'affections avec « instabilité génomique ». Plusieurs voies de réparations sont impliquées dans ces maladies telles que la réparation par excision nucléotidique, la réparation de cassures double-brin ou la réparation des cassures simple-brin. Certaines de ces pathologies sont compliquées par la survenue de cancer, et elles sont toutes caractérisées par une neurodégénérescence. En effet, les neurones semblent particulièrement sensibles aux déficits de réparation de l'ADN. Ceci est certainement dû à plusieurs facteurs tels que le statut post-mitotique des neurones, ou la survenue plus fréquente de cassures dans le système nerveux en raison d'une production élevée de ROS secondaire à une demande élevée en énergie (Caldecott, 2003 ; Rass et al., 2007).

Enfin, il est intéressant de souligner que le gène *SYNE1* récemment identifié dans l'ataxie récessive ARCA1 code pour une protéine ayant des domaines « spectrine ». Or, l'implication de telles protéines jouant un rôle notamment dans l'établissement et le maintien de la structure cellulaire et dans le trafic vésiculaire, a récemment été proposée dans deux formes d'ataxies autosomiques dominantes. En effet, des mutations dans le gène *SPTBN2* codant pour la spectrine beta-III ont été identifiés chez des patients présentant une ataxie cérébelleuse dominante de type SCA5 (Ikeda et al., 2006), et le gène *PLEKHG4* qui code pour une protéine ayant des répétitions spectrine est associé à une forme rare d'ataxie cérébelleuse dominante identifiée dans des familles japonaises (Ishikawa et al., 2005). De plus, le modèle murin « quivering » est dû à une mutation spontanée dans le gène spectrin beta-4 (*spnb4*) responsable d'une ataxie progressive

avec surdité et tremblement (Parkinson et al., 2001). De même, le gène muté chez la souris « *dystonia musculorum* » présentant une ataxie sensitive a des répétitions spectrine (Brown et al., 1995). Ces observations sont récentes et la caractérisation des fonctions exactes de ces protéines reste nécessaire avant de conclure à un mécanisme physiopathologique commun.

## **2. Implication des chaperonnes moléculaires dans la physiopathologie des ataxies**

Le repliement tridimensionnel des protéines « *in vivo* » n'est pas spontané (Ellis, 2001). En effet, il existe une classe de protéines hautement conservées, des archaebactéries aux eucaryotes, appelées chaperonnes moléculaires qui aident au repliement et à l'assemblage des protéines nouvellement synthétisées. Elles permettent également un nouveau repliement lorsque la conformation d'une protéine a été altérée par un stress cellulaire (Hartl and Hayer-Hartl, 2002), et lorsque l'altération est irréversible, elles interviennent dans l'adressage des protéines vers les mécanismes de dégradation (Muchowski and Wacker, 2005). En situation de stress (incluant, mais pas exclusivement, une élévation de la température), la cellule active un programme appelé « heat shock response » caractérisé par une activation de la synthèse des « Heat Shock Proteins » (ou HSP). La plupart des HSP sont des chaperonnes moléculaires et elles ont été classées en 6 familles principales en fonction de leur masse moléculaire : HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 et les petites HSP (ou small HSP, sHSP) (Muchowski and Wacker, 2005).

Les protéines HSP70 sont les chaperonnes moléculaires les plus conservées au cours de l'évolution. Dans les cellules eucaryotes elles sont retrouvées dans le cytosol, le noyau, les mitochondries, et le réticulum endoplasmique. Elles ont un domaine N-terminal ayant une activité ATPase et un domaine C-terminal de fixation aux peptides (Burkholder et al., 1996). Leur activité est régulée par des co-chaperonnes, les HSP40, qui ont un domaine DnaJ conservé. En effet, les HSP40 stimulent l'hydrolyse de l'ATP par les HSP70 ce qui provoque leur changement conformationnel et renforce leur capacité de capture des substrats peptidiques (Langer et al., 1992 ; Szabo et al., 1994). L'activité ATPasique est également régulée par des facteurs d'échange nucléotidique permettant de remplacer l'ADP par de l'ATP et donc de restaurer un état actif de la chaperonne HSP70.

Chez les eucaryotes, BiP est une des protéines HSP70 du réticulum endoplasmique. Or, la protéine déficiente dans le syndrome de Marinesco-Sjögren, SIL1, est un facteur d'échange nucléotidique de BiP. Elle favorise la libération de l'ADP (Chung et al., 2002) et agit ainsi de concert avec la protéine ERdj4 (une protéine HSP40 à domaine DnaJ) pour augmenter l'activité ATPase de BiP. L'identification de mutations de SIL1 dans le syndrome MS souligne donc l'importance des chaperonnes moléculaires dans la survenue d'une ataxie.

De plus, le gène muté dans l'ataxie spastique du Charlevoix-Saguenay (ARSACS) code pour une protéine dont la fonction n'est pas connue, mais qui a un domaine homologue aux HSP90 et un domaine DnaJ homologue aux HSP40. Il est cependant intéressant de noter que le domaine DnaJ retrouvé dans la protéine SACS ne contient pas le motif His-Pro-Asp essentiel pour la coopération entre les protéines HSP40 et les protéines HSP70 (Barral et al., 2004).

Aucune donnée anatomo-pathologique ne permet de dire si les patients ARSACS présentent des agrégats protéiques et s'il existe une dysfonction des systèmes de repliements ou de dégradation protéiques. Au contraire, dans le syndrome de Marinesco-Sjögren, des structures protéiques denses et des vacuoles autophagiques sont observées sur la biopsie musculaire. L'origine de ces structures protéiques denses n'est pas connue. Cependant, l'étude du modèle murin ayant une mutation spontanée dans *Sill* a montré qu'il existait le même type de lésions au niveau des cellules de Purkinje (Figure 21). Zhao et al. (Zhao et al., 2005) ont pu montrer que ces structures denses correspondaient à des agrégats protéiques séquestrés au niveau du réticulum endoplasmique ou parfois du noyau, et qui présentent une ubiquitination comparable à celle observée au niveau des agrégats protéiques d'autres maladies neurodégénératives (Ross and Pickart, 2004). Zhao et al. ont également montré la présence d'une activation de la réponse UPR (« unfolded protein response ») suggérant qu'il existe un stress du réticulum endoplasmique dans les cellules de Purkinje de ces souris, suivi d'une neurodégénérescence soit par apoptose soit par autophagie (Zhao et al., 2005). Par ailleurs, certains auteurs ont décrit une accumulation de lysosomes anormaux dans les fibroblastes issus de biopsies cutanées ou conjonctivales de patients atteints d'un syndrome de Marinesco-Sjögren (Walker et al., 1985 ; Zimmer et al., 1992). Les lysosomes sont nombreux, de grande taille, et contiennent des inclusions lamellaires en spirale uni ou polycentriques (Walker et al., 1985). Or, les HSP70 contribuent également à diriger les protéines anormales vers les lysosomes dans un processus appelé « chaperone-mediated autophagy » (Cuervo and Dice, 1998). Les vacuoles autophagiques et les anomalies lysosomales



observées chez les patients MS pourraient être liés à un déficit de ce processus dû à une dysfonction de la chaperonne BiP.

Les chaperonnes moléculaires ont été impliquées dans un nombre croissant de pathologies héréditaires de transmission dominante ou récessive. En effet, une mutation faux sens (V72I) responsable d'une perte de fonction a été identifiée dans la chaperonne mitochondriale HSP60 chez des patients atteints d'une paraplégie spastique dominante de type SPG13 (Hansen, Durr 2002). De même, trois gènes homologues des chaperonnes (famille des HSP60) ont été impliqués dans le syndrome de Bardet-Biedl de transmission récessive (BBS6, BBS10, BBS12) (Katsanis et al., 2000 ; Slavotinek et al., 2000 ; Stoetzel et al., 2006 ; Stoetzel et al., 2007). Enfin, des mutations dans plusieurs gènes codant pour des « Small Heat Shock Proteins » (sHSP) ont été identifiées dans des pathologies de transmission dominante. En effet, les mutations du gène codant pour l' HSP27 sont responsables d'une maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2F ou d'une neuropathie motrice distale héréditaire de type 2B (HMN2B) (Evgrafov et al., 2004), et des mutations d'HSP22 sont retrouvées dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2L (Tang et al., 2005) et dans la neuropathie motrice distale héréditaire de type 2A (HMN2A) (Irobi et al., 2004). Enfin, les mutations dans l' $\alpha$ -A-crystalline et l' $\alpha$ -B-crystalline, de la famille des petites HSP, sont respectivement responsables d'une cataracte (Litt et al., 1998) et d'une myopathie (Vicart et al., 1998), deux symptômes retrouvés dans le syndrome de Marinesco-Sjögren.

Dans les pathologies génétiques précédemment citées, des mutations altèrent directement la fonction de chaperonnes moléculaires. Il est cependant important de préciser que les chaperonnes moléculaires ont été également impliquées dans les processus pathologiques de plusieurs maladies neurodégénératives. En effet, les activités conjuguées des chaperonnes moléculaires, du système de dégradation ubiquitin-proteasome et de l'autophagie médiée par les lysosomes, sont habituellement suffisantes pour prévenir l'accumulation de protéines de conformation anormale. Ce n'est pas le cas dans de nombreuses situations pathologiques parfois appelées « protein misfolding disorders » et caractérisées par une neurodégénérescence et des agrégats protéiques incluant la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Creutzfeldt-Jacob et les maladies à polyglutamines dont de nombreuses SCA. Les agrégats protéiques retrouvés dans ces pathologies ont une structure fibrillaire avec des caractéristiques biochimiques communes telles que l'insolubilité en présence de détergents, et la propriété de fixer des colorants lipophiles. Ces agrégats pourraient être

protecteurs et correspondre à un mécanisme permettant de séquestrer des protéines anormales susceptibles d'altérer l'homéostasie cellulaire (Arrasate et al., 2004). Les chaperonnes moléculaires semblent avoir un rôle protecteur dans ces maladies, cependant les bases moléculaires de cette protection sont mal connues et il est vraisemblable qu'elles agissent à plusieurs niveaux. En effet, de nombreuses chaperonnes moléculaires ont été localisées au niveau des agrégats (Muchowski and Wacker, 2005). De plus, des études de surexpression, en particulier des chaperonnes HSP70, et l'utilisation d'agents activant ces chaperonnes, telle que la geldanamycine, ont montré un effet neuroprotecteur dans des modèles cellulaires ou animaux. Cette neuroprotection ne s'accompagne pas dans la plupart des cas de modifications de la morphologie des inclusions protéiques (Adachi et al., 2003; Auluck and Bonini, 2002 ; Auluck et al., 2002 ; Bruening et al., 1999 ; Cummings et al., 2001 ; Dou et al., 2003 ; Kobayashi and Sobue, 2001 ; Warrick et al., 1999 ).

Pour Zhao et al, l'identification de mutations dans *Sill* chez les souris « *woozy* » prouve qu'une dysfonction des chaperonnes moléculaires du réticulum endoplasmique peut être directement responsable d'une neurodégénérescence (Zhao et al., 2005). De plus, BiP dont la fonction est altérée dans le syndrome de Marinesco-Sjögren inhibe le clivage de la protéine APP, et sa surexpression prévient la neurotoxicité médiée par le peptide amyloïde A-Beta42 dans la maladie d'Alzheimer (Magrane et al., 2004; Yang et al., 1998 ). Ces considérations font des chaperonnes des cibles thérapeutiques potentielles, et devrait stimuler la poursuite des études fonctionnelles sur le syndrome de Marinesco-Sjögren.

### **3. Implication des protéines mitochondriales dans la physiopathologie des ataxies**

L'identification de mutations d'*ADCK3* dans une nouvelle forme d'ataxie vient allonger la liste des ataxies récessives dues à une perte de fonction d'une protéine mitochondriale. De plus, nous avons vu que des mutations de l'ADN mitochondrial pouvaient être responsable de divers tableaux cliniques incluant une ataxie. Si la dysfonction de la chaîne respiratoire est un caractère commun à ces diverses pathologies, il est difficile d'expliquer l'atteinte sélective de certains neurones et la diversité des tableaux cliniques observés. En effet, la plupart des gènes mutés dans

ces ataxies ont une expression ubiquitaire, et le métabolisme mitochondrial est fondamental dans toutes les cellules. Le statut post-mitotique des neurones, de même que les besoins élevés en oxygène pourraient rendre compte en partie des conséquences cliniques. Il faut cependant insister sur le fait qu'une tentative d'unifier ces pathologies est certainement dangereuse et peu appropriée à la réalité physiopathologique. En effet, si une dysfonction de la chaîne respiratoire est un caractère commun aux maladies mitochondriales, de nombreux processus sont impliqués que les mutations soient dans l'ADN mitochondrial ou dans l'ADN nucléaire.

Parmi ces processus on retrouve :

- *Mutations dans des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire.*

Dans ce cas, si les mutations sont mitochondriales elles peuvent impliquer les complexes I, III, IV ou V. En particulier, la mutation 8993T>G (Leu156Arg) dans le gène de l'ATPase 6 du complexe V est la mutation la plus souvent associée au syndrome NARP caractérisé notamment par la survenue d'une ataxie. Au contraire, seules des mutations de l'ADN nucléaire impliquant des sous-unités des complexes I et II ont été identifiées dans les atteintes de la chaîne respiratoire (DiMauro and Schon, 2003).

- *Déficit des protéines d'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire.*

Des mutations dans des gènes nucléaires codant pour des protéines d'assemblage des complexes III et IV (*BCSIL, COX10, COX15, SCO1, SCO2, SURF1*) ont été associés à plusieurs phénotypes dont le syndrome de Leigh.

- *Déficit de la synthèse protéique mitochondriale.*

C'est le cas des mutations au niveau des 22 ARN de transfert codés par l'ADNmt, mais également des mutations dans des gènes nucléaires codant pour des ARNt synthétases. En particulier, l'Arginyl-tRNA synthetase mitochondriale est, comme nous l'avons vu, mutée dans l'hypoplasie ponto-cérébelleuse de type 6 (Edvardson et al., 2007). De plus, des mutations de l'Aspartyl-tRNA synthetase mitochondriale ont récemment été associées à une leucoencéphalopathie sévère (Scheper et al., 2007).

- *Défauts de communication intergénomique.*

Ce mécanisme est dû à des mutations dans des gènes nucléaires codants pour des protéines qui ont une fonction dans le maintien du génome mitochondrial. Il existe donc des anomalies secondaires de l'ADNmt à type de délétions multiples et/ou déplétion. Les gènes mutés peuvent être impliqués dans l'approvisionnement en dNTP nécessaires à la réplication de l'ADNmt (*TK2*, *DGUOK*, *SUCLA2*, *ANT1*, *TP*, *p53R2*), ou être directement impliqués dans la réplication de l'ADNmt (*POLG*, *POLG2*, *Twinkle*) (Figure 25). Comme nous l'avons vu, des mutations de *POLG* et de *Twinkle* peuvent être responsables d'ataxies autosomiques récessives (SANDO, MIRAS, IOSCA). Les patients atteints d'une ataxie de type SANDO présentent des délétions multiples de l'ADNmt secondaires aux mutations de *POLG*. Il est cependant intéressant de remarquer que la mutation Y508C de *Twinkle* responsable du syndrome IOSCA n'est pas associée à une altération de l'ADNmt, et son mécanisme pathogénique reste à définir (Nikali et al., 2005).

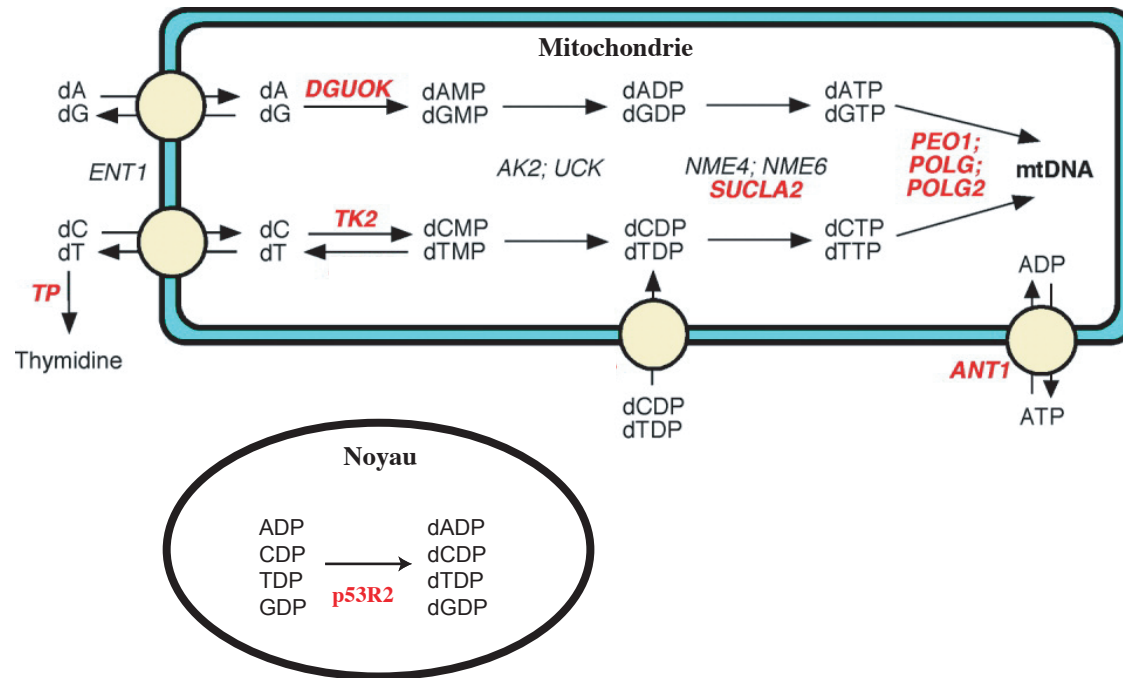
Il existe également des mutations responsables d'une dysfonction mitochondriale avec un effet indirect sur la chaîne respiratoire :

- *Déficit de l'import protéique.*

Un déficit de l'import mitochondrial des protéines est caractéristique des mutations de *TIMM8A* retrouvées dans le syndrome de Mohr-Tranebjaerg associant une dystonie et une surdité (Jin et al., 1996).

- *Anomalies de fusion des mitochondries.*

Le gène *OPA1* muté dans l'atrophie optique autosomique dominante de type 1 (Alexander et al., 2000 ; Delettre et al., 2000) est impliqué dans les processus de fusion mitochondriale et dans le remodelage des crêtes mitochondriales lors de l'apoptose (Frezza et al., 2006). De plus ce gène pourrait également être impliqué dans le maintien de l'intégrité du génome mitochondrial. En effet, Hudson et al. (Hudson et al., 2007) ont récemment identifié une mutation faux sens (S545R) d'*OPA1* chez des patients avec des délétions multiples de l'ADNmt, une atrophie optique, une ophtalmoplégie progressive externe, une ataxie, une surdité et une neuropathie sensitivo-motrice.



**Figure 25: Mécanismes moléculaires des défauts de communication intergénomique**

Les gènes pour lesquels des mutations ont été associées à une déplétion de l'ADNmt (SUCLA2, TK2, DGUOK, POLG, TP, p53R2), à des délétions multiples de l'ADNmt (PEO1/Twinkle, ANT1, POLG), ou aux deux (TP, POLG) sont indiqués en rouge au niveau d'action des protéines codées par ces gènes. Ces protéines sont soit impliquées dans le contrôle du pool nucléotidique, soit dans la réplication de l'ADNmt.

dN: déoxynucléoside; dNMP: déoxynucléotide monophosphate; dNDP: déoxynucléotide diphosphate; dNTP: déoxynucléotides triphosphate, NDP nucléotide diphosphate.

Modifié d'après DiMauro et al. *Muscle Nerve*, 2006.

De même, la mitofusine 2 impliquée dans la fusion des mitochondries est déficiente chez les patients atteints d'une maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2A2 (CMT2A2) (Zuchner et al., 2004) ou de type 6 (CMT6, HMSN6) (Zuchner et al., 2006).

- *Déficit des contrôles de qualité protéique.*

La paraplegine mutée dans la paraplégie spastique récessive SPG7 (Casari et al., 1998) est une protéase mitochondriale impliquée dans la dégradation des protéines anormales et en particulier des sous-unités non assemblées de la chaîne respiratoire (Rugarli and Langer, 2006). Cette forme de SPG est souvent compliquée par la survenue d'une atteinte cérébelleuse (Elleuch et al., 2006). De plus, nous avons déjà décrit dans ce manuscrit l'implication d'une chaperonne mitochondriale HSP60 dans la paraplégie spastique SPG13 (Hansen et al., 2002). Une altération des processus contrôlant la qualité des protéines mitochondriales est donc un des mécanismes impliqués dans les pathologies neurodégénératives avec dysfonction mitochondriale.

- *Anomalies du métabolisme des noyaux fer-soufre.*

Nous avons décrit l'implication de cette voie métabolique dans la physiopathologie de deux ataxies récessives : l'ataxie de Friedreich et l'ataxie avec anémie sidéroblastique. Plusieurs enzymes de la chaîne respiratoire sont des protéines à centre Fe-S, et leur fonctionnement est altéré dans la maladie de Friedreich. Cependant, il apparaît évident que des protéines non mitochondriales sont également affectées par un déficit du métabolisme des noyaux Fe-S et de nouvelles études sont nécessaires pour déterminer leur implication exacte dans les mécanismes pathogéniques (Martelli et al., 2007).

- *Deficits en coenzyme Q<sub>10</sub>*

Enfin, nous avons vu qu'un déficit en CoQ était responsable d'un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire et en particulier des activités combinées des complexes I+III et II+III.

Les mécanismes induisant une dysfonction mitochondriale sont donc multiples. De plus, une dysfonction mitochondriale est souvent associée à une élévation de la production des ROS et

un stress oxydant. C'est également le cas dans les maladies dues à une diminution d'un agent antioxydant telles que l'ataxie avec déficit en vitamine E (AVED) et l'abétalipoprotéïnémie. Le CoQ a un rôle de transport d'électron dans la chaîne respiratoire, mais il a également un rôle antioxydant majeur. Il est probable que les signes cliniques observés chez les patients atteints d'un déficit en CoQ, et en particulier chez les patients ARCA2, soient en partie due à un déficit de cette fonction antioxydante. Les levures mutantes *coq8* présentent une production élevée d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui n'est pas corrigée par une transfection avec des plasmides contenant les mutations des patients ARCA2. Il sera donc intéressant de mesurer les marqueurs indiquant la présence d'un stress oxydant dans les fibroblastes des patients ARCA2.

L'implication d'ADCK3 dans le métabolisme du CoQ<sub>10</sub> est prouvée par l'identification de mutations chez des patients présentant une ataxie et un déficit en CoQ<sub>10</sub>. Ce déficit est modéré voir absent dans les fibroblastes, cependant un des patients chez qui nous avons identifié une mutation avait été préalablement diagnostiqué avec un déficit majeur en CoQ<sub>10</sub> à la biopsie musculaire (Manuscrit 4, Patient 6 ; Lamperti 2003, Patient 8). De plus, il est important de souligner que l'équipe du Dr Agnès Rotig, à Paris, a identifié indépendamment, par une approche « gène candidat », des mutations dans *ADCK3* chez 3 patients avec une ataxie et un déficit en CoQ<sub>10</sub> (Manuscrit en révision). Un de ces patients, décrit par Auré et al. en 2004 (Auré et al., 2004), est une jeune fille ayant débuté la maladie à l'âge de 3 ans par une intolérance à l'effort, puis ayant développé une ataxie cérébelleuse à partir de 7 ans. Or, trois des patients algériens que nous avons décrit ont rapporté rétrospectivement une intolérance à l'effort et présentent une élévation modérée des lactates sériques.

Le phénotype relativement modéré des patients ARCA2, en particulier par rapport aux patients présentant un bloc direct de la biosynthèse du CoQ (Lopez et al., 2006 ; Mollet et al., 2007; Quinzii et al., 2006 ), pourrait être expliqué par un rôle régulateur, plutôt qu'enzymatique, d'ADCK3 dans la biosynthèse du CoQ, mais également par un phénomène de redondance.

En effet, ADCK3 présente 4 paralogues chez l'homme, dont le plus proche est ADCK4. La fonction de ces paralogues, de même que celle des deux homologues de COQ8 chez la levure, n'est pas connue. Il est intéressant de remarquer qu'un signal d'adressage mitochondrial est prédit par les sites MITOPROT et Predotar, pour ADCK1,2,4 et 5, mais pas pour ADCK3. Liizumi et al. (Liizumi et al., 2002) ont étudié la localisation subcellulaire d'ADCK3 (appelé CAB1 dans leur article) à l'aide de la transfection du gène associé à un Tag. Ils ont montré une

colocalisation avec le MitoTracker, un marqueur mitochondrial. Il sera pourtant intéressant d'étudier la localisation subcellulaire de la forme endogène d'ADCK3. J'ai tenté de réaliser des Western blots avec deux anticorps monoclonaux dirigés contre ADCK3, mais je n'ai obtenu à ce jour aucun marquage spécifique. Afin d'étudier la possibilité d'une redondance entre les différentes protéines ADCK, il serait également intéressant d'étudier le phénotype de levures mutées pour les deux homologues de COQ8 (YLR253W et YPL109C). Ceci permettrait de savoir si ces protéines sont également impliquées dans la biosynthèse du CoQ. Chez les patients ARCA2, il serait intéressant de mesurer les taux d'expression des autres ADCK à la recherche d'un effet compensateur. J'ai réalisé cette étude pour ADCK4, et je n'ai pas mis en évidence de surexpression de ce gène dans les fibroblastes des patients ARCA2. En attendant de nouvelles études sur la fonction de ces paralogues, leur homologie avec ADCK3 leur confère la propriété de « gènes candidats » pour l'identification de nouveaux gènes d'ataxie et/ou de déficits en CoQ<sub>10</sub>.

De nombreuses questions restent posées quand à la fonction d'ADCK3. En effet, le rôle d'ADCK3 dans la voie de biosynthèse du CoQ n'est pas connu. L'homologie d'ADCK3 avec la famille des kinases atypiques est en faveur d'une fonction régulatrice par la phosphorylation de substrats, peut être au sein d'une voie de rétro-contrôle en réponse à la production d'ATP. Cependant, il sera nécessaire de prouver expérimentalement la capacité d'ADCK3 à fixer l'ATP, et il faudra tenter de déterminer quels sont ses substrats. Cette étape pourrait être d'autant plus difficile que les substrats des kinases atypiques sont souvent non-protéiques.

Enfin il est possible qu'ADCK3 ait également des fonctions cellulaires non liées à la biosynthèse du CoQ<sub>10</sub>. Liizumi et al. (2002) ont identifié par un criblage à l'aide de puces d'expression, ADCK3 (CABC1) comme étant une cible de P53 (Liizumi et al., 2002). En effet, cette étude, qui est la seule publiée sur la forme humaine de ce gène, montre que l'expression d'ADCK3 est induite par P53 en réponse à des lésions de l'ADN par des agents génotoxiques (Adriamycin, UV,  $\gamma$  irradiation). Ils ont également montré, grâce à l'utilisation d'oligonucléotides antisens, qu'ADCK3 inhibait l'induction de l'apoptose par P53, et ont ainsi proposé qu'ADCK3 joue un rôle majeur dans les processus d'apoptose dépendant de P53. Il sera intéressant d'explorer cette voie à partir des fibroblastes et lymphoblastes des patients ARCA2, et en particulier de tester leur sensibilité aux agents génotoxiques.



Enfin, l'identification de mutations d'*ADCK3* implique des orientations thérapeutiques et en particulier la possibilité de proposer un traitement substitutif en CoQ. Deux des patients ayant des mutations dans *ADCK3* ont été traités pendant plusieurs années avec du CoQ. En effet, le Patient 6 du Manuscrit 4 a reçu entre 60 to 700 mg/jour pendant 8 ans. Le patient et sa famille décrivent une amélioration de sa symptomatologie, et à l'examen clinique l'ataxie semble avoir été stabilisée. De plus, la patiente décrite par Auré et al. (Aure et al., 2004) chez qui des mutations d'*ADCK3* ont été identifiées par le groupe d'Agnés Rotig, a montré une nette amélioration de sa symptomatologie musculaire sous CoQ. Cependant, le traitement n'a pas empêché l'apparition d'une ataxie à l'âge de 7 ans. Devant l'apparition d'une symptomatologie neurologique, le CoQ a été remplacé par de l'idebenone ce qui a été suivi d'une réapparition des signes musculaires. L'utilisation d'un traitement substitutif en CoQ chez les patients porteurs de mutations d'*ADCK3* est certainement justifiée, cependant il faudra évaluer son intérêt et ses modalités dans le cadre d'essais cliniques correctement établis.

## *Références*

## Références

- Abele, M., Burk, K., Schols, L., Schwartz, S., Besenthal, I., Dichgans, J., Zuhlke, C., Riess, O. and Klockgether, T. (2002) The aetiology of sporadic adult-onset ataxia. *Brain*, **125**, 961-968.
- Aberg, F., Appelkvist, E.L., Dallner, G. and Ernster, L. (1992) Distribution and redox state of ubiquinones in rat and human tissues. *Arch Biochem Biophys*, **295**, 230-234.
- Adachi, H., Katsuno, M., Minamiyama, M., Sang, C., Pagoulatos, G., Angelidis, C., Kusakabe, M., Yoshiki, A., Kobayashi, Y., Doyu, M. and Sobue, G. (2003) Heat shock protein 70 chaperone overexpression ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model by reducing nuclear-localized mutant androgen receptor protein. *J Neurosci*, **23**, 2203-2211.
- Adamec, J., Rusnak, F., Owen, W.G., Naylor, S., Benson, L.M., Gacy, A.M. and Isaya, G. (2000) Iron-dependent self-assembly of recombinant yeast frataxin: implications for Friedreich ataxia. *Am J Hum Genet*, **67**, 549-562.
- Adinolfi, S., Trifuoggi, M., Politou, A.S., Martin, S. and Pastore, A. (2002) A structural approach to understanding the iron-binding properties of phylogenetically different frataxins. *Hum Mol Genet*, **11**, 1865-1877.
- Aguglia, U., Annesi, G., Pasquinelli, G., Spadafora, P., Gambardella, A., Annesi, F., Pasqua, A.A., Cavalcanti, F., Crescibene, L., Bagala, A., Bono, F., Oliveri, R.L., Valentino, P., Zappia, M. and Quattrone, A. (2000) Vitamin E deficiency due to chylomicron retention disease in Marinesco-Sjogren syndrome. *Ann Neurol*, **47**, 260-264.
- Ahel, I., Rass, U., El-Khamisy, S.F., Katyal, S., Clements, P.M., McKinnon, P.J., Caldecott, K.W. and West, S.C. (2006) The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates. *Nature*, **443**, 713-716.
- Aicardi, J., Barbosa, C., Andermann, E., Andermann, F., Morcos, R., Ghanem, Q., Fukuyama, Y., Awaya, Y. and Moe, P. (1988) Ataxia-ocular motor apraxia: a syndrome mimicking ataxia-telangiectasia. *Ann Neurol*, **24**, 497-502.
- Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., Bhattacharya, S.S. and Wissinger, B. (2000) OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet*, **26**, 211-215.
- Alexianu, M., Christodorescu, D., Vasilescu, C., Dan, A., Petrovici, A., Magureanu, S. and Savu, C. (1983) Sensorimotor neuropathy in a patient with Marinesco-Sjogren syndrome. *Eur Neurol*, **22**, 222-226.
- Alleva, R., Tomasetti, M., Battino, M., Curatola, G., Littarru, G.P. and Folkers, K. (1995) The roles of coenzyme Q10 and vitamin E on the peroxidation of human low density lipoprotein subfractions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9388-9391.
- Allikmets, R., Raskind, W.H., Hutchinson, A., Schueck, N.D., Dean, M. and Koeller, D.M. (1999) Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A). *Hum Mol Genet*, **8**, 743-749.
- Allingham-Hawkins, D.J., Babul-Hirji, R., Chitayat, D., Holden, J.J., Yang, K.T., Lee, C., Hudson, R., Gorwill, H., Nolin, S.L., Glicksman, A., Jenkins, E.C., Brown, W.T., Howard-Peebles, P.N., Becchi, C., Cummings, E., Fallon, L., Seitz, S., Black, S.H., Vianna-Morgante, A.M., Costa, S.S., Otto, P.A., Mingroni-Netto, R.C., Murray, A., Webb, J., Vieri, F. and et al. (1999) Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the International Collaborative POF in Fragile X study--preliminary data. *Am J Med Genet*, **83**, 322-325.
- Alter, M. and Kennedy, W. (1968) The Marinesco-Sjogren syndrome. Hereditary cerebello-lental degeneration with mental retardation. *Minn Med*, **51**, 901-906.

- Amouri, R., Moreira, M.C., Zouari, M., El Euch, G., Barhoumi, C., Kefi, M., Belal, S., Koenig, M. and Hentati, F. (2004) Aprataxin gene mutations in Tunisian families. *Neurology*, **63**, 928-929.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R. and Young, I.G. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, **290**, 457-465.
- Angelicheva, D., Turnev, I., Dye, D., Chandler, D., Thomas, P.K. and Kalaydjieva, L. (1999) Congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy (CCFDN) syndrome: a novel developmental disorder in Gypsies maps to 18qter. *Eur J Hum Genet*, **7**, 560-566.
- Apel, E.D., Lewis, R.M., Grady, R.M. and Sanes, J.R. (2000) Syne-1, a dystrophin- and Klarsicht-related protein associated with synaptic nuclei at the neuromuscular junction. *J Biol Chem*, **275**, 31986-31995.
- Arima, M., Ono, K., Hisada, K. and Handa, T. (1971) A familial syndrome of mal-development of the brain, polycystic kidneys, congenital tapeto-retinal dysplasia with coloboma and unilateral ptosis. *No To Hattatsu*, **3**, 330-331.
- Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E.S., Segal, M.R. and Finkbeiner, S. (2004) Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature*, **431**, 805-810.
- Arroyo, A., Kagan, V.E., Tyurin, V.A., Burgess, J.R., de Cabo, R., Navas, P. and Villalba, J.M. (2000) NADH and NADPH-dependent reduction of coenzyme Q at the plasma membrane. *Antioxid Redox Signal*, **2**, 251-262.
- Arthur, L.M., Gustausson, K., Hopfner, K.P., Carson, C.T., Stracker, T.H., Karcher, A., Felton, D., Weitzman, M.D., Tainer, J. and Carney, J.P. (2004) Structural and functional analysis of Mre11-3. *Nucleic Acids Res*, **32**, 1886-1893.
- Arts, H.H., Doherty, D., van Beersum, S.E., Parisi, M.A., Letteboer, S.J., Gorden, N.T., Peters, T.A., Marker, T., Voesenek, K., Kartono, A., Ozyurek, H., Farin, F.M., Kroes, H.Y., Wolfrum, U., Brunner, H.G., Cremers, F.P., Glass, I.A., Knoers, N.V. and Roepman, R. (2007) Mutations in the gene encoding the basal body protein RPGRIP1L, a nephrocystin-4 interactor, cause Joubert syndrome. *Nat Genet*, **39**, 882-888.
- Artuch, R., Brea-Calvo, G., Briones, P., Aracil, A., Galvan, M., Espinos, C., Corral, J., Volpini, V., Ribes, A., Andreu, A.L., Palau, F., Sanchez-Alcazar, J.A., Navas, P. and Pineda, M. (2006) Cerebellar ataxia with coenzyme Q10 deficiency: diagnosis and follow-up after coenzyme Q10 supplementation. *J Neurol Sci*, **246**, 153-158.
- Asaka, T., Yokoji, H., Ito, J., Yamaguchi, K. and Matsushima, A. (2006) Autosomal recessive ataxia with peripheral neuropathy and elevated AFP: novel mutations in SETX. *Neurology*, **66**, 1580-1581.
- Asencio, C., Rodriguez-Aguilera, J.C., Ruiz-Ferrer, M., Vela, J. and Navas, P. (2003) Silencing of ubiquinone biosynthesis genes extends life span in *Caenorhabditis elegans*. *Faseb J*, **17**, 1135-1137.
- Ashby, M.N. and Edwards, P.A. (1990) Elucidation of the deficiency in two yeast coenzyme Q mutants. Characterization of the structural gene encoding hexaprenyl pyrophosphate synthetase. *J Biol Chem*, **265**, 13157-13164.
- Ashby, M.N., Kutsunai, S.Y., Ackerman, S., Tzagoloff, A. and Edwards, P.A. (1992) COQ2 is a candidate for the structural gene encoding para-hydroxybenzoate:polyprenyltransferase. *J Biol Chem*, **267**, 4128-4136.
- Auluck, P.K. and Bonini, N.M. (2002) Pharmacological prevention of Parkinson disease in *Drosophila*. *Nat Med*, **8**, 1185-1186.
- Auluck, P.K., Chan, H.Y., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M. and Bonini, N.M. (2002) Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a *Drosophila* model for Parkinson's disease. *Science*, **295**, 865-868.
- Aure, K., Benoist, J.F., Ogier de Baulny, H., Romero, N.B., Rigal, O. and Lombes, A. (2004) Progression despite replacement of a myopathic form of coenzyme Q10 defect. *Neurology*, **63**, 727-729.
- Azizi, E., Zaidman, J.L., Eshchar, J. and Szeinberg, A. (1978) Abetalipoproteinemia treated with parenteral and oral vitamins A and E, and with medium chain triglycerides. *Acta Paediatr Scand*, **67**, 796-801.

- Baala, L., Audollent, S., Martinovic, J., Ozilou, C., Babron, M.C., Sivanandamoorthy, S., Saunier, S., Salomon, R., Gonzales, M., Rattenberry, E., Esculpavit, C., Toutain, A., Moraine, C., Parent, P., Marcorelles, P., Dauge, M.C., Roume, J., Le Merrer, M., Meiner, V., Meir, K., Menez, F., Beaufriere, A.M., Francannet, C., Tantau, J., Sinico, M., Dumez, Y., MacDonald, F., Munnich, A., Lyonnet, S., Gubler, M.C., Genin, E., Johnson, C.A., Vekemans, M., Encha-Razavi, F. and Attie-Bitach, T. (2007a) Pleiotropic effects of CEP290 (NPHP6) mutations extend to Meckel syndrome. *Am J Hum Genet*, **81**, 170-179.
- Baala, L., Romano, S., Khaddour, R., Saunier, S., Smith, U.M., Audollent, S., Ozilou, C., Faivre, L., Laurent, N., Foliguet, B., Munnich, A., Lyonnet, S., Salomon, R., Encha-Razavi, F., Gubler, M.C., Boddaert, N., de Lonlay, P., Johnson, C.A., Vekemans, M., Antignac, C. and Attie-Bitach, T. (2007b) The Meckel-Gruber syndrome gene, MKS3, is mutated in Joubert syndrome. *Am J Hum Genet*, **80**, 186-194.
- Baba, S.W., Belogrudov, G.I., Lee, J.C., Lee, P.T., Strahan, J., Shepherd, J.N. and Clarke, C.F. (2004) Yeast Coq5 C-methyltransferase is required for stability of other polypeptides involved in coenzyme Q biosynthesis. *J Biol Chem*, **279**, 10052-10059.
- Babcock, M., de Silva, D., Oaks, R., Davis-Kaplan, S., Jiralerspong, S., Montermini, L., Pandolfo, M. and Kaplan, J. (1997) Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science*, **276**, 1709-1712.
- Badano, J.L., Mitsuma, N., Beales, P.L. and Katsanis, N. (2006) The Ciliopathies: An Emerging Class of Human Genetic Disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, **7**, 125-148.
- Bakkenist, C.J. and Kastan, M.B. (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, **421**, 499-506.
- Barboi, A.C. (2000) Cerebellar ataxia. *Arch Neurol*, **57**, 1525-1527.
- Barbot, C., Coutinho, P., Choro, R., Ferreira, C., Barros, J., Fineza, I., Dias, K., Monteiro, J., Guimaraes, A., Mendonca, P., do Ceu Moreira, M. and Sequeiros, J. (2001) Recessive ataxia with ocular apraxia: review of 22 Portuguese patients. *Arch Neurol*, **58**, 201-205.
- Barkovich, R.J., Shtanko, A., Shepherd, J.A., Lee, P.T., Myles, D.C., Tzagoloff, A. and Clarke, C.F. (1997) Characterization of the COQ5 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a C-methyltransferase in ubiquinone biosynthesis. *J Biol Chem*, **272**, 9182-9188.
- Barlow, C., Dennery, P.A., Shigenaga, M.K., Smith, M.A., Morrow, J.D., Roberts, L.J., 2nd, Wynshaw-Boris, A. and Levine, R.L. (1999) Loss of the ataxia-telangiectasia gene product causes oxidative damage in target organs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 9915-9919.
- Barral, J.M., Broadley, S.A., Schaffar, G. and Hartl, F.U. (2004) Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases. *Semin Cell Dev Biol*, **15**, 17-29.
- Barros, M.H., Johnson, A., Gin, P., Marbois, B.N., Clarke, C.F. and Tzagoloff, A. (2005) The *Saccharomyces cerevisiae* COQ10 gene encodes a START domain protein required for function of coenzyme Q in respiration. *J Biol Chem*, **280**, 42627-42635.
- Bassen, F.A. and Kornzweig, A.L. (1950) Malformation of the erythrocytes in a case of atypical retinitis pigmentosa. *Blood*, **5**, 381-387.
- Begeer, J.H., Scholte, F.A. and van Essen, A.J. (1991) Two sisters with mental retardation, cataract, ataxia, progressive hearing loss, and polyneuropathy. *J Med Genet*, **28**, 884-885.
- Bekri, S., Kispal, G., Lange, H., Fitzsimons, E., Tolmie, J., Lill, R. and Bishop, D.F. (2000) Human ABC7 transporter: gene structure and mutation causing X-linked sideroblastic anemia with ataxia with disruption of cytosolic iron-sulfur protein maturation. *Blood*, **96**, 3256-3264.
- Belogrudov, G.I., Lee, P.T., Jonassen, T., Hsu, A.Y., Gin, P. and Clarke, C.F. (2001) Yeast COQ4 encodes a mitochondrial protein required for coenzyme Q synthesis. *Arch Biochem Biophys*, **392**, 48-58.
- Ben Hamida, C., Doerflinger, N., Belal, S., Linder, C., Reutenauer, L., Dib, C., Gyapay, G., Vignal, A., Le Paslier, D., Cohen, D. and et al. (1993a) Localization of Friedreich ataxia phenotype with selective vitamin E deficiency to chromosome 8q by homozygosity mapping. *Nat Genet*, **5**, 195-200.

- Ben Hamida, M., Belal, S., Sirugo, G., Ben Hamida, C., Panayides, K., Ionannou, P., Beckmann, J., Mandel, J.L., Hentati, F., Koenig, M. and et al. (1993b) Friedreich's ataxia phenotype not linked to chromosome 9 and associated with selective autosomal recessive vitamin E deficiency in two inbred Tunisian families. *Neurology*, **43**, 2179-2183.
- Benayoun, L., Granot, E., Rizel, L., Allon-Shalev, S., Behar, D.M. and Ben-Yosef, T. (2007) Abetalipoproteinemia in Israel: evidence for a founder mutation in the Ashkenazi Jewish population and a contiguous gene deletion in an Arab patient. *Mol Genet Metab*, **90**, 453-457.
- Benomar, A., Yahyaoui, M., Meggouh, F., Bouhouche, A., Boutchich, M., Bouslam, N., Zaim, A., Schmitt, M., Belaidi, H., Ouazzani, R., Chkili, T. and Koenig, M. (2002) Clinical comparison between AVED patients with 744 del A mutation and Friedreich ataxia with GAA expansion in 15 Moroccan families. *J Neurol Sci*, **198**, 25-29.
- Berciano, J., Infante, J., Garcia, A., Polo, J.M., Volpini, V. and Combarros, O. (2005) Very late-onset Friedreich's ataxia with minimal GAA1 expansion mimicking multiple system atrophy of cerebellar type. *Mov Disord*, **20**, 1643-1645.
- Berkovic, S.F., Mazarib, A., Walid, S., Neufeld, M.Y., Manelis, J., Nevo, Y., Korczyn, A.D., Yin, J., Xiong, L., Pandolfo, M., Mulley, J.C. and Wallace, R.H. (2005) A new clinical and molecular form of Unverricht-Lundborg disease localized by homozygosity mapping. *Brain*, **128**, 652-658.
- Bernstein, J., Evan, A.P. and Gardner, K.D., Jr. (1987) Human cystic kidney diseases: epithelial hyperplasia in the pathogenesis of cysts and tumors. *Pediatr Nephrol*, **1**, 393-396.
- Berriot-Varoqueaux, N., Aggerbeck, L.P., Samson-Bouma, M. and Wetterau, J.R. (2000) The role of the microsomal triglyceride transfer protein in abetalipoproteinemia. *Annu Rev Nutr*, **20**, 663-697.
- Berry-Kravis, E., Lewin, F., Wu, J., Leehey, M., Hagerman, R., Hagerman, P. and Goetz, C.G. (2003) Tremor and ataxia in fragile X premutation carriers: blinded videotape study. *Ann Neurol*, **53**, 616-623.
- Beyer, R.E., Segura-Aguilar, J., Di Bernardo, S., Cavazzoni, M., Fato, R., Fiorentini, D., Galli, M.C., Setti, M., Landi, L. and Lenaz, G. (1996) The role of DT-diaphorase in the maintenance of the reduced antioxidant form of coenzyme Q in membrane systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 2528-2532.
- Bhidayasiri, R., Perlman, S.L., Pulst, S.M. and Geschwind, D.H. (2005) Late-onset Friedreich ataxia: phenotypic analysis, magnetic resonance imaging findings, and review of the literature. *Arch Neurol*, **62**, 1865-1869.
- Biancalana, V., Toft, M., Le Ber, I., Tison, F., Scherrer, E., Thibodeau, S., Mandel, J.L., Brice, A., Farrer, M.J. and Durr, A. (2005) FMR1 premutations associated with fragile X-associated tremor/ataxia syndrome in multiple system atrophy. *Arch Neurol*, **62**, 962-966.
- Bidichandani, S.I., Ashizawa, T. and Patel, P.I. (1997) Atypical Friedreich ataxia caused by compound heterozygosity for a novel missense mutation and the GAA triplet-repeat expansion. *Am J Hum Genet*, **60**, 1251-1256.
- Bidichandani, S.I., Ashizawa, T. and Patel, P.I. (1998) The GAA triplet-repeat expansion in Friedreich ataxia interferes with transcription and may be associated with an unusual DNA structure. *Am J Hum Genet*, **62**, 111-121.
- Bidichandani, S.I., Garcia, C.A., Patel, P.I. and Dimachkie, M.M. (2000) Very late-onset Friedreich ataxia despite large GAA triplet repeat expansions. *Arch Neurol*, **57**, 246-251.
- Boddaert, N., Romano, S., Funalot, B., Rio, M., Sarzi, E., Lebre, A.S., Bahi-Buisson, N., Valayannopoulos, V., Desguerre, I., Seidenwurm, D., Brunelle, F., Brami-Zylberberg, F., Rotig, A., Munnich, A. and de Lonlay, P. (2007) 1H MRS spectroscopy evidence of cerebellar high lactate in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Mol Genet Metab*.
- Boitier, E., Degoul, F., Desguerre, I., Charpentier, C., Francois, D., Ponsot, G., Diry, M., Rustin, P. and Marsac, C. (1998) A case of mitochondrial encephalomyopathy associated with a muscle coenzyme Q10 deficiency. *J Neurol Sci*, **156**, 41-46.

- Boltshauser, E. and Isler, W. (1977) Joubert syndrome: episodic hyperpnea, abnormal eye movements, retardation and ataxia, associated with dysplasia of the cerebellar vermis. *Neuropadiatrie*, **8**, 57-66.
- Boltshauser, E., Lange, B. and Dumermuth, G. (1987) Differential diagnosis of syndromes with abnormal respiration (tachypnea-apnea). *Brain Dev*, **9**, 462-465.
- Bomar, J.M., Benke, P.J., Slattery, E.L., Puttagunta, R., Taylor, L.P., Seong, E., Nystuen, A., Chen, W., Albin, R.L., Patel, P.D., Kittles, R.A., Sheffield, V.C. and Burmeister, M. (2003) Mutations in a novel gene encoding a CRAL-TRIO domain cause human Cayman ataxia and ataxia/dystonia in the jittery mouse. *Nat Genet*, **35**, 264-269.
- Bomont, P., Watanabe, M., Gershoni-Barush, R., Shizuka, M., Tanaka, M., Sugano, J., Guiraud-Chaumeil, C. and Koenig, M. (2000) Homozygosity mapping of spinocerebellar ataxia with cerebellar atrophy and peripheral neuropathy to 9q33-34, and with hearing impairment and optic atrophy to 6p21-23. *Eur J Hum Genet*, **8**, 986-990.
- Bonnefond, L., Fender, A., Rudinger-Thirion, J., Giege, R., Florentz, C. and Sissler, M. (2005) Toward the full set of human mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases: characterization of AspRS and TyrRS. *Biochemistry*, **44**, 4805-4816.
- Borud, O., Aasly, J. and Lindal, S. (1989) Mitochondrial myopathy in six patients with Marinesco-Sjogren syndrome. *Prog Clin Biol Res*, **306**, 135-139.
- Bouchard, J.P., Barbeau, A., Bouchard, R. and Bouchard, R.W. (1978) Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Can J Neurol Sci*, **5**, 61-69.
- Bouchard, J.P., Richter, A., Mathieu, J., Brunet, D., Hudson, T.J., Morgan, K. and Melancon, S.B. (1998) Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Neuromuscul Disord*, **8**, 474-479.
- Bouslam, N., Bouhouche, A., Benomar, A., Hanein, S., Klebe, S., Azzedine, H., Di Giandomenico, S., Boland-Auge, A., Santorelli, F.M., Durr, A., Brice, A., Yahyaoui, M. and Stevanin, G. (2007) A novel locus for autosomal recessive spastic ataxia on chromosome 17p. *Hum Genet*, **121**, 413-420.
- Bousquet, I., Dujardin, G. and Slonimski, P.P. (1991) ABC1, a novel yeast nuclear gene has a dual function in mitochondria: it suppresses a cytochrome b mRNA translation defect and is essential for the electron transfer in the bc 1 complex. *Embo J*, **10**, 2023-2031.
- Braddock, S.R., Henley, K.M. and Maria, B.L. (2007) The face of Joubert syndrome: a study of dysmorphology and anthropometry. *Am J Med Genet A*, **143**, 3235-3242.
- Braegger, C.P., Belli, D.C., Mentha, G. and Steinmann, B. (1998) Persistence of the intestinal defect in abetalipoproteinaemia after liver transplantation. *Eur J Pediatr*, **157**, 576-578.
- Brancati, F., Barrano, G., Silhavy, J.L., Marsh, S.E., Travaglini, L., Bielas, S.L., Amorini, M., Zablocka, D., Kayserili, H., Al-Gazali, L., Bertini, E., Boltshauser, E., D'Hooghe, M., Fazzi, E., Fenerci, E.Y., Hennekam, R.C., Kiss, A., Lees, M.M., Marco, E., Phadke, S.R., Rigoli, L., Romano, S., Salpietro, C.D., Sherr, E.H., Signorini, S., Stromme, P., Stuart, B., Sztriha, L., Viskochil, D.H., Yuksel, A., Dallapiccola, B., Valente, E.M. and Gleeson, J.G. (2007) CEP290 mutations are frequently identified in the oculo-renal form of Joubert syndrome-related disorders. *Am J Hum Genet*, **81**, 104-113.
- Brasseur, G., Tron, G., Dujardin, G., Slonimski, P.P. and Brivet-Chevillotte, P. (1997) The nuclear ABC1 gene is essential for the correct conformation and functioning of the cytochrome bc1 complex and the neighbouring complexes II and IV in the mitochondrial respiratory chain. *Eur J Biochem*, **246**, 103-111.
- Breedveld, G.J., van Wetten, B., te Raa, G.D., Brusse, E., van Swieten, J.C., Oostra, B.A. and Maat-Kievit, J.A. (2004) A new locus for a childhood onset, slowly progressive autosomal recessive spinocerebellar ataxia maps to chromosome 11p15. *J Med Genet*, **41**, 858-866.
- Bromberg, M.B., Junck, L., Gebarski, S.S., McLean, M.J. and Gilman, S. (1990) The Marinesco-Sjogren syndrome examined by computed tomography, magnetic resonance, and 18F-2-fluoro-2-deoxy-D-glucose and positron emission tomography. *Arch Neurol*, **47**, 1239-1242.

- Browne, D.L., Ganchar, S.T., Nutt, J.G., Brunt, E.R., Smith, E.A., Kramer, P. and Litt, M. (1994) Episodic ataxia/myokymia syndrome is associated with point mutations in the human potassium channel gene, *KCNA1*. *Nat Genet*, **8**, 136-140.
- Brown, A., Bernier, G., Mathieu, M., Rossant, J., Kothary, R. (1995) The mouse dystonia musculorum gene is a neural isoform of bullous pemphigoid antigen 1. *Nat Genet*, **10**, 301-306
- Bruening, W., Roy, J., Giasson, B., Figlewicz, D.A., Mushynski, W.E. and Durham, H.D. (1999) Up-regulation of protein chaperones preserves viability of cells expressing toxic Cu/Zn-superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, **72**, 693-699.
- Buchner, J. (1999) Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem Sci*, **24**, 136-141.
- Bulteau, A.L., Ikeda-Saito, M. and Szweda, L.I. (2003) Redox-dependent modulation of aconitase activity in intact mitochondria. *Biochemistry*, **42**, 14846-14855.
- Bulteau, A.L., O'Neill, H.A., Kennedy, M.C., Ikeda-Saito, M., Isaya, G. and Szweda, L.I. (2004) Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. *Science*, **305**, 242-245.
- Burck, U., Goebel, H.H., Kuhlendahl, H.D., Meier, C. and Goebel, K.M. (1981) Neuromyopathy and vitamin E deficiency in man. *Neuropediatrics*, **12**, 267-278.
- Burkholder, W.F., Zhao, X., Zhu, X., Hendrickson, W.A., Gragerov, A. and Gottesman, M.E. (1996) Mutations in the C-terminal fragment of DnaK affecting peptide binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10632-10637.
- Buyse, G., Mertens, L., Di Salvo, G., Matthijs, I., Weidemann, F., Eyskens, B., Goossens, W., Goemans, N., Sutherland, G.R. and Van Hove, J.L. (2003) Idebenone treatment in Friedreich's ataxia: neurological, cardiac, and biochemical monitoring. *Neurology*, **60**, 1679-1681.
- Caldecott, K.W. (2003) DNA single-strand break repair and spinocerebellar ataxia. *Cell*, **112**, 7-10.
- Campbell, C., Mitui, M., Eng, L., Coutinho, G., Thorstenson, Y. and Gatti, R.A. (2003) ATM mutations on distinct SNP and STR haplotypes in ataxia-telangiectasia patients of differing ethnicities reveal ancestral founder effects. *Hum Mutat*, **21**, 80-85.
- Campuzano, V., Montermini, L., Lutz, Y., Cova, L., Hindelang, C., Jiralerspong, S., Trottier, Y., Kish, S.J., Faucheux, B., Trouillas, P., Authier, F.J., Durr, A., Mandel, J.L., Vescovi, A., Pandolfo, M. and Koenig, M. (1997) Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum Mol Genet*, **6**, 1771-1780.
- Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M.D., Pianese, L., Cossee, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., Zara, F., Canizares, J., Koutnikova, H., Bidichandani, S.I., Gellera, C., Brice, A., Trouillas, P., De Michele, G., Filla, A., De Frutos, R., Palau, F., Patel, P.I., Di Donato, S., Mandel, J.L., Coccozza, S., Koenig, M. and Pandolfo, M. (1996) Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science*, **271**, 1423-1427.
- Caridi, G., Murer, L., Bellantuono, R., Sorino, P., Caringella, D.A., Gusmano, R. and Ghiggeri, G.M. (1998) Renal-retinal syndromes: association of retinal anomalies and recessive nephronophthisis in patients with homozygous deletion of the *NPH1* locus. *Am J Kidney Dis*, **32**, 1059-1062.
- Carney, J.P., Maser, R.S., Olivares, H., Davis, E.M., Le Beau, M., Yates, J.R., 3rd, Hays, L., Morgan, W.F. and Petrini, J.H. (1998) The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell*, **93**, 477-486.
- Carpenter, S., Karpati, G. and Eisen, A.A. (1975) A morphologic study of muscle in polymyositis: clues to pathogenesis of different types. In: *Excerpta Medica*, Amsterdam, pp. 374-379.
- Casari, G., De Fusco, M., Ciarmatori, S., Zeviani, M., Mora, M., Fernandez, P., De Michele, G., Filla, A., Coccozza, S., Marconi, R., Durr, A., Fontaine, B. and Ballabio, A. (1998) Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell*, **93**, 973-983.
- Cavadini, P., O'Neill, H.A., Benada, O. and Isaya, G. (2002) Assembly and iron-binding properties of human frataxin, the protein deficient in Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet*, **11**, 217-227.



- Cavalier, L., Ouahchi, K., Kayden, H.J., Di Donato, S., Reutenauer, L., Mandel, J.L. and Koenig, M. (1998) Ataxia with isolated vitamin E deficiency: heterogeneity of mutations and phenotypic variability in a large number of families. *Am J Hum Genet*, **62**, 301-310.
- Chance, P.F., Cavalier, L., Satran, D., Pellegrino, J.E., Koenig, M. and Dobyns, W.B. (1999) Clinical nosologic and genetic aspects of Joubert and related syndromes. *J Child Neurol*, **14**, 660-666; discussion 669-672.
- Chen, D.H., Brkanac, Z., Verlinde, C.L., Tan, X.J., Bylenok, L., Nochlin, D., Matsushita, M., Lipe, H., Wolff, J., Fernandez, M., Cimino, P.J., Bird, T.D. and Raskind, W.H. (2003) Missense mutations in the regulatory domain of PKC gamma: a new mechanism for dominant nonepisodic cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet*, **72**, 839-849.
- Chen, O.S., Hemenway, S. and Kaplan, J. (2002) Inhibition of Fe-S cluster biosynthesis decreases mitochondrial iron export: evidence that Yfh1p affects Fe-S cluster synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 12321-12326.
- Chen, Y.Z., Bennett, C.L., Huynh, H.M., Blair, I.P., Puls, I., Irobi, J., Dierick, I., Abel, A., Kennerson, M.L., Rabin, B.A., Nicholson, G.A., Auer-Grumbach, M., Wagner, K., De Jonghe, P., Griffin, J.W., Fischbeck, K.H., Timmerman, V., Cornblath, D.R. and Chance, P.F. (2004) DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *Am J Hum Genet*, **74**, 1128-1135.
- Chen, Y.Z., Hashemi, S.H., Anderson, S.K., Huang, Y., Moreira, M.C., Lynch, D.R., Glass, I.A., Chance, P.F. and Bennett, C.L. (2006) Senataxin, the yeast Sen1p orthologue: characterization of a unique protein in which recessive mutations cause ataxia and dominant mutations cause motor neuron disease. *Neurobiol Dis*, **23**, 97-108.
- Chun, H.H. and Gatti, R.A. (2004) Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 1187-1196.
- Chung, K.T., Shen, Y. and Hendershot, L.M. (2002) BAP, a mammalian BiP-associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BiP. *J Biol Chem*, **277**, 47557-47563.
- Clements, P.M., Breslin, C., Deeks, E.D., Byrd, P.J., Ju, L., Bieganowski, P., Brenner, C., Moreira, M.C., Taylor, A.M. and Caldecott, K.W. (2004) The ataxia-oculomotor apraxia 1 gene product has a role distinct from ATM and interacts with the DNA strand break repair proteins XRCC1 and XRCC4. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 1493-1502.
- Collins, F.S. (1992) Positional cloning: let's not call it reverse anymore. *Nat Genet*, **1**, 3-6.
- Cornell, B.A., Keniry, M.A., Post, A., Robertson, R.N., Weir, L.E. and Westerman, P.W. (1987) Location and activity of ubiquinone 10 and ubiquinone analogues in model and biological membranes. *Biochemistry*, **26**, 7702-7707.
- Cossee, M., Campuzano, V., Koutnikova, H., Fischbeck, K., Mandel, J.L., Koenig, M., Bidichandani, S.I., Patel, P.I., Molte, M.D., Canizares, J., De Frutos, R., Pianese, L., Cavalcanti, F., Monticelli, A., Coccozza, S., Montermini, L. and Pandolfo, M. (1997) Frataxin fracas. *Nat Genet*, **15**, 337-338.
- Cossee, M., Durr, A., Schmitt, M., Dahl, N., Trouillas, P., Allinson, P., Kostrzewa, M., Nivelon-Chevallier, A., Gustavson, K.H., Kohlschutter, A., Muller, U., Mandel, J.L., Brice, A., Koenig, M., Cavalcanti, F., Tammara, A., De Michele, G., Filla, A., Coccozza, S., Labuda, M., Montermini, L., Poirier, J. and Pandolfo, M. (1999) Friedreich's ataxia: point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes. *Ann Neurol*, **45**, 200-206.
- Cossee, M., Puccio, H., Gansmuller, A., Koutnikova, H., Dierich, A., LeMeur, M., Fischbeck, K., Dolle, P. and Koenig, M. (2000) Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum Mol Genet*, **9**, 1219-1226.
- Crane, F.L. (2007) Discovery of ubiquinone (coenzyme Q) and an overview of function. *Mitochondrion*, **7 Suppl**, S2-7.
- Crane, F.L., Hatefi, Y., Lester, R.L. and Widmer, C. (1957) Isolation of a quinone from beef heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, **25**, 220-221.

- Crane, F.L., Sun, I.L., Barr, R. and Low, H. (1991) Electron and proton transport across the plasma membrane. *J Bioenerg Biomembr*, **23**, 773-803.
- Criscuolo, C., Banfi, S., Orio, M., Gasparini, P., Monticelli, A., Scarano, V., Santorelli, F.M., Perretti, A., Santoro, L., De Michele, G. and Filla, A. (2004a) A novel mutation in SACS gene in a family from southern Italy. *Neurology*, **62**, 100-102.
- Criscuolo, C., Chessa, L., Di Giandomenico, S., Mancini, P., Sacca, F., Grieco, G.S., Piane, M., Barbieri, F., De Michele, G., Banfi, S., Pierelli, F., Rizzuto, N., Santorelli, F.M., Gallosti, L., Filla, A. and Casali, C. (2006) Ataxia with oculomotor apraxia type 2: a clinical, pathologic, and genetic study. *Neurology*, **66**, 1207-1210.
- Criscuolo, C., Mancini, P., Menchise, V., Sacca, F., De Michele, G., Banfi, S. and Filla, A. (2005) Very late onset in ataxia oculomotor apraxia type I. *Ann Neurol*, **57**, 777.
- Criscuolo, C., Mancini, P., Sacca, F., De Michele, G., Monticelli, A., Santoro, L., Scarano, V., Banfi, S. and Filla, A. (2004b) Ataxia with oculomotor apraxia type 1 in Southern Italy: late onset and variable phenotype. *Neurology*, **63**, 2173-2175.
- Cuervo, A.M. and Dice, J.F. (1998) Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *J Mol Med*, **76**, 6-12.
- Cummings, C.J., Sun, Y., Opal, P., Antalffy, B., Mestri, R., Orr, H.T., Dillmann, W.H. and Zoghbi, H.Y. (2001) Over-expression of inducible HSP70 chaperone suppresses neuropathology and improves motor function in SCA1 mice. *Hum Mol Genet*, **10**, 1511-1518.
- Date, H., Onodera, O., Tanaka, H., Iwabuchi, K., Uekawa, K., Igarashi, S., Koike, R., Hiroi, T., Yuasa, T., Awaya, Y., Sakai, T., Takahashi, T., Nagatomo, H., Sekijima, Y., Kawachi, I., Takiyama, Y., Nishizawa, M., Fukuhara, N., Saito, K., Sugano, S. and Tsuji, S. (2001) Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene. *Nat Genet*, **29**, 184-188.
- Davidzon, G., Greene, P., Mancuso, M., Klos, K.J., Ahlskog, J.E., Hirano, M. and DiMauro, S. (2006) Early-onset familial parkinsonism due to POLG mutations. *Ann Neurol*, **59**, 859-862.
- Dawe, H.R., Smith, U.M., Cullinane, A.R., Gerrelli, D., Cox, P., Badano, J.L., Blair-Reid, S., Sriram, N., Katsanis, N., Attie-Bitach, T., Afford, S.C., Copp, A.J., Kelly, D.A., Gull, K. and Johnson, C.A. (2007) The Meckel-Gruber Syndrome proteins MKS1 and meckelin interact and are required for primary cilium formation. *Hum Mol Genet*, **16**, 173-186.
- de Coo, I.F., Smeets, H.J., Gabreels, F.J., Arts, N. and van Oost, B.A. (1996) Isolated case of mental retardation and ataxia due to a de novo mitochondrial T8993G mutation. *Am J Hum Genet*, **58**, 636-638.
- de Jager, M., Wyman, C., van Gent, D.C. and Kanaar, R. (2002) DNA end-binding specificity of human Rad50/Mre11 is influenced by ATP. *Nucleic Acids Res*, **30**, 4425-4431.
- Dekaban, A.S. (1969) Hereditary syndrome of congenital retinal blindness (Leber), polycystic kidneys and maldevelopment of the brain. *Am J Ophthalmol*, **68**, 1029-1037.
- Delague, V., Bareil, C., Bouvagnet, P., Salem, N., Chouery, E., Loiselet, J., Megarbane, A. and Claustres, M. (2001) Nonprogressive autosomal recessive ataxia maps to chromosome 9q34-9qter in a large consanguineous Lebanese family. *Ann Neurol*, **50**, 250-253.
- Delague, V., Bareil, C., Bouvagnet, P., Salem, N., Chouery, E., Loiselet, J., Megarbane, A. and Claustres, M. (2002) A new autosomal recessive non-progressive congenital cerebellar ataxia associated with mental retardation, optic atrophy, and skin abnormalities (CAMOS) maps to chromosome 15q24-q26 in a large consanguineous Lebanese Druze Family. *Neurogenetics*, **4**, 23-27.
- Delatycki, M.B., Williamson, R. and Forrest, S.M. (2000) Friedreich ataxia: an overview. *J Med Genet*, **37**, 1-8.
- Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E., Astarie-Dequeker, C., Lasquelléc, L., Arnaud, B., Ducommun, B., Kaplan, J. and Hamel, C.P. (2000) Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet*, **26**, 207-210.

- Delia, D., Piane, M., Buscemi, G., Savio, C., Palmeri, S., Lulli, P., Carlessi, L., Fontanella, E. and Chessa, L. (2004) MRE11 mutations and impaired ATM-dependent responses in an Italian family with ataxia-telangiectasia-like disorder. *Hum Mol Genet*, **13**, 2155-2163.
- Delous, M., Baala, L., Salomon, R., Laclef, C., Vierkotten, J., Tory, K., Golzio, C., Lacoste, T., Besse, L., Ozilou, C., Moutkine, I., Hellman, N.E., Anselme, I., Silbermann, F., Vesque, C., Gerhardt, C., Rattenberry, E., Wolf, M.T., Gubler, M.C., Martinovic, J., Encha-Razavi, F., Boddaert, N., Gonzales, M., Macher, M.A., Nivet, H., Champion, G., Bertheleme, J.P., Niaudet, P., McDonald, F., Hildebrandt, F., Johnson, C.A., Vekemans, M., Antignac, C., Ruther, U., Schneider-Maunoury, S., Attie-Bitach, T. and Saunier, S. (2007) The ciliary gene RPGRIP1L is mutated in cerebello-oculo-renal syndrome (Joubert syndrome type B) and Meckel syndrome. *Nat Genet*, **39**, 875-881.
- den Hollander, A.I., Koenekoop, R.K., Yzer, S., Lopez, I., Arends, M.L., Voeselek, K.E., Zonneveld, M.N., Strom, T.M., Meitinger, T., Brunner, H.G., Hoyng, C.B., van den Born, L.I., Rohrschneider, K. and Cremers, F.P. (2006) Mutations in the CEP290 (NPHP6) gene are a frequent cause of Leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet*, **79**, 556-561.
- Di Donato, S., Gellera, C. and Mariotti, C. (2001) The complex clinical and genetic classification of inherited ataxias. II. Autosomal recessive ataxias. *Neurol Sci*, **22**, 219-228.
- Di Giovanni, S., Mirabella, M., Spinazzola, A., Crociani, P., Silvestri, G., Broccolini, A., Tonali, P., Di Mauro, S. and Servidei, S. (2001) Coenzyme Q10 reverses pathological phenotype and reduces apoptosis in familial CoQ10 deficiency. *Neurology*, **57**, 515-518.
- Dib, C., Faure, S., Fizames, C., Samson, D., Drouot, N., Vignal, A., Millasseau, P., Marc, S., Hazan, J., Seboun, E., Lathrop, M., Gyapay, G., Morissette, J. and Weissenbach, J. (1996) A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature*, **380**, 152-154.
- Dibrov, E., Robinson, K.M. and Lemire, B.D. (1997) The COQ5 gene encodes a yeast mitochondrial protein necessary for ubiquinone biosynthesis and the assembly of the respiratory chain. *J Biol Chem*, **272**, 9175-9181.
- DiMauro, S., Hirano, M. and Schon, E.A. (2006) Approaches to the treatment of mitochondrial diseases. *Muscle Nerve*, **34**, 265-283.
- DiMauro, S. and Schon, E.A. (2003) Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med*, **348**, 2656-2668.
- Diomedei-Camassei, F., Di Giandomenico, S., Santorelli, F.M., Caridi, G., Piemonte, F., Montini, G., Ghiggeri, G.M., Murer, L., Barisoni, L., Pastore, A., Muda, A.O., Valente, M.L., Bertini, E. and Emma, F. (2007) COQ2 nephropathy: a newly described inherited mitochondriopathy with primary renal involvement. *J Am Soc Nephrol*, **18**, 2773-2780.
- Dixon-Salazar, T., Silhavy, J.L., Marsh, S.E., Louie, C.M., Scott, L.C., Gururaj, A., Al-Gazali, L., Al-Tawari, A.A., Kayserili, H., Sztriha, L. and Gleeson, J.G. (2004) Mutations in the AHI1 gene, encoding joubertin, cause Joubert syndrome with cortical polymicrogyria. *Am J Hum Genet*, **75**, 979-987.
- Do, T.Q., Hsu, A.Y., Jonassen, T., Lee, P.T. and Clarke, C.F. (2001) A defect in coenzyme Q biosynthesis is responsible for the respiratory deficiency in *Saccharomyces cerevisiae* abc1 mutants. *J Biol Chem*, **276**, 18161-18168.
- Dobrowolski, S.F., McKinney, J.T., Amat di San Filippo, C., Giak Sim, K., Wilcken, B. and Longo, N. (2005) Validation of dye-binding/high-resolution thermal denaturation for the identification of mutations in the SLC22A5 gene. *Hum Mutat*, **25**, 306-313.
- Dotti, M.T., Bardelli, A.M., De Stefano, N., Federico, A., Malandrini, A., Vanni, M. and Guazzi, G.C. (1993) Optic atrophy in Marinesco-Sjogren syndrome: an additional ocular feature. Report of three cases in two families. *Ophthalmic Paediatr Genet*, **14**, 5-7.
- Dou, F., Netzer, W.J., Tanemura, K., Li, F., Hartl, F.U., Takashima, A., Gouras, G.K., Greengard, P. and Xu, H. (2003) Chaperones increase association of tau protein with microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 721-726.
- Duby, G., Foury, F., Ramazzotti, A., Herrmann, J. and Lutz, T. (2002) A non-essential function for yeast frataxin in iron-sulfur cluster assembly. *Hum Mol Genet*, **11**, 2635-2643.

- Duenas, A.M., Goold, R. and Giunti, P. (2006) Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain*, **129**, 1357-1370.
- Dupre, N., Gros-Louis, F., Chrestian, N., Verreault, S., Brunet, D., de Verteuil, D., Brais, B., Bouchard, J.P. and Rouleau, G.A. (2007) Clinical and genetic study of autosomal recessive cerebellar ataxia type 1. *Ann Neurol*, **62**, 93-98.
- Duquette, A., Roddier, K., McNabb-Baltar, J., Gosselin, I., St-Denis, A., Dicaire, M.J., Loisel, L., Labuda, D., Marchand, L., Mathieu, J., Bouchard, J.P. and Brais, B. (2005) Mutations in senataxin responsible for Quebec cluster of ataxia with neuropathy. *Ann Neurol*, **57**, 408-414.
- Durr, A., Cossee, M., Agid, Y., Campuzano, V., Mignard, C., Penet, C., Mandel, J.L., Brice, A. and Koenig, M. (1996) Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. *N Engl J Med*, **335**, 1169-1175.
- Echtay, K.S. (2007) Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? *Free Radic Biol Med*, **43**, 1351-1371.
- Echtay, K.S., Winkler, E. and Klingenberg, M. (2000) Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function. *Nature*, **408**, 609-613.
- Edvardson, S., Shaag, A., Kolesnikova, O., Gomori, J.M., Tarassov, I., Einbinder, T., Saada, A. and Elpeleg, O. (2007) Deleterious mutation in the mitochondrial arginyl-transfer RNA synthetase gene is associated with pontocerebellar hypoplasia. *Am J Hum Genet*, **81**, 857-862.
- El Euch-Fayache, G., Lalani, I., Amouri, R., Turki, I., Ouahchi, K., Hung, W.Y., Belal, S., Siddique, T. and Hentati, F. (2003) Phenotypic features and genetic findings in saccin-related autosomal recessive ataxia in Tunisia. *Arch Neurol*, **60**, 982-988.
- El-Khamisy, S.F., Hartsuiker, E. and Caldecott, K.W. (2007) TDP1 facilitates repair of ionizing radiation-induced DNA single-strand breaks. *DNA Repair (Amst)*, **6**, 1485-1495.
- El-Khamisy, S.F., Saifi, G.M., Weinfeld, M., Johansson, F., Helleday, T., Lupski, J.R. and Caldecott, K.W. (2005) Defective DNA single-strand break repair in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1. *Nature*, **434**, 108-113.
- El-Shanti, H., Daoud, A., Sadoon, A.A., Leal, S.M., Chen, S., Lee, K. and Spiegel, R. (2006) A distinct autosomal recessive ataxia maps to chromosome 12 in an inbred family from Jordan. *Brain Dev*, **28**, 353-357.
- Elleuch, N., Depienne, C., Benomar, A., Hernandez, A.M., Ferrer, X., Fontaine, B., Grid, D., Tallaksen, C.M., Zemmouri, R., Stevanin, G., Durr, A. and Brice, A. (2006) Mutation analysis of the paraplegin gene (SPG7) in patients with hereditary spastic paraplegia. *Neurology*, **66**, 654-659.
- Ellis, R.J. (2001) Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr Opin Struct Biol*, **11**, 114-119.
- Engel, W.K. and Cunningham, G.G. (1963) Rapid Examination of Muscle Tissue. An Improved Trichrome Method for Fresh-Frozen Biopsy Sections. *Neurology*, **13**, 919-923.
- Engert, J.C., Berube, P., Mercier, J., Dore, C., Lepage, P., Ge, B., Bouchard, J.P., Mathieu, J., Melancon, S.B., Schalling, M., Lander, E.S., Morgan, K., Hudson, T.J. and Richter, A. (2000) ARSACS, a spastic ataxia common in northeastern Quebec, is caused by mutations in a new gene encoding an 11.5-kb ORF. *Nat Genet*, **24**, 120-125.
- Escayg, A., De Waard, M., Lee, D.D., Bichet, D., Wolf, P., Mayer, T., Johnston, J., Baloh, R., Sander, T. and Meisler, M.H. (2000) Coding and noncoding variation of the human calcium-channel beta4-subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia. *Am J Hum Genet*, **66**, 1531-1539.
- Evgrafov, O.V., Mersiyanova, I., Irobi, J., Van Den Bosch, L., Dierick, I., Leung, C.L., Schagina, O., Verpoorten, N., Van Impe, K., Fedotov, V., Dadali, E., Auer-Grumbach, M., Windpassinger, C., Wagner, K., Mitrovic, Z., Hilton-Jones, D., Talbot, K., Martin, J.J., Vasserman, N., Tverskaya, S., Polyakov, A., Liem, R.K., Gettemans, J., Robberecht, W., De Jonghe, P. and Timmerman, V. (2004) Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy. *Nat Genet*, **36**, 602-606.

- Ewbank, J.J., Barnes, T.M., Lakowski, B., Lussier, M., Bussey, H. and Hekimi, S. (1997) Structural and functional conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene *clk-1*. *Science*, **275**, 980-983.
- Fadic, R., Russell, J.A., Vedanarayanan, V.V., Lehar, M., Kuncl, R.W. and Johns, D.R. (1997) Sensory ataxic neuropathy as the presenting feature of a novel mitochondrial disease. *Neurology*, **49**, 239-245.
- Farah, S., Sabry, M.A., Khuraibet, A.J., Anim, J.T., Quasrawi, B., Al-Khatam, S., Al-Busairi, W., Hussein, J.M., Khan, R.A. and Al-Awadi, S.A. (1997) Marinesco-Sjogren syndrome in a Bedouin family. *Acta Neurol Scand*, **96**, 387-391.
- Fardeau, M. (1970) Ultrastructural lesions in progressive muscular dystrophies: a critical study of their specificity. In: *Excerpta Medica*, Amsterdam, pp. 98-108.
- Ferland, R.J., Eyaid, W., Collura, R.V., Tully, L.D., Hill, R.S., Al-Nouri, D., Al-Rumayyan, A., Topcu, M., Gascon, G., Bodell, A., Shugart, Y.Y., Ruvolo, M. and Walsh, C.A. (2004) Abnormal cerebellar development and axonal decussation due to mutations in *AH11* in Joubert syndrome. *Nat Genet*, **36**, 1008-1013.
- Fernet, M., Gribaa, M., Salih, M.A., Seidahmed, M.Z., Hall, J. and Koenig, M. (2005) Identification and functional consequences of a novel *MRE11* mutation affecting 10 Saudi Arabian patients with the ataxia telangiectasia-like disorder. *Hum Mol Genet*, **14**, 307-318.
- Ferrari, G., Lamantea, E., Donati, A., Filosto, M., Briem, E., Carrara, F., Parini, R., Simonati, A., Santer, R. and Zeviani, M. (2005) Infantile hepatocerebral syndromes associated with mutations in the mitochondrial DNA polymerase-gammaA. *Brain*, **128**, 723-731.
- Festenstien, G.N., Heaton, F.W., Lowe, J.S. and Morton, R.A. (1955) A constituent of the unsaponifiable portion of animal tissue lipids ( $\lambda$  max. 272 m  $\mu$ ). *Biochem J*, **59**, 558-566.
- Filla, A., De Michele, G., Cavalcanti, F., Pianese, L., Monticelli, A., Campanella, G. and Coccozza, S. (1996) The relationship between trinucleotide (GAA) repeat length and clinical features in Friedreich ataxia. *Am J Hum Genet*, **59**, 554-560.
- Fink, A.L. (1999) Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev*, **79**, 425-449.
- Fliegau, M., Horvath, J., von Schnakenburg, C., Olbrich, H., Muller, D., Thumfart, J., Schermer, B., Pazour, G.J., Neumann, H.P., Zentgraf, H., Benzing, T. and Omran, H. (2006) Nephrocystin specifically localizes to the transition zone of renal and respiratory cilia and photoreceptor connecting cilia. *J Am Soc Nephrol*, **17**, 2424-2433.
- Fogel, B.L. and Perlman, S. (2007) Clinical features and molecular genetics of autosomal recessive cerebellar ataxias. *Lancet Neurol*, **6**, 245-257.
- Fontaine, E., Eriksson, O., Ichas, F. and Bernardi, P. (1998) Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation By electron flow through the respiratory chain complex i. *J Biol Chem*, **273**, 12662-12668.
- Forsgren, M., Attersand, A., Lake, S., Grunler, J., Swiezewska, E., Dallner, G. and Climent, I. (2004) Isolation and functional expression of human *COQ2*, a gene encoding a polyprenyl transferase involved in the synthesis of CoQ. *Biochem J*, **382**, 519-526.
- Forsmark-Andree, P., Dallner, G. and Ernster, L. (1995) Endogenous ubiquinol prevents protein modification accompanying lipid peroxidation in beef heart submitochondrial particles. *Free Radic Biol Med*, **19**, 749-757.
- Foury, F. and Cazzalini, O. (1997) Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Lett*, **411**, 373-377.
- Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G.V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R.S., Danial, N.N., De Strooper, B. and Scorrano, L. (2006) OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell*, **126**, 177-189.
- Fujigasaki, H., Verma, I.C., Camuzat, A., Margolis, R.L., Zander, C., Lebre, A.S., Jamot, L., Saxena, R., Anand, I., Holmes, S.E., Ross, C.A., Durr, A. and Brice, A. (2001) *SCA12* is a rare locus for autosomal dominant cerebellar ataxia: a study of an Indian family. *Ann Neurol*, **49**, 117-121.

- Fukuhara, N., Nakajima, T., Sakajiri, K., Matsubara, N. and Fujita, M. (1995) Hereditary motor and sensory neuropathy associated with cerebellar atrophy (HMSNCA): a new disease. *J Neurol Sci*, **133**, 140-151.
- Gabsi, S., Gouider-Khouja, N., Belal, S., Fki, M., Kefi, M., Turki, I., Ben Hamida, M., Kayden, H., Mebazaa, R. and Hentati, F. (2001) Effect of vitamin E supplementation in patients with ataxia with vitamin E deficiency. *Eur J Neurol*, **8**, 477-481.
- Gakh, O., Adamec, J., Gacy, A.M., Twosten, R.D., Owen, W.G. and Isaya, G. (2002) Physical evidence that yeast frataxin is an iron storage protein. *Biochemistry*, **41**, 6798-6804.
- Gakh, O., Park, S., Liu, G., Macomber, L., Imlay, J.A., Ferreira, G.C. and Isaya, G. (2006) Mitochondrial iron detoxification is a primary function of frataxin that limits oxidative damage and preserves cell longevity. *Hum Mol Genet*, **15**, 467-479.
- Garcia, A., Criscuolo, C., de Michele, G. and Berciano, J. (2007) Neurophysiological study in a Spanish family with recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Muscle Nerve*, **37**, 107-110.
- Gatchel, J.R. and Zoghbi, H.Y. (2005) Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. *Nat Rev Genet*, **6**, 743-755.
- Gatti, R.A., Boder, E., Vinters, H.V., Sparkes, R.S., Norman, A. and Lange, K. (1991) Ataxia-telangiectasia: an interdisciplinary approach to pathogenesis. *Medicine (Baltimore)*, **70**, 99-117.
- Gellera, C., Castellotti, B., Mariotti, C., Mineri, R., Seveso, V., Didonato, S. and Taroni, F. (2007) Frataxin gene point mutations in Italian Friedreich ataxia patients. *Neurogenetics*, **8**, 289-299.
- Gellera, C., Pareyson, D., Castellotti, B., Mazzucchelli, F., Zappacosta, B., Pandolfo, M. and Di Donato, S. (1997) Very late onset Friedreich's ataxia without cardiomyopathy is associated with limited GAA expansion in the X25 gene. *Neurology*, **49**, 1153-1155.
- Gempel, K., Topaloglu, H., Talim, B., Schneiderat, P., Schoser, B.G., Hans, V.H., Palmafy, B., Kale, G., Tokatli, A., Quinzii, C., Hirano, M., Naini, A., DiMauro, S., Prokisch, H., Lochmuller, H. and Horvath, R. (2007) The myopathic form of coenzyme Q10 deficiency is caused by mutations in the electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase (ETFDH) gene. *Brain*, **130**, 2037-2044.
- Georgy, B.A., Snow, R.D., Brogdon, B.G. and Wertelecki, W. (1998) Neuroradiologic findings in Marinesco-Sjogren syndrome. *AJNR Am J Neuroradiol*, **19**, 281-283.
- Gerber, J., Muhlenhoff, U. and Lill, R. (2003) An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Rep*, **4**, 906-911.
- Gething, M.J. (1999) Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol*, **10**, 465-472.
- Gilad, S., Chessa, L., Khosravi, R., Russell, P., Galanty, Y., Piane, M., Gatti, R.A., Jorgensen, T.J., Shiloh, Y. and Bar-Shira, A. (1998) Genotype-phenotype relationships in ataxia-telangiectasia and variants. *Am J Hum Genet*, **62**, 551-561.
- Giles, R.E., Blanc, H., Cann, R.M. and Wallace, D.C. (1980) Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci Usa*, **77**, 6715-6719.
- Gille, L. and Nohl, H. (2000) The existence of a lysosomal redox chain and the role of ubiquinone. *Arch Biochem Biophys*, **375**, 347-354.
- Gin, P. and Clarke, C.F. (2005) Genetic evidence for a multi-subunit complex in coenzyme Q biosynthesis in yeast and the role of the Coq1 hexaprenyl diphosphate synthase. *J Biol Chem*, **280**, 2676-2681.
- Gin, P., Hsu, A.Y., Rothman, S.C., Jonassen, T., Lee, P.T., Tzagoloff, A. and Clarke, C.F. (2003) The *Saccharomyces cerevisiae* COQ6 gene encodes a mitochondrial flavin-dependent monooxygenase required for coenzyme Q biosynthesis. *J Biol Chem*, **278**, 25308-25316.
- Gironi, M., Lamperti, C., Nemni, R., Moggio, M., Comi, G., Guerini, F.R., Ferrante, P., Canal, N., Naini, A., Bresolin, N. and DiMauro, S. (2004) Late-onset cerebellar ataxia with hypogonadism and muscle coenzyme Q10 deficiency. *Neurology*, **62**, 818-820.
- Gitschier, J., Wood, W.I., Goralka, T.M., Wion, K.L., Chen, E.Y., Eaton, D.H., Vehar, G.A., Capon, D.J. and Lawn, R.M. (1984) Characterization of the human factor VIII gene. *Nature*, **312**, 326-330.
- Gitten, J., Dede, D., Fennell, E., Quisling, R. and Maria, B.L. (1998) Neurobehavioral development in Joubert syndrome. *J Child Neurol*, **13**, 391-397.

- Gorbunova, V. and Seluanov, A. (2002) CLK-1 protein has DNA binding activity specific to O(L) region of mitochondrial DNA. *FEBS Lett*, **516**, 279-284.
- Goto, Y., Komiyama, A., Tanabe, Y., Katafuchi, Y., Ohtaki, E. and Nonaka, I. (1990) Myopathy in Marinesco-Sjogren syndrome: an ultrastructural study. *Acta Neuropathol*, **80**, 123-128.
- Gotoda, T., Arita, M., Arai, H., Inoue, K., Yokota, T., Fukuo, Y., Yazaki, Y. and Yamada, N. (1995) Adult-onset spinocerebellar dysfunction caused by a mutation in the gene for the alpha-tocopherol-transfer protein. *N Engl J Med*, **333**, 1313-1318.
- Grabczyk, E. and Usdin, K. (2000) The GAA\*TTC triplet repeat expanded in Friedreich's ataxia impedes transcription elongation by T7 RNA polymerase in a length and supercoil dependent manner. *Nucleic Acids Res*, **28**, 2815-2822.
- Grady, R.M., Starr, D.A., Ackerman, G.L., Sanes, J.R. and Han, M. (2005) Syne proteins anchor muscle nuclei at the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 4359-4364.
- Greco, C.M., Berman, R.F., Martin, R.M., Tassone, F., Schwartz, P.H., Chang, A., Trapp, B.D., Iwahashi, C., Brunberg, J., Grigsby, J., Hessel, D., Becker, E.J., Papazian, J., Leehey, M.A., Hagerman, R.J. and Hagerman, P.J. (2006) Neuropathology of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Brain*, **129**, 243-255.
- Gribaa, M., Salih, M., Anheim, M., Lagier-Tourenne, C., H'Mida, D., Drouot, N., Mohamed, A., Elmalik, S., Kabiraj, M., Al-Rayess, M., Almubarak, M., Betard, C., Goebel, H. and Koenig, M. (2007) A new form of childhood onset, autosomal recessive spinocerebellar ataxia and epilepsy is localized at 16q21-q23. *Brain*, **130**, 1921-1928.
- Grieco, G.S., Malandrini, A., Comanducci, G., Leuzzi, V., Valoppi, M., Tessa, A., Palmeri, S., Benedetti, L., Pierallini, A., Gambelli, S., Federico, A., Pierelli, F., Bertini, E., Casali, C. and Santorelli, F.M. (2004) Novel SACS mutations in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay type. *Neurology*, **62**, 103-106.
- Gros-Louis, F., Dupre, N., Dion, P., Fox, M.A., Laurent, S., Verreault, S., Sanes, J.R., Bouchard, J.P. and Rouleau, G.A. (2007) Mutations in SYNE1 lead to a newly discovered form of autosomal recessive cerebellar ataxia. *Nat Genet*, **39**, 80-85.
- Gueven, N., Becherel, O.J., Kijas, A.W., Chen, P., Howe, O., Rudolph, J.H., Gatti, R., Date, H., Onodera, O., Taucher-Scholz, G. and Lavin, M.F. (2004) Aprataxin, a novel protein that protects against genotoxic stress. *Hum Mol Genet*, **13**, 1081-1093.
- Hagerman, R.J., Leavitt, B.R., Farzin, F., Jacquemont, S., Greco, C.M., Brunberg, J.A., Tassone, F., Hessel, D., Harris, S.W., Zhang, L., Jardini, T., Gane, L.W., Ferranti, J., Ruiz, L., Leehey, M.A., Grigsby, J. and Hagerman, P.J. (2004) Fragile-X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) in females with the FMR1 premutation. *Am J Hum Genet*, **74**, 1051-1056.
- Hagerman, R.J., Leehey, M., Heinrichs, W., Tassone, F., Wilson, R., Hills, J., Grigsby, J., Gage, B. and Hagerman, P.J. (2001) Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology*, **57**, 127-130.
- Hakamada, S., Sobue, G., Watanabe, K., Kumagai, T., Hara, K. and Miyazaki, S. (1981) Peripheral neuropathy in Marinesco-Sjogren syndrome. *Brain Dev*, **3**, 403-406.
- Hakonen, A.H., Heiskanen, S., Juvonen, V., Lappalainen, I., Luoma, P.T., Rantamaki, M., Goethem, G.V., Lofgren, A., Hackman, P., Paetau, A., Kaakkola, S., Majamaa, K., Varilo, T., Udd, B., Kaariainen, H., Bindoff, L.A. and Suomalainen, A. (2005) Mitochondrial DNA polymerase W748S mutation: a common cause of autosomal recessive ataxia with ancient European origin. *Am J Hum Genet*, **77**, 430-441.
- Hall, D.A., Berry-Kravis, E., Jacquemont, S., Rice, C.D., Cogswell, J., Zhang, L., Hagerman, R.J., Hagerman, P.J. and Leehey, M.A. (2005) Initial diagnoses given to persons with the fragile X associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Neurology*, **65**, 299-301.
- Hansen, J.J., Durr, A., Courru-Rebeix, I., Georgopoulos, C., Ang, D., Nielsen, M.N., Davoine, C.S., Brice, A., Fontaine, B., Gregersen, N. and Bross, P. (2002) Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60. *Am J Hum Genet*, **70**, 1328-1332.

- Hara, K., Onodera, O., Endo, M., Kondo, H., Shiota, H., Miki, K., Tanimoto, N., Kimura, T. and Nishizawa, M. (2005) Sacsin-related autosomal recessive ataxia without prominent retinal myelinated fibers in Japan. *Mov Disord*, **20**, 380-382.
- Harding, A.E. (1981) Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain*, **104**, 589-620.
- Harding, A.E. (1983) Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet*, **1**, 1151-1155.
- Harding, A.E., Matthews, S., Jones, S., Ellis, C.J., Booth, I.W. and Muller, D.P. (1985) Spinocerebellar degeneration associated with a selective defect of vitamin E absorption. *N Engl J Med*, **313**, 32-35.
- Hart, P.E., Lodi, R., Rajagopalan, B., Bradley, J.L., Crilley, J.G., Turner, C., Blamire, A.M., Manners, D., Styles, P., Schapira, A.H. and Cooper, J.M. (2005) Antioxidant treatment of patients with Friedreich ataxia: four-year follow-up. *Arch Neurol*, **62**, 621-626.
- Hartl, F.U. and Hayer-Hartl, M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, **295**, 1852-1858.
- Hause, A.O., Aggoun, Y., Bonnet, D., Sidi, D., Munnich, A., Rotig, A. and Rustin, P. (2002) Idebenone and reduced cardiac hypertrophy in Friedreich's ataxia. *Heart*, **87**, 346-349.
- Hellier, K.D., Hatchwell, E., Duncombe, A.S., Kew, J. and Hammans, S.R. (2001) X-linked sideroblastic anaemia with ataxia: another mitochondrial disease? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **70**, 65-69.
- Helou, J., Otto, E.A., Attanasio, M., Allen, S.J., Parisi, M.A., Glass, I., Utsch, B., Hashmi, S., Fazzi, E., Omran, H., O'Toole, J.F., Sayer, J.A. and Hildebrandt, F. (2007) Mutation analysis of NPHP6/CEP290 in patients with Joubert syndrome and Senior-Loken syndrome. *J Med Genet*, **44**, 657-663.
- Hentati, A., Deng, H.X., Hung, W.Y., Nayer, M., Ahmed, M.S., He, X., Tim, R., Stumpf, D.A., Siddique, T. and Ahmed. (1996) Human alpha-tocopherol transfer protein: gene structure and mutations in familial vitamin E deficiency. *Ann Neurol*, **39**, 295-300.
- Herva, R., von Wendt, L., von Wendt, G., Saukkonen, A.L., Leisti, J. and Dubowitz, V. (1987) A syndrome with juvenile cataract, cerebellar atrophy, mental retardation and myopathy. *Neuropediatrics*, **18**, 164-169.
- Herzog, K.H., Chong, M.J., Kapsetaki, M., Morgan, J.I. and McKinnon, P.J. (1998) Requirement for Atm in ionizing radiation-induced cell death in the developing central nervous system. *Science*, **280**, 1089-1091.
- Hiel, J.A., Weemaes, C.M., Smeets, D.F., Van de Vlasakker, C.J. and Horstink, M.W. (1994) Late-onset ataxia telangiectasia in two brothers presenting with juvenile resting tremor. *Mov Disord*, **9**, 460-462.
- Higgins, J.J., Morton, D.H. and Loveless, J.M. (1999) Posterior column ataxia with retinitis pigmentosa (AXPC1) maps to chromosome 1q31-q32. *Neurology*, **52**, 146-150.
- Hildebrandt, F., Otto, E., Rensing, C., Nothwang, H.G., Vollmer, M., Adolphs, J., Hanusch, H. and Brandis, M. (1997) A novel gene encoding an SH3 domain protein is mutated in nephronophthisis type 1. *Nat Genet*, **17**, 149-153.
- Hirano, M., Yamamoto, A., Mori, T., Lan, L., Iwamoto, T.A., Aoki, M., Shimada, K., Furiya, Y., Kariya, S., Asai, H., Yasui, A., Nishiwaki, T., Imoto, K., Kobayashi, N., Kiriya, T., Nagata, T., Konishi, N., Itoyama, Y. and Ueno, S. (2007) DNA single-strand break repair is impaired in aprataxin-related ataxia. *Ann Neurol*, **61**, 162-174.
- Hodges, E., Xuan, Z., Balija, V., Kramer, M., Molla, M.N., Smith, S.W., Middle, C.M., Rodesch, M.J., Albert, T.J., Hannon, G.J. and McCombie, W.R. (2007) Genome-wide in situ exon capture for selective resequencing. *Nat Genet*, **39**, 1522-1527.
- Holmes, S.E., O'Hearn, E.E., McInnis, M.G., Gorelick-Feldman, D.A., Kleiderlein, J.J., Callahan, C., Kwak, N.G., Ingersoll-Ashworth, R.G., Sherr, M., Sumner, A.J., Sharp, A.H., Ananth, U., Seltzer, W.K., Boss, M.A., Viera-Saecker, A.M., Epplen, J.T., Riess, O., Ross, C.A. and Margolis, R.L. (1999) Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5' region of PPP2R2B is associated with SCA12. *Nat Genet*, **23**, 391-392.



- Holt, I.J., Harding, A.E., Petty, R.K. and Morgan Hughes, J.A. (1990) A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet*, **46**, 428-433.
- Horvath, R., Hudson, G., Ferrari, G., Futterer, N., Ahola, S., Lamantea, E., Prokisch, H., Lochmuller, H., McFarland, R., Ramesh, V., Klopstock, T., Freisinger, P., Salvi, F., Mayr, J.A., Santer, R., Tesarova, M., Zeman, J., Udd, B., Taylor, R.W., Turnbull, D., Hanna, M., Fialho, D., Suomalainen, A., Zeviani, M. and Chinnery, P.F. (2006) Phenotypic spectrum associated with mutations of the mitochondrial polymerase gamma gene. *Brain*, **129**, 1674-1684.
- Houlden, H., Johnson, J., Gardner-Thorpe, C., Lashley, T., Hernandez, D., Worth, P., Singleton, A.B., Hilton, D.A., Holton, J., Revesz, T., Davis, M.B., Giunti, P. and Wood, N.W. (2007) Mutations in TTBK2, encoding a kinase implicated in tau phosphorylation, segregate with spinocerebellar ataxia type 11. *Nat Genet*, **39**, 1434-1436.
- Hsieh, E.J., Gin, P., Gulmezian, M., Tran, U.C., Saiki, R., Marbois, B.N. and Clarke, C.F. (2007) Saccharomyces cerevisiae Coq9 polypeptide is a subunit of the mitochondrial coenzyme Q biosynthetic complex. *Arch Biochem Biophys*, **463**, 19-26.
- Hsu, A.Y., Do, T.Q., Lee, P.T. and Clarke, C.F. (2000) Genetic evidence for a multi-subunit complex in the O-methyltransferase steps of coenzyme Q biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, **1484**, 287-297.
- Hudson, G., Amati-Bonneau, P., Blakely, E.L., Stewart, J.D., He, L., Schaefer, A.M., Griffiths, P.G., Ahlqvist, K., Suomalainen, A., Reynier, P., McFarland, R., Turnbull, D.M., Chinnery, P.F. and Taylor, R.W. (2007) Mutation of OPA1 causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: a novel disorder of mtDNA maintenance. *Brain*.
- Hudson, G. and Chinnery, P.F. (2006) Mitochondrial DNA polymerase-gamma and human disease. *Hum Mol Genet*, **15 Spec No 2**, R244-252.
- Hudson, G., Deschauer, M., Busse, K., Zierz, S. and Chinnery, P.F. (2005) Sensory ataxic neuropathy due to a novel C10Orf2 mutation with probable germline mosaicism. *Neurology*, **64**, 371-373.
- Huynen, M.A., Snel, B., Bork, P. and Gibson, T.J. (2001) The phylogenetic distribution of frataxin indicates a role in iron-sulfur cluster protein assembly. *Hum Mol Genet*, **10**, 2463-2468.
- Iizumi, M., Arakawa, H., Mori, T., Ando, A. and Nakamura, Y. (2002) Isolation of a novel gene, CABCl, encoding a mitochondrial protein that is highly homologous to yeast activity of bc1 complex. *Cancer Res*, **62**, 1246-1250.
- Ikeda, Y., Dick, K.A., Weatherspoon, M.R., Gincel, D., Armbrust, K.R., Dalton, J.C., Stevanin, G., Durr, A., Zuhlke, C., Burk, K., Clark, H.B., Brice, A., Rothstein, J.D., Schut, L.J., Day, J.W. and Ranum, L.P. (2006) Spectrin mutations cause spinocerebellar ataxia type 5. *Nat Genet*, **38**, 184-190.
- Ingall, T.J. and McLeod, J.G. (1991) Autonomic function in Friedreich's ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **54**, 162-164.
- Irobi, J., Van Impe, K., Seeman, P., Jordanova, A., Dierick, I., Verpoorten, N., Michalik, A., De Vriendt, E., Jacobs, A., Van Gerwen, V., Vennekens, K., Mazanec, R., Tournev, I., Hilton-Jones, D., Talbot, K., Kremensky, I., Van Den Bosch, L., Robberecht, W., Van Vandekerckhove, J., Van Broeckhoven, C., Gettemans, J., De Jonghe, P. and Timmerman, V. (2004) Hot-spot residue in small heat-shock protein 22 causes distal motor neuropathy. *Nat Genet*, **36**, 597-601.
- Ishikawa, K., Toru, S., Tsunemi, T., Li, M., Kobayashi, K., Yokota, T., Amino, T., Owada, K., Fujigasaki, H., Sakamoto, M., Tomimitsu, H., Takashima, M., Kumagai, J., Noguchi, Y., Kawashima, Y., Ohkoshi, N., Ishida, G., Gomyoda, M., Yoshida, M., Hashizume, Y., Saito, Y., Murayama, S., Yamanouchi, H., Mizutani, T., Kondo, I., Toda, T. and Mizusawa, H. (2005) An autosomal dominant cerebellar ataxia linked to chromosome 16q22.1 is associated with a single-nucleotide substitution in the 5' untranslated region of the gene encoding a protein with spectrin repeat and Rho guanine-nucleotide exchange-factor domains. *Am J Hum Genet*, **77**, 280-296.
- Ishikawa, T., Kitoh, H., Awaya, A. and Nonaka, I. (1993) Rapid cataract formation in Marinesco-Sjogren syndrome. *Pediatr Neurol*, **9**, 407-408.

- Isnard, R., Kalotka, H., Durr, A., Cossee, M., Schmitt, M., Pousset, F., Thomas, D., Brice, A., Koenig, M. and Komajda, M. (1997) Correlation between left ventricular hypertrophy and GAA trinucleotide repeat length in Friedreich's ataxia. *Circulation*, **95**, 2247-2249.
- Ivarsson, S.A., Bjerre, I., Brun, A., Ljungberg, O., Maly, E. and Taylor, I. (1993) Joubert syndrome associated with Leber amaurosis and multicystic kidneys. *Am J Med Genet*, **45**, 542-547.
- Jacquemont, S., Hagerman, R.J., Hagerman, P.J. and Leehey, M.A. (2007) Fragile-X syndrome and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: two faces of FMR1. *Lancet Neurol*, **6**, 45-55.
- Jacquemont, S., Hagerman, R.J., Leehey, M., Grigsby, J., Zhang, L., Brunberg, J.A., Greco, C., Des Portes, V., Jardini, T., Levine, R., Berry-Kravis, E., Brown, W.T., Schaeffer, S., Kissel, J., Tassone, F. and Hagerman, P.J. (2003) Fragile X premutation tremor/ataxia syndrome: molecular, clinical, and neuroimaging correlates. *Am J Hum Genet*, **72**, 869-878.
- Jacquemont, S., Leehey, M.A., Hagerman, R.J., Beckett, L.A. and Hagerman, P.J. (2006) Size bias of fragile X premutation alleles in late-onset movement disorders. *J Med Genet*, **43**, 804-809.
- Jankowicz, E., Berger, H., Kurasz, S., Winogrodzka, W. and Eljasz, L. (1977) Familial progressive external ophthalmoplegia with abnormal muscle mitochondria. *Eur Neurol*, **15**, 318-324.
- Jauregui, A.R. and Barr, M.M. (2005) Functional characterization of the *C. elegans* nephrocystins NPHP-1 and NPHP-4 and their role in cilia and male sensory behaviors. *Exp Cell Res*, **305**, 333-342.
- Jin, H., May, M., Tranebjaerg, L., Kendall, E., Fontan, G., Jackson, J., Subramony, S.H., Arena, F., Lubs, H., Smith, S., Stevenson, R., Schwartz, C. and Vetrie, D. (1996) A novel X-linked gene, DDP, shows mutations in families with deafness (DFN-1), dystonia, mental deficiency and blindness. *Nat Genet*, **14**, 177-180.
- Johnson, A., Gin, P., Marbois, B.N., Hsieh, E.J., Wu, M., Barros, M.H., Clarke, C.F. and Tzagoloff, A. (2005) COQ9, a new gene required for the biosynthesis of coenzyme Q in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **280**, 31397-31404.
- Jonassen, T. and Clarke, C.F. (2000) Isolation and functional expression of human COQ3, a gene encoding a methyltransferase required for ubiquinone biosynthesis. *J Biol Chem*, **275**, 12381-12387.
- Joubert, M., Eisenring, J.J., Robb, J.P. and Andermann, F. (1969) Familial agenesis of the cerebellar vermis. A syndrome of episodic hyperpnea, abnormal eye movements, ataxia, and retardation. *Neurology*, **19**, 813-825.
- Jun, L., Saiki, R., Tatsumi, K., Nakagawa, T. and Kawamukai, M. (2004) Identification and subcellular localization of two solanesyl diphosphate synthases from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, **45**, 1882-1888.
- Kaguni, L.S. (2004) DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase. *Annu Rev Biochem*, **73**, 293-320.
- Kaltschmidt, B., Sparna, T. and Kaltschmidt, C. (1999) Activation of NF-kappa B by reactive oxygen intermediates in the nervous system. *Antioxid Redox Signal*, **1**, 129-144.
- Kapfhamer, D., Sweet, H.O., Sufalko, D., Warren, S., Johnson, K.R. and Burmeister, M. (1996) The neurological mouse mutations jittery and hesitant are allelic and map to the region of mouse chromosome 10 homologous to 19p13.3. *Genomics*, **35**, 533-538.
- Katsanis, N., Beales, P.L., Woods, M.O., Lewis, R.A., Green, J.S., Parfrey, P.S., Ansley, S.J., Davidson, W.S. and Lupski, J.R. (2000) Mutations in MKKS cause obesity, retinal dystrophy and renal malformations associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet*, **26**, 67-70.
- Katyal, S., el-Khamisy, S.F., Russell, H.R., Li, Y., Ju, L., Caldecott, K.W. and McKinnon, P.J. (2007) TDP1 facilitates chromosomal single-strand break repair in neurons and is neuroprotective in vivo. *Embo J*, **26**, 4720-4731.
- Kaukonen, J., Juselius, J.K., Tiranti, V., Kytala, A., Zeviani, M., Comi, G.P., Keranen, S., Peltonen, L. and Suomalainen, A. (2000) Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science*, **289**, 782-785.
- Keeler, L.C., Marsh, S.E., Leeftang, E.P., Woods, C.G., Sztriha, L., Al-Gazali, L., Gururaj, A. and Gleeson, J.G. (2003) Linkage analysis in families with Joubert syndrome plus oculo-renal

- involvement identifies the CORS2 locus on chromosome 11p12-q13.3. *Am J Hum Genet*, **73**, 656-662.
- Kendall, B., Kingsley, D., Lambert, S.R., Taylor, D. and Finn, P. (1990) Joubert syndrome: a clinico-radiological study. *Neuroradiology*, **31**, 502-506.
- Kennedy, G.C., Matsuzaki, H., Dong, S., Liu, W.M., Huang, J., Liu, G., Su, X., Cao, M., Chen, W., Zhang, J., Liu, W., Yang, G., Di, X., Ryder, T., He, Z., Surti, U., Phillips, M.S., Boyce-Jacino, M.T., Fodor, S.P. and Jones, K.W. (2003) Large-scale genotyping of complex DNA. *Nat Biotechnol*, **21**, 1233-1237.
- Kiechl, S., Horvath, R., Luoma, P., Kiechl-Kohlendorfer, U., Wallacher-Scholz, B., Stucka, R., Thaler, C., Wanschitz, J., Suomalainen, A., Jaksch, M. and Willeit, J. (2004) Two families with autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **75**, 1125-1128.
- Kispal, G., Csere, P., Guiard, B. and Lill, R. (1997) The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis. *FEBS Lett*, **418**, 346-350.
- Kispal, G., Csere, P., Prohl, C. and Lill, R. (1999) The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *Embo J*, **18**, 3981-3989.
- Klingenberg, M. and Huang, S.G. (1999) Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue. *Biochim Biophys Acta*, **1415**, 271-296.
- Kobayashi, Y. and Sobue, G. (2001) Protective effect of chaperones on polyglutamine diseases. *Brain Res Bull*, **56**, 165-168.
- Kodama, S., Komatsu, M., Miyoshi, M., Nakao, H., Sakurai, T. and U, M. (1992) Marinesco-Sjogren syndrome with reduced cytochrome c oxidase in muscle. *Kobe J Med Sci*, **38**, 245-254.
- Koenig, M. (2003) Rare forms of autosomal recessive neurodegenerative ataxia. *Semin Pediatr Neurol*, **10**, 183-192.
- Koeppen, A.H. (1998) The hereditary ataxias. *J Neuropathol Exp Neurol*, **57**, 531-543.
- Komiyama, A., Nonaka, I. and Hirayama, K. (1989) Muscle pathology in Marinesco-Sjogren syndrome. *J Neurol Sci*, **89**, 103-113.
- Konrad, M., Saunier, S., Calado, J., Gubler, M.C., Broyer, M. and Antignac, C. (1998) Familial juvenile nephronophthisis. *J Mol Med*, **76**, 310-316.
- Konrad, M., Saunier, S., Heidet, L., Silbermann, F., Benessy, F., Calado, J., Le Paslier, D., Broyer, M., Gubler, M.C. and Antignac, C. (1996) Large homozygous deletions of the 2q13 region are a major cause of juvenile nephronophthisis. *Hum Mol Genet*, **5**, 367-371.
- Koob, M.D., Moseley, M.L., Schut, L.J., Benzow, K.A., Bird, T.D., Day, J.W. and Ranum, L.P. (1999) An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8). *Nat Genet*, **21**, 379-384.
- Korhonen, J.A., Gaspari, M. and Falkenberg, M. (2003) TWINKLE Has 5' -> 3' DNA helicase activity and is specifically stimulated by mitochondrial single-stranded DNA-binding protein. *J Biol Chem*, **278**, 48627-48632.
- Koskinen, T., Santavuori, P., Sainio, K., Lappi, M., Kallio, A.K. and Pihko, H. (1994) Infantile onset spinocerebellar ataxia with sensory neuropathy: a new inherited disease. *J Neurol Sci*, **121**, 50-56.
- Koutnikova, H., Campuzano, V., Foury, F., Dolle, P., Cazzalini, O. and Koenig, M. (1997) Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nat Genet*, **16**, 345-351.
- Kremer, E.J., Pritchard, M., Lynch, M., Yu, S., Holman, K., Baker, E., Warren, S.T., Schlessinger, D., Sutherland, G.R. and Richards, R.I. (1991) Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n. *Science*, **252**, 1711-1714.
- Kumar, S. and Rankin, R. (1996) Renal insufficiency is a component of COACH syndrome. *Am J Med Genet*, **61**, 122-126.
- Labauge, P. (2002) Very late onset Friedreich's presenting as spastic tetraparesis without ataxia or neuropathy. *Neurology*, **58**, 1136.

- Lagier-Tourenne, C., Boltshauser, E., Breivik, N., Gribaa, M., Betard, C., Barbot, C. and Koenig, M. (2004) Homozygosity mapping of a third Joubert syndrome locus to 6q23. *J Med Genet*, **41**, 273-277.
- Lagier-Tourenne, C., Tranebaerg, L., Chaigne, D., Gribaa, M., Dollfus, H., Silvestri, G., Betard, C., Warter, J.M. and Koenig, M. (2003) Homozygosity mapping of Marinesco-Sjogren syndrome to 5q31. *Eur J Hum Genet*, **11**, 770-778.
- Lagier-Tourenne, C.H., M. (2006) Mitochondrial Disorders. In Lynch, D. (ed.), *Neurogenetics Scientific and Clinical Advances*. Taylor and Francis Group, New York, pp. 261-288.
- Lalani, S.R., Vladutiu, G.D., Plunkett, K., Lotze, T.E., Adesina, A.M. and Scaglia, F. (2005) Isolated mitochondrial myopathy associated with muscle coenzyme Q10 deficiency. *Arch Neurol*, **62**, 317-320.
- Lamarche, J.B., Lemieux, B. and Lieu, H.B. (1984) The neuropathology of "typical" Friedreich's ataxia in Quebec. *Can J Neurol Sci*, **11**, 592-600.
- Lamperti, C., Naini, A., Hirano, M., De Vivo, D.C., Bertini, E., Servidei, S., Valeriani, M., Lynch, D., Banwell, B., Berg, M., Dubrovsky, T., Chiriboga, C., Angelini, C., Pegoraro, E. and DiMauro, S. (2003) Cerebellar ataxia and coenzyme Q10 deficiency. *Neurology*, **60**, 1206-1208.
- Lamperti, C., Naini, A.B., Lucchini, V., Prella, A., Bresolin, N., Moggio, M., Sciacco, M., Kaufmann, P. and DiMauro, S. (2005) Muscle coenzyme Q10 level in statin-related myopathy. *Arch Neurol*, **62**, 1709-1712.
- Lander, E.S. and Botstein, D. (1987) Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science*, **236**, 1567-1570.
- Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, M.K. and Hartl, F.U. (1992) Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature*, **356**, 683-689.
- Lass, A. and Sohal, R.S. (1999) Comparisons of coenzyme Q bound to mitochondrial membrane proteins among different mammalian species. *Free Radic Biol Med*, **27**, 220-226.
- Laverda, A.M., Saia, O.S., Drigo, P., Danieli, E., Clementi, M. and Tenconi, R. (1984) Chorioretinal coloboma and Joubert syndrome: a nonrandom association. *J Pediatr*, **105**, 282-284.
- Le Ber, I., Bouslam, N., Rivaud-Pechoux, S., Guimaraes, J., Benomar, A., Chamayou, C., Goizet, C., Moreira, M.C., Klur, S., Yahyaoui, M., Agid, Y., Koenig, M., Stevanin, G., Brice, A. and Durr, A. (2004) Frequency and phenotypic spectrum of ataxia with oculomotor apraxia 2: a clinical and genetic study in 18 patients. *Brain*, **127**, 759-767.
- Le Ber, I., Dubourg, O., Benoist, J.F., Jardel, C., Mochel, F., Koenig, M., Brice, A., Lombes, A. and Durr, A. (2007) Muscle coenzyme Q10 deficiencies in ataxia with oculomotor apraxia 1. *Neurology*, **68**, 295-297.
- Le Ber, I., Moreira, M.C., Rivaud-Pechoux, S., Chamayou, C., Ochsner, F., Kuntzer, T., Tardieu, M., Said, G., Habert, M.O., Demarquay, G., Tannier, C., Beis, J.M., Brice, A., Koenig, M. and Durr, A. (2003) Cerebellar ataxia with oculomotor apraxia type 1: clinical and genetic studies. *Brain*, **126**, 2761-2772.
- Lee, J.H. and Paull, T.T. (2005) ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*, **308**, 551-554.
- Leehey, M.A., Munhoz, R.P., Lang, A.E., Brunberg, J.A., Grigsby, J., Greco, C., Jacquemont, S., Tassone, F., Lozano, A.M., Hagerman, P.J. and Hagerman, R.J. (2003) The fragile X premutation presenting as essential tremor. *Arch Neurol*, **60**, 117-121.
- Leighton, J. and Schatz, G. (1995) An ABC transporter in the mitochondrial inner membrane is required for normal growth of yeast. *Embo J*, **14**, 188-195.
- Lenaz, G., Fato, R., Formiggini, G. and Genova, M.L. (2007) The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport. *Mitochondrion*, **7 Suppl**, S8-33.
- Leonard, C.J., Aravind, L. and Koonin, E.V. (1998) Novel families of putative protein kinases in bacteria and archaea: evolution of the "eukaryotic" protein kinase superfamily. *Genome Res*, **8**, 1038-1047.

- Leshinsky-Silver, E., Levine, A., Nissenkorn, A., Barash, V., Perach, M., Buzhaker, E., Shahmurov, M., Polak-Charcon, S., Lev, D. and Lerman-Sagie, T. (2003) Neonatal liver failure and Leigh syndrome possibly due to CoQ-responsive OXPHOS deficiency. *Mol Genet Metab*, **79**, 288-293.
- Lhatoo, S.D., Rao, D.G., Kane, N.M. and Ormerod, I.E. (2001) Very late onset Friedreich's presenting as spastic tetraparesis without ataxia or neuropathy. *Neurology*, **56**, 1776-1777.
- Lindhout, D., Barth, P.G., Valk, J. and Boen-Tan, T.N. (1980) The Joubert syndrome associated with bilateral chorioretinal coloboma. *Eur J Pediatr*, **134**, 173-176.
- Linnane, A.W., Kios, M. and Vitetta, L. (2007) Coenzyme Q(10)--its role as a prooxidant in the formation of superoxide anion/hydrogen peroxide and the regulation of the metabolome. *Mitochondrion*, **7 Suppl**, S51-61.
- Litt, M., Kramer, P., LaMorticella, D.M., Murphey, W., Lovrien, E.W. and Weleber, R.G. (1998) Autosomal dominant congenital cataract associated with a missense mutation in the human alpha crystallin gene CRYAA. *Hum Mol Genet*, **7**, 471-474.
- Lodi, R., Cooper, J.M., Bradley, J.L., Manners, D., Styles, P., Taylor, D.J. and Schapira, A.H. (1999) Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in patients with Friedreich ataxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 11492-11495.
- Loesch, D.Z., Litewka, L., Brotchie, P., Huggins, R.M., Tassone, F. and Cook, M. (2005) Magnetic resonance imaging study in older fragile X premutation male carriers. *Ann Neurol*, **58**, 326-330.
- Loken, A.C., Hanssen, O., Halvorsen, S. and Jolster, N.J. (1961) Hereditary renal dysplasia and blindness. *Acta Paediatr*, **50**, 177-184.
- Lonnqvist, T., Paetau, A., Nikali, K., von Boguslawski, K. and Pihko, H. (1998) Infantile onset spinocerebellar ataxia with sensory neuropathy (IOSCA): neuropathological features. *J Neurol Sci*, **161**, 57-65.
- Lopez, L.C., Schuelke, M., Quinzii, C.M., Kanki, T., Rodenburg, R.J., Naini, A., Dimauro, S. and Hirano, M. (2006) Leigh syndrome with nephropathy and CoQ10 deficiency due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) mutations. *Am J Hum Genet*, **79**, 1125-1129.
- Lopez-Arlandis, J.M., Vilchez, J.J., Palau, F. and Sevilla, T. (1995) Friedreich's ataxia: an epidemiological study in Valencia, Spain, based on consanguinity analysis. *Neuroepidemiology*, **14**, 14-19.
- Luoma, P., Melberg, A., Rinne, J.O., Kaukonen, J.A., Nupponen, N.N., Chalmers, R.M., Oldfors, A., Rautakorpi, I., Peltonen, L., Majamaa, K., Somer, H. and Suomalainen, A. (2004) Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study. *Lancet*, **364**, 875-882.
- Lynch, D.R., Braastad, C.D. and Nagan, N. (2007) Ovarian failure in ataxia with oculomotor apraxia type 2. *Am J Med Genet A*, **143**, 1775-1777.
- Macinga, D.R., Cook, G.M., Poole, R.K. and Rather, P.N. (1998) Identification and characterization of aarF, a locus required for production of ubiquinone in *Providencia stuartii* and *Escherichia coli* and for expression of 2'-N-acetyltransferase in *P. stuartii*. *J Bacteriol*, **180**, 128-135.
- MacRae, D.W., Howard, R.O., Albert, D.M. and Hsia, Y.E. (1972) Ocular manifestations of the Meckel syndrome. *Arch Ophthalmol*, **88**, 106-113.
- Magrane, J., Smith, R.C., Walsh, K. and Querfurth, H.W. (2004) Heat shock protein 70 participates in the neuroprotective response to intracellularly expressed beta-amyloid in neurons. *J Neurosci*, **24**, 1700-1706.
- Maguire, A., Hellier, K., Hammans, S. and May, A. (2001) X-linked cerebellar ataxia and sideroblastic anaemia associated with a missense mutation in the ABC7 gene predicting V411L. *Br J Haematol*, **115**, 910-917.
- Marbois, B.N. and Clarke, C.F. (1996) The COQ7 gene encodes a protein in *saccharomyces cerevisiae* necessary for ubiquinone biosynthesis. *J Biol Chem*, **271**, 2995-3004.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y.J., Chen, Z., Dewell, S.B., Du, L., Fierro, J.M., Gomes, X.V., Godwin, B.C., He, W., Helgesen, S., Ho, C.H., Irzyk, G.P., Jando, S.C., Alenquer, M.L., Jarvie, T.P., Jirage, K.B., Kim, J.B., Knight, J.R., Lanza, J.R., Leamon, J.H., Lefkowitz, S.M., Lei, M., Li, J., Lohman,

- K.L., Lu, H., Makhijani, V.B., McDade, K.E., McKenna, M.P., Myers, E.W., Nickerson, E., Nobile, J.R., Plant, R., Puc, B.P., Ronan, M.T., Roth, G.T., Sarkis, G.J., Simons, J.F., Simpson, J.W., Srinivasan, M., Tartaro, K.R., Tomasz, A., Vogt, K.A., Volkmer, G.A., Wang, S.H., Wang, Y., Weiner, M.P., Yu, P., Begley, R.F. and Rothberg, J.M. (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, **437**, 376-380.
- Maria, B.L., Hoang, K.B., Tusa, R.J., Mancuso, A.A., Hamed, L.M., Quisling, R.G., Hove, M.T., Fennell, E.B., Booth-Jones, M., Ringdahl, D.M., Yachnis, A.T., Creel, G. and Frerking, B. (1997) "Joubert syndrome" revisited: key ocular motor signs with magnetic resonance imaging correlation. *J Child Neurol*, **12**, 423-430.
- Marinesco, G., Draganesco, S.T. and Vasiliu, D. (1931) Nouvelle maladie familiale caractérisée par une cataracte congénitale et un arrêt du développement somato-neuro-psychique. *L'encéphale*, **26**, 97-109.
- Mariotti, C., Solari, A., Torta, D., Marano, L., Fiorentini, C. and Di Donato, S. (2003) Idebenone treatment in Friedreich patients: one-year-long randomized placebo-controlled trial. *Neurology*, **60**, 1676-1679.
- Martelli, A., Wattenhofer-Donze, M., Schmucker, S., Bouvet, S., Reutenauer, L. and Puccio, H. (2007) Frataxin is essential for extramitochondrial Fe-S cluster proteins in mammalian tissues. *Hum Mol Genet*, **16**, 2651-2658.
- Martin, M.H., Bouchard, J.P., Sylvain, M., St-Onge, O. and Truchon, S. (2007) Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay: a report of MR imaging in 5 patients. *AJNR Am J Neuroradiol*, **28**, 1606-1608.
- Martinello, F., Fardin, P., Ottina, M., Ricchieri, G.L., Koenig, M., Cavalier, L. and Trevisan, C.P. (1998) Supplemental therapy in isolated vitamin E deficiency improves the peripheral neuropathy and prevents the progression of ataxia. *J Neurol Sci*, **156**, 177-179.
- Maser, R.S., Zinkel, R. and Petrini, J.H. (2001) An alternative mode of translation permits production of a variant NBS1 protein from the common Nijmegen breakage syndrome allele. *Nat Genet*, **27**, 417-421.
- Mateo, I., Llorca, J., Volpini, V., Corral, J., Berciano, J. and Combarros, O. (2003) GAA expansion size and age at onset of Friedreich's ataxia. *Neurology*, **61**, 274-275.
- Matsuura, T., Yamagata, T., Burgess, D.L., Rasmussen, A., Grewal, R.P., Watase, K., Khajavi, M., McCall, A.E., Davis, C.F., Zu, L., Achari, M., Pulst, S.M., Alonso, E., Noebels, J.L., Nelson, D.L., Zoghbi, H.Y. and Ashizawa, T. (2000) Large expansion of the ATTCT pentanucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 10. *Nat Genet*, **26**, 191-194.
- Matsuzaki, H., Loi, H., Dong, S., Tsai, Y.Y., Fang, J., Law, J., Di, X., Liu, W.M., Yang, G., Liu, G., Huang, J., Kennedy, G.C., Ryder, T.B., Marcus, G.A., Walsh, P.S., Shriver, M.D., Puck, J.M., Jones, K.W. and Mei, R. (2004) Parallel genotyping of over 10,000 SNPs using a one-primer assay on a high-density oligonucleotide array. *Genome Res*, **14**, 414-425.
- McLaughlin, J.F., Pagon, R.A., Weinberger, E. and Haas, J.E. (1996) Marinesco-Sjogren syndrome: clinical and magnetic resonance imaging features in three children. *Dev Med Child Neurol*, **38**, 636-644.
- Melone, M.A., Tessa, A., Petrini, S., Lus, G., Sampaolo, S., di Fede, G., Santorelli, F.M. and Cotrufo, R. (2004) Revelation of a new mitochondrial DNA mutation (G12147A) in a MELAS/MERFF phenotype. *Arch Neurol*, **61**, 269-272.
- Merlini, L., Gooding, R., Lochmuller, H., Muller-Felber, W., Walter, M.C., Angelicheva, D., Talim, B., Hallmayer, J. and Kalaydjieva, L. (2002) Genetic identity of Marinesco-Sjogren/myoglobinuria and CCFDN syndromes. *Neurology*, **58**, 231-236.
- Meyn, M.S. (1999) Ataxia-telangiectasia, cancer and the pathobiology of the ATM gene. *Clin Genet*, **55**, 289-304.
- Miller, W.L. (2007) StAR search--what we know about how the steroidogenic acute regulatory protein mediates mitochondrial cholesterol import. *Mol Endocrinol*, **21**, 589-601.

- Mollet, J., Giurgea, I., Schlemmer, D., Dallner, G., Chretien, D., Delahodde, A., Bacq, D., de Lonlay, P., Munnich, A. and Rotig, A. (2007) Prenyldiphosphate synthase, subunit 1 (PDSS1) and OH-benzoate polyprenyltransferase (COQ2) mutations in ubiquinone deficiency and oxidative phosphorylation disorders. *J Clin Invest*, **117**, 765-772.
- Montermini, L., Andermann, E., Labuda, M., Richter, A., Pandolfo, M., Cavalcanti, F., Pianese, L., Iodice, L., Farina, G., Monticelli, A., Turano, M., Filla, A., De Michele, G. and Coccozza, S. (1997) The Friedreich ataxia GAA triplet repeat: premutation and normal alleles. *Hum Mol Genet*, **6**, 1261-1266.
- Moreira, M.C., Barbot, C., Tachi, N., Kozuka, N., Mendonca, P., Barros, J., Coutinho, P., Sequeiros, J. and Koenig, M. (2001a) Homozygosity mapping of Portuguese and Japanese forms of ataxia-oculomotor apraxia to 9p13, and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet*, **68**, 501-508.
- Moreira, M.C., Barbot, C., Tachi, N., Kozuka, N., Uchida, E., Gibson, T., Mendonca, P., Costa, M., Barros, J., Yanagisawa, T., Watanabe, M., Ikeda, Y., Aoki, M., Nagata, T., Coutinho, P., Sequeiros, J. and Koenig, M. (2001b) The gene mutated in ataxia-ocular apraxia 1 encodes the new HIT/Zn-finger protein aprataxin. *Nat Genet*, **29**, 189-193.
- Moreira, M.C., Klur, S., Watanabe, M., Nemeth, A.H., Le Ber, I., Moniz, J.C., Tranchant, C., Aubourg, P., Tazir, M., Schols, L., Pandolfo, M., Schulz, J.B., Pouget, J., Calvas, P., Shizuka-Ikeda, M., Shoji, M., Tanaka, M., Izatt, L., Shaw, C.E., M'Zahem, A., Dunne, E., Bomont, P., Benhassine, T., Bouslam, N., Stevanin, G., Brice, A., Guimaraes, J., Mendonca, P., Barbot, C., Coutinho, P., Sequeiros, J., Durr, A., Warter, J.M. and Koenig, M. (2004) Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2. *Nat Genet*, **36**, 225-227.
- Morton. (1955) Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Hum Genet*, **7**, 277-318.
- Moseley, M.L., Zu, T., Ikeda, Y., Gao, W., Mosemiller, A.K., Daughters, R.S., Chen, G., Weatherspoon, M.R., Clark, H.B., Ebner, T.J., Day, J.W. and Ranum, L.P. (2006) Bidirectional expression of CUG and CAG expansion transcripts and intranuclear polyglutamine inclusions in spinocerebellar ataxia type 8. *Nat Genet*, **38**, 758-769.
- Mrissa, N., Belal, S., Hamida, C.B., Amouri, R., Turki, I., Mrissa, R., Hamida, M.B. and Hentati, F. (2000) Linkage to chromosome 13q11-12 of an autosomal recessive cerebellar ataxia in a Tunisian family. *Neurology*, **54**, 1408-1414.
- Muchowski, P.J. and Wacker, J.L. (2005) Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 11-22.
- Muhlenhoff, U., Richhardt, N., Ristow, M., Kispal, G. and Lill, R. (2002) The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins. *Hum Mol Genet*, **11**, 2025-2036.
- Muller, D.P. and Lloyd, J.K. (1982) Effect of large oral doses of vitamin E on the neurological sequelae of patients with abetalipoproteinemia. *Ann N Y Acad Sci*, **393**, 133-144.
- Muller, D.P., Lloyd, J.K. and Bird, A.C. (1977) Long-term management of abetalipoproteinemia. Possible role for vitamin E. *Arch Dis Child*, **52**, 209-214.
- Muller-Felber, W., Zafiriou, D., Scheck, R., Patzke, I., Toepfer, M., Pongratz, D.E. and Walther, U. (1998) Marinesco Sjogren syndrome with rhabdomyolysis. A new subtype of the disease. *Neuropediatrics*, **29**, 97-101.
- Murray, A., Webb, J., Grimley, S., Conway, G. and Jacobs, P. (1998) Studies of FRAXA and FRAXE in women with premature ovarian failure. *J Med Genet*, **35**, 637-640.
- Musumeci, O., Naini, A., Slonim, A.E., Skavin, N., Hadjigeorgiou, G.L., Krawiecki, N., Weissman, B.M., Tsao, C.Y., Mendell, J.R., Shanske, S., De Vivo, D.C., Hirano, M. and DiMauro, S. (2001) Familial cerebellar ataxia with muscle coenzyme Q10 deficiency. *Neurology*, **56**, 849-855.
- Nahas, S.A., Duquette, A., Roddier, K., Gatti, R.A. and Brais, B. (2007) Ataxia-oculomotor apraxia 2 patients show no increased sensitivity to ionizing radiation. *Neuromuscul Disord*, **17**, 968-969.

- Narcisi, T.M., Shoulders, C.C., Chester, S.A., Read, J., Brett, D.J., Harrison, G.B., Grantham, T.T., Fox, M.F., Povey, S., de Bruin, T.W. and et al. (1995) Mutations of the microsomal triglyceride-transfer-protein gene in abetalipoproteinemia. *Am J Hum Genet*, **57**, 1298-1310.
- Naviaux, R.K. and Nguyen, K.V. (2004) POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Ann Neurol*, **55**, 706-712.
- Nemeth, A.H., Bochukova, E., Dunne, E., Huson, S.M., Elston, J., Hannan, M.A., Jackson, M., Chapman, C.J. and Taylor, A.M. (2000) Autosomal recessive cerebellar ataxia with oculomotor apraxia (ataxia-telangiectasia-like syndrome) is linked to chromosome 9q34. *Am J Hum Genet*, **67**, 1320-1326.
- Newton, V.E. (1991) Sensorineural hearing loss and the Marinesco-Sjogren syndrome. *J Laryngol Otol*, **105**, 210-212.
- Nguyen, K.V., Ostergaard, E., Ravn, S.H., Balslev, T., Danielsen, E.R., Vardag, A., McKiernan, P.J., Gray, G. and Naviaux, R.K. (2005) POLG mutations in Alpers syndrome. *Neurology*, **65**, 1493-1495.
- Nikali, K., Isosomppi, J., Lonqvist, T., Mao, J.I., Suomalainen, A. and Peltonen, L. (1997) Toward cloning of a novel ataxia gene: refined assignment and physical map of the IOSCA locus (SCA8) on 10q24. *Genomics*, **39**, 185-191.
- Nikali, K., Suomalainen, A., Saharinen, J., Kuokkanen, M., Spelbrink, J.N., Lonqvist, T. and Peltonen, L. (2005) Infantile onset spinocerebellar ataxia is caused by recessive mutations in mitochondrial proteins Twinkle and Twinky. *Hum Mol Genet*, **14**, 2981-2990.
- Nystuen, A., Benke, P.J., Merren, J., Stone, E.M. and Sheffield, V.C. (1996) A cerebellar ataxia locus identified by DNA pooling to search for linkage disequilibrium in an isolated population from the Cayman Islands. *Hum Mol Genet*, **5**, 525-531.
- Oberle, I., Rousseau, F., Heitz, D., Kretz, C., Devys, D., Hanauer, A., Boue, J., Bertheas, M.F. and Mandel, J.L. (1991) Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science*, **252**, 1097-1102.
- Ogasahara, S., Engel, A.G., Frens, D. and Mack, D. (1989) Muscle coenzyme Q deficiency in familial mitochondrial encephalomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 2379-2382.
- Ogawa, T., Takiyama, Y., Sakoe, K., Mori, K., Namekawa, M., Shimazaki, H., Nakano, I. and Nishizawa, M. (2004) Identification of a SACS gene missense mutation in ARSACS. *Neurology*, **62**, 107-109.
- Ohshima, K., Montermini, L., Wells, R.D. and Pandolfo, M. (1998) Inhibitory effects of expanded GAA.TTC triplet repeats from intron I of the Friedreich ataxia gene on transcription and replication in vivo. *J Biol Chem*, **273**, 14588-14595.
- Okada, K., Suzuki, K., Kamiya, Y., Zhu, X., Fujisaki, S., Nishimura, Y., Nishino, T., Nakagawa, T., Kawamukai, M. and Matsuda, H. (1996) Polyprenyl diphosphate synthase essentially defines the length of the side chain of ubiquinone. *Biochim Biophys Acta*, **1302**, 217-223.
- Olsson, J.M., Xia, L., Eriksson, L.C. and Bjornstedt, M. (1999) Ubiquinone is reduced by lipoamide dehydrogenase and this reaction is potently stimulated by zinc. *FEBS Lett*, **448**, 190-192.
- Oostra, B.A. and Willemsen, R. (2003) A fragile balance: FMR1 expression levels. *Hum Mol Genet*, **12 Spec No 2**, R249-257.
- Ophoff, R.A., Terwindt, G.M., Vergouwe, M.N., van Eijk, R., Oefner, P.J., Hoffman, S.M., Lamerdin, J.E., Mohrenweiser, H.W., Bulman, D.E., Ferrari, M., Haan, J., Lindhout, D., van Ommen, G.J., Hofker, M.H., Ferrari, M.D. and Frants, R.R. (1996) Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca<sup>2+</sup> channel gene CACNL1A4. *Cell*, **87**, 543-552.
- Orr, H.T. and Zoghbi, H.Y. (2007) Trinucleotide repeat disorders. *Annu Rev Neurosci*, **30**, 575-621.
- Ott, J. (1991) *Analysis of Human Genetic Linkage*, Baltimore.
- Ouahchi, K., Arita, M., Kayden, H., Hentati, F., Ben Hamida, M., Sokol, R., Arai, H., Inoue, K., Mandel, J.L. and Koenig, M. (1995) Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the alpha-tocopherol transfer protein. *Nat Genet*, **9**, 141-145.



- Ouyang, Y., Segers, K., Bouquiaux, O., Wang, F.C., Janin, N., Andris, C., Shimazaki, H., Sakoe, K., Nakano, I. and Takiyama, Y. (2008) Novel SACS mutation in a Belgian family with saccin-related ataxia. *J Neurol Sci*, **264**, 73-76.
- Ouyang, Y., Takiyama, Y., Sakoe, K., Shimazaki, H., Ogawa, T., Nagano, S., Yamamoto, Y. and Nakano, I. (2006) Saccin-related ataxia (ARSACS): expanding the genotype upstream from the gigantic exon. *Neurology*, **66**, 1103-1104.
- Pagnamenta, A.T., Taanman, J.W., Wilson, C.J., Anderson, N.E., Marotta, R., Duncan, A.J., Bitner-Glindzicz, M., Taylor, R.W., Laskowski, A., Thorburn, D.R. and Rahman, S. (2006) Dominant inheritance of premature ovarian failure associated with mutant mitochondrial DNA polymerase gamma. *Hum Reprod*, **21**, 2467-2473.
- Pagon, R.A., Bird, T.D., Detter, J.C. and Pierce, I. (1985) Hereditary sideroblastic anaemia and ataxia: an X linked recessive disorder. *J Med Genet*, **22**, 267-273.
- Palau, F., De Michele, G., Vilchez, J.J., Pandolfo, M., Monros, E., Cocozza, S., Smeyers, P., Lopez-Arlandis, J., Campanella, G., Di Donato, S. and et al. (1995) Early-onset ataxia with cardiomyopathy and retained tendon reflexes maps to the Friedreich's ataxia locus on chromosome 9q. *Ann Neurol*, **37**, 359-362.
- Pandolfo, M. (2001) Molecular basis of Friedreich ataxia. *Mov Disord*, **16**, 815-821.
- Papucci, L., Schiavone, N., Witort, E., Donnini, M., Lapucci, A., Tempestini, A., Formigli, L., Zecchi-Orlandini, S., Orlandini, G., Carella, G., Brancato, R. and Capaccioli, S. (2003) Coenzyme q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property. *J Biol Chem*, **278**, 28220-28228.
- Parisi, M.A., Bennett, C.L., Eckert, M.L., Dobyns, W.B., Gleeson, J.G., Shaw, D.W., McDonald, R., Eddy, A., Chance, P.F. and Glass, I.A. (2004) The NPHP1 gene deletion associated with juvenile nephronophthisis is present in a subset of individuals with Joubert syndrome. *Am J Hum Genet*, **75**, 82-91.
- Parisi, M.A., Doherty, D., Eckert, M.L., Shaw, D.W., Ozyurek, H., Aysun, S., Giray, O., Al Swaid, A., Al Shahwan, S., Dohayan, N., Bakhsh, E., Indridason, O.S., Dobyns, W.B., Bennett, C.L., Chance, P.F. and Glass, I.A. (2006) AH11 mutations cause both retinal dystrophy and renal cystic disease in Joubert syndrome. *J Med Genet*, **43**, 334-339.
- Parkinson, N.J., Olsson, C.L., Hallows, J.L., McKee-Johnson, J., Keogh, B.P., Noben-Trauth, K., Kujawa, S.G. and Tempel, B.L. (2001) Mutant beta-spectrin 4 causes auditory and motor neuropathies in quivering mice. *Nat Genet*, **29**, 61-65.
- Patel, P.I. and Dimachkie, M.M. (2000) Atypical friedreich ataxia with a very late onset and an unusual limited GAA repeat. *Arch Neurol*, **57**, 1380-1382.
- Patel, P.I. and Isaya, G. (2001) Friedreich ataxia: from GAA triplet-repeat expansion to frataxin deficiency. *Am J Hum Genet*, **69**, 15-24.
- Paull, T.T. and Gellert, M. (1998) The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell*, **1**, 969-979.
- Pellegrino, J.E., Lensch, M.W., Muenke, M. and Chance, P.F. (1997) Clinical and molecular analysis in Joubert syndrome. *Am J Med Genet*, **72**, 59-62.
- Petruzzella, V., Zoccolella, S., Amati, A., Torraco, A., Lamberti, P., Carnicella, F., Serlenga, L. and Papa, S. (2004) Cerebellar ataxia as atypical manifestation of the 3243A>G MELAS mutation. *Clin Genet*, **65**, 64-65.
- Pitts, S.A., Kullar, H.S., Stankovic, T., Stewart, G.S., Last, J.I., Bedenham, T., Armstrong, S.J., Piane, M., Chessa, L., Taylor, A.M. and Byrd, P.J. (2001) hMRE11: genomic structure and a null mutation identified in a transcript protected from nonsense-mediated mRNA decay. *Hum Mol Genet*, **10**, 1155-1162.
- Poon, W.W., Barkovich, R.J., Hsu, A.Y., Frankel, A., Lee, P.T., Shepherd, J.N., Myles, D.C. and Clarke, C.F. (1999) Yeast and rat Coq3 and Escherichia coli UbiG polypeptides catalyze both O-methyltransferase steps in coenzyme Q biosynthesis. *J Biol Chem*, **274**, 21665-21672.

- Poon, W.W., Davis, D.E., Ha, H.T., Jonassen, T., Rather, P.N. and Clarke, C.F. (2000) Identification of Escherichia coli ubiB, a gene required for the first monooxygenase step in ubiquinone biosynthesis. *J Bacteriol*, **182**, 5139-5146.
- Porreca, G.J., Zhang, K., Li, J.B., Xie, B., Austin, D., Vassallo, S.L., LeProust, E.M., Peck, B.J., Emig, C.J., Dahl, F., Gao, Y., Church, G.M. and Shendure, J. (2007) Multiplex amplification of large sets of human exons. *Nat Methods*, **4**, 931-936.
- Puccio, H. and Koenig, M. (2000) Recent advances in the molecular pathogenesis of Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet*, **9**, 887-892.
- Puccio, H. and Koenig, M. (2002) Friedreich ataxia: a paradigm for mitochondrial diseases. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 272-277.
- Puccio, H., Simon, D., Cossee, M., Criqui-Filipe, P., Tiziano, F., Melki, J., Hindelang, C., Matyas, R., Rustin, P. and Koenig, M. (2001) Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat Genet*, **27**, 181-186.
- Quick, K.L. and Dugan, L.L. (2001) Superoxide stress identifies neurons at risk in a model of ataxia-telangiectasia. *Ann Neurol*, **49**, 627-635.
- Quinzii, C., Naini, A., Salviati, L., Trevisson, E., Navas, P., Dimauro, S. and Hirano, M. (2006) A Mutation in Para-Hydroxybenzoate-Polyprenyl Transferase (COQ2) Causes Primary Coenzyme Q10 Deficiency. *Am J Hum Genet*, **78**, 345-349.
- Quinzii, C.M., DiMauro, S. and Hirano, M. (2007) Human coenzyme Q10 deficiency. *Neurochem Res*, **32**, 723-727.
- Quinzii, C.M., Kattah, A.G., Naini, A., Akman, H.O., Mootha, V.K., DiMauro, S. and Hirano, M. (2005) Coenzyme Q deficiency and cerebellar ataxia associated with an aprataxin mutation. *Neurology*, **64**, 539-541.
- Rahman, S., Hargreaves, I., Clayton, P. and Heales, S. (2001) Neonatal presentation of coenzyme Q10 deficiency. *J Pediatr*, **139**, 456-458.
- Ramazzotti, A., Vanmansart, V. and Foury, F. (2004) Mitochondrial functional interactions between frataxin and Isu1p, the iron-sulfur cluster scaffold protein, in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **557**, 215-220.
- Rantamaki, M.T., Soini, H.K., Finnila, S.M., Majamaa, K. and Udd, B. (2005) Adult-onset ataxia and polyneuropathy caused by mitochondrial 8993T-->C mutation. *Ann Neurol*, **58**, 337-340.
- Ranum, L.P. and Cooper, T.A. (2006) RNA-mediated neuromuscular disorders. *Annu Rev Neurosci*, **29**, 259-277.
- Rao, R.V., Poksay, K.S., Castro-Obregon, S., Schilling, B., Row, R.H., del Rio, G., Gibson, B.W., Ellerby, H.M. and Bredesen, D.E. (2004) Molecular components of a cell death pathway activated by endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*, **279**, 177-187.
- Raskind, W.H., Wijsman, E., Pagon, R.A., Cox, T.C., Bawden, M.J., May, B.K. and Bird, T.D. (1991) X-linked sideroblastic anemia and ataxia: linkage to phosphoglycerate kinase at Xq13. *Am J Hum Genet*, **48**, 335-341.
- Rass, U., Ahel, I. and West, S.C. (2007) Actions of aprataxin in multiple DNA repair pathways. *J Biol Chem*, **282**, 9469-9474.
- Ravn, K., Wibrand, F., Hansen, F.J., Horn, N., Rosenberg, T. and Schwartz, M. (2001) An mtDNA mutation, 14453G-->A, in the NADH dehydrogenase subunit 6 associated with severe MELAS syndrome. *Eur J Hum Genet*, **9**, 805-809.
- Reina-San-Martin, B., Chen, H.T., Nussenzweig, A. and Nussenzweig, M.C. (2004) ATM is required for efficient recombination between immunoglobulin switch regions. *J Exp Med*, **200**, 1103-1110.
- Richter, A., Rioux, J.D., Bouchard, J.P., Mercier, J., Mathieu, J., Ge, B., Poirier, J., Julien, D., Gyapay, G., Weissenbach, J., Hudson, T.J., Melancon, S.B. and Morgan, K. (1999) Location score and haplotype analyses of the locus for autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay, in chromosome region 13q11. *Am J Hum Genet*, **64**, 768-775.

- Richter, A.M., Ozgul, R.K., Poisson, V.C. and Topaloglu, H. (2004) Private SACS mutations in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS) families from Turkey. *Neurogenetics*, **5**, 165-170.
- Ristow, M., Pfister, M.F., Yee, A.J., Schubert, M., Michael, L., Zhang, C.Y., Ueki, K., Michael, M.D., 2nd, Lowell, B.B. and Kahn, C.R. (2000) Frataxin activates mitochondrial energy conversion and oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12239-12243.
- Romagnoli, A., Oradei, A., Destito, C., Iacocagni, A., Marin, A.W. and Littarru, G.P. (1994) Protective role in vivo of coenzyme Q10 during reperfusion of ischemic limbs. *Mol Aspects Med*, **15 Suppl**, s177-185.
- Ross, C.A. (2002) Polyglutamine pathogenesis: emergence of unifying mechanisms for Huntington's disease and related disorders. *Neuron*, **35**, 819-822.
- Ross, C.A. and Pickart, C.M. (2004) The ubiquitin-proteasome pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *Trends Cell Biol*, **14**, 703-711.
- Rotig, A., Appelkvist, E.L., Geromel, V., Chretien, D., Kadhon, N., Edery, P., Lebedeau, M., Dallner, G., Munnich, A., Ernster, L. and Rustin, P. (2000) Quinone-responsive multiple respiratory-chain dysfunction due to widespread coenzyme Q10 deficiency. *Lancet*, **356**, 391-395.
- Rotig, A., de Lonlay, P., Chretien, D., Foury, F., Koenig, M., Sidi, D., Munnich, A. and Rustin, P. (1997) Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat Genet*, **17**, 215-217.
- Roubertie, A., Biolsi, B., Rivier, F., Humbertclaude, V., Cheminal, R. and Echenne, B. (2003) Ataxia with vitamin E deficiency and severe dystonia: report of a case. *Brain Dev*, **25**, 442-445.
- Royer-Pokora, B., Kunkel, L.M., Monaco, A.P., Goff, S.C., Newburger, P.E., Baehner, R.L., Cole, F.S., Curnutte, J.T. and Orkin, S.H. (1986) Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. *Nature*, **322**, 32-38.
- Rugarli, E.I. and Langer, T. (2006) Translating m-AAA protease function in mitochondria to hereditary spastic paraplegia. *Trends Mol Med*, **12**, 262-269.
- Rundek, T., Naini, A., Sacco, R., Coates, K. and DiMauro, S. (2004) Atorvastatin decreases the coenzyme Q10 level in the blood of patients at risk for cardiovascular disease and stroke. *Arch Neurol*, **61**, 889-892.
- Rustin, P., von Kleist-Retzow, J.C., Chantrel-Groussard, K., Sidi, D., Munnich, A. and Rotig, A. (1999) Effect of idebenone on cardiomyopathy in Friedreich's ataxia: a preliminary study. *Lancet*, **354**, 477-479.
- Saar, K., Al-Gazali, L., Sztriha, L., Rueschendorf, F., Nur, E.K.M., Reis, A. and Bayoumi, R. (1999) Homozygosity mapping in families with Joubert syndrome identifies a locus on chromosome 9q34.3 and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet*, **65**, 1666-1671.
- Sachidanandam, R., Weissman, D., Schmidt, S.C., Kakol, J.M., Stein, L.D., Marth, G., Sherry, S., Mullikin, J.C., Mortimore, B.J., Willey, D.L., Hunt, S.E., Cole, C.G., Coggill, P.C., Rice, C.M., Ning, Z., Rogers, J., Bentley, D.R., Kwok, P.Y., Mardis, E.R., Yeh, R.T., Schultz, B., Cook, L., Davenport, R., Dante, M., Fulton, L., Hillier, L., Waterston, R.H., McPherson, J.D., Gilman, B., Schaffner, S., Van Etten, W.J., Reich, D., Higgins, J., Daly, M.J., Blumenstiel, B., Baldwin, J., Stange-Thomann, N., Zody, M.C., Linton, L., Lander, E.S. and Altshuler, D. (2001) A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, **409**, 928-933.
- Said, G., Marion, M.H., Selva, J. and Jamet, C. (1986) Hypotrophic and dying-back nerve fibers in Friedreich's ataxia. *Neurology*, **36**, 1292-1299.
- Saiki, R., Nagata, A., Kainou, T., Matsuda, H. and Kawamukai, M. (2005) Characterization of solanesyl and decaprenyl diphosphate synthases in mice and humans. *Febs J*, **272**, 5606-5622.
- Saiki, R., Nagata, A., Uchida, N., Kainou, T., Matsuda, H. and Kawamukai, M. (2003) Fission yeast decaprenyl diphosphate synthase consists of Dps1 and the newly characterized Dlp1 protein in a novel heterotetrameric structure. *Eur J Biochem*, **270**, 4113-4121.

- Salvatore, E., Varrone, A., Criscuolo, C., Mancini, P., Sansone, V., Strisciuglio, C., Cicala, D., Scarano, V., Salvatore, M., Pappata, S., De Michele, G. and Filla, A. (2007) Nigrostriatal involvement in ataxia with oculomotor apraxia type 1. *J Neurol*.
- Salviati, L., Sacconi, S., Murer, L., Zacchello, G., Franceschini, L., Laverda, A.M., Basso, G., Quinzii, C., Angelini, C., Hirano, M., Naini, A.B., Navas, P., DiMauro, S. and Montini, G. (2005) Infantile encephalomyopathy and nephropathy with CoQ10 deficiency: a CoQ10-responsive condition. *Neurology*, **65**, 606-608.
- Sanes, J.R. and Lichtman, J.W. (2001) Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 791-805.
- Sano, Y., Date, H., Igarashi, S., Onodera, O., Oyake, M., Takahashi, T., Hayashi, S., Morimatsu, M., Takahashi, H., Makifuchi, T., Fukuhara, N. and Tsuji, S. (2004) Aprataxin, the causative protein for EAOH is a nuclear protein with a potential role as a DNA repair protein. *Ann Neurol*, **55**, 241-249.
- Santos-Ocana, C., Do, T.Q., Padilla, S., Navas, P. and Clarke, C.F. (2002) Uptake of exogenous coenzyme Q and transport to mitochondria is required for bc1 complex stability in yeast coq mutants. *J Biol Chem*, **277**, 10973-10981.
- Saraiva, J.M. and Baraitser, M. (1992) Joubert syndrome: a review. *Am J Med Genet*, **43**, 726-731.
- Sasaki, K., Suga, K., Tsugawa, S., Sakuma, K., Tachi, N., Chiba, S. and Imamura, S. (1996) Muscle pathology in Marinesco-Sjogren syndrome: a unique ultrastructural feature. *Brain Dev*, **18**, 64-67.
- Satran, D., Pierpont, M.E. and Dobyns, W.B. (1999) Cerebello-oculo-renal syndromes including Arima, Senior-Loken and COACH syndromes: more than just variants of Joubert syndrome. *Am J Med Genet*, **86**, 459-469.
- Saunier, S., Calado, J., Heilig, R., Silbermann, F., Benessy, F., Morin, G., Konrad, M., Broyer, M., Gubler, M.C., Weissenbach, J. and Antignac, C. (1997) A novel gene that encodes a protein with a putative src homology 3 domain is a candidate gene for familial juvenile nephronophthisis. *Hum Mol Genet*, **6**, 2317-2323.
- Saviozzi, S., Saluto, A., Taylor, A.M., Last, J.I., Trebini, F., Paradiso, M.C., Grosso, E., Funaro, A., Ponzio, G., Migone, N. and Brusco, A. (2002) A late onset variant of ataxia-telangiectasia with a compound heterozygous genotype, A8030G/7481insA. *J Med Genet*, **39**, 57-61.
- Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., Tagle, D.A., Smith, S., Uziel, T., Sfez, S., Ashkenazi, M., Pecker, I., Frydman, M., Harnik, R., Patanjali, S.R., Simmons, A., Clines, G.A., Sartiel, A., Gatti, R.A., Chessa, L., Sanal, O., Lavin, M.F., Jaspers, N.G., Taylor, A.M., Arlett, C.F., Miki, T., Weissman, S.M., Lovett, M., Collins, F.S. and Shiloh, Y. (1995) A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*, **268**, 1749-1753.
- Sayer, J.A., Otto, E.A., O'Toole, J.F., Nurnberg, G., Kennedy, M.A., Becker, C., Hennies, H.C., Helou, J., Attanasio, M., Fausett, B.V., Utsch, B., Khanna, H., Liu, Y., Drummond, I., Kawakami, I., Kusakabe, T., Tsuda, M., Ma, L., Lee, H., Larson, R.G., Allen, S.J., Wilkinson, C.J., Nigg, E.A., Shou, C., Lillo, C., Williams, D.S., Hoppe, B., Kemper, M.J., Neuhaus, T., Parisi, M.A., Glass, I.A., Petry, M., Kispert, A., Gloy, J., Ganner, A., Walz, G., Zhu, X., Goldman, D., Nurnberg, P., Swaroop, A., Leroux, M.R. and Hildebrandt, F. (2006) The centrosomal protein nephrocystin-6 is mutated in Joubert syndrome and activates transcription factor ATF4. *Nat Genet*, **38**, 674-681.
- Scheeff, E.D. and Bourne, P.E. (2005) Structural evolution of the protein kinase-like superfamily. *PLoS Comput Biol*, **1**, e49.
- Scheper, G.C., van der Klok, T., van Andel, R.J., van Berkel, C.G., Sissler, M., Smet, J., Muravina, T.I., Serkov, S.V., Uziel, G., Bugiani, M., Schiffmann, R., Krageloh-Mann, I., Smeitink, J.A., Florentz, C., Van Coster, R., Pronk, J.C. and van der Knaap, M.S. (2007) Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation. *Nat Genet*, **39**, 534-539.
- Schlotterer, C. (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, **109**, 365-371.
- Schmitz-Hubsch, T., Tezenas du Montcel, S., Baliko, L., Boesch, S., Bonato, S., Fancellu, R., Giunti, P., Globas, C., Kang, J.S., Kremer, B., Mariotti, C., Melegh, B., Rakowicz, M., Rola, R., Romano, S.,

- Schols, L., Szymanski, S., van de Warrenburg, B.P., Zdzienicka, E., Durr, A. and Klockgether, T. (2006) Reliability and validity of the International Cooperative Ataxia Rating Scale: a study in 156 spinocerebellar ataxia patients. *Mov Disord*, **21**, 699-704.
- Schols, L., Amoiridis, G., Przuntek, H., Frank, G., Epplen, J.T. and Epplen, C. (1997) Friedreich's ataxia. Revision of the phenotype according to molecular genetics. *Brain*, **120** ( Pt 12), 2131-2140.
- Sekijima, Y., Hashimoto, T., Onodera, O., Date, H., Okano, T., Naito, K., Tsuji, S. and Ikeda, S. (2003) Severe generalized dystonia as a presentation of a patient with aprataxin gene mutation. *Mov Disord*, **18**, 1198-1200.
- Sekijima, Y., Ohara, S., Nakagawa, S., Tabata, K., Yoshida, K., Ishigame, H., Shimizu, Y. and Yanagisawa, N. (1998) Hereditary motor and sensory neuropathy associated with cerebellar atrophy (HMSNCA): clinical and neuropathological features of a Japanese family. *J Neurol Sci*, **158**, 30-37.
- Senderek, J., Krieger, M., Stendel, C., Bergmann, C., Moser, M., Breitbach-Faller, N., Rudnik-Schoneborn, S., Blaschek, A., Wolf, N.I., Harting, I., North, K., Smith, J., Muntoni, F., Brockington, M., Quijano-Roy, S., Renault, F., Herrmann, R., Hendershot, L.M., Schroder, J.M., Lochmuller, H., Topaloglu, H., Voit, T., Weis, J., Ebinger, F. and Zerres, K. (2005) Mutations in *SIL1* cause Marinesco-Sjogren syndrome, a cerebellar ataxia with cataract and myopathy. *Nat Genet*, **37**, 1312-1314.
- Senior, B., Friedmann, A.I. and Braudo, J.L. (1961) Juvenile familial nephropathy with tapetoretinal degeneration. A new oculorenal dystrophy. *Am J Ophthalmol*, **52**, 625-633.
- Sewry, C.A., Voit, T. and Dubowitz, V. (1988) Myopathy with unique ultrastructural feature in Marinesco-Sjogren syndrome. *Ann Neurol*, **24**, 576-580.
- Seznec, H., Simon, D., Monassier, L., Criqui-Filipe, P., Gansmuller, A., Rustin, P., Koenig, M. and Puccio, H. (2004) Idebenone delays the onset of cardiac functional alteration without correction of Fe-S enzymes deficit in a mouse model for Friedreich ataxia. *Hum Mol Genet*, **13**, 1017-1024.
- Sharp, D., Blinderman, L., Combs, K.A., Kienzle, B., Ricci, B., Wager-Smith, K., Gil, C.M., Turck, C.W., Bouma, M.E., Rader, D.J. and et al. (1993) Cloning and gene defects in microsomal triglyceride transfer protein associated with abetalipoproteinaemia. *Nature*, **365**, 65-69.
- Shiloh, Y. (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*, **3**, 155-168.
- Shimazaki, H., Sakoe, K., Nijjima, K., Nakano, I. and Takiyama, Y. (2007) An unusual case of a spasticity-lacking phenotype with a novel SACS mutation. *J Neurol Sci*, **255**, 87-89.
- Shimazaki, H., Takiyama, Y., Sakoe, K., Ando, Y. and Nakano, I. (2005) A phenotype without spasticity in saccin-related ataxia. *Neurology*, **64**, 2129-2131.
- Shimazaki, H., Takiyama, Y., Sakoe, K., Ikeguchi, K., Nijjima, K., Kaneko, J., Namekawa, M., Ogawa, T., Date, H., Tsuji, S., Nakano, I. and Nishizawa, M. (2002) Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia: the aprataxin gene mutations. *Neurology*, **59**, 590-595.
- Shimohata, T., Date, H., Ishiguro, H., Suzuki, T., Takano, H., Tanaka, H., Tsuji, S. and Hirota, K. (1998) Ataxia with isolated vitamin E deficiency and retinitis pigmentosa. *Ann Neurol*, **43**, 273.
- Shoffner, J.M., Fernhoff, P.M., Krawiecki, N.S., Caplan, D.B., Holt, P.J., Koontz, D.A., Takei, Y., Newman, N.J., Ortiz, R.G., Polak, M., Ballinger, S.W., Lott, M.T. and Wallace, D.C. (1992) Subacute necrotizing encephalopathy: Oxidative phosphorylation defects and the ATPase 6 point mutation. *Neurology*, **42**, 2168-2174.
- Shy, G.M., Gonatas, N.K. and Perez, M. (1966) Two childhood myopathies with abnormal mitochondria. I. Megaconial myopathy. II. Pleoconial myopathy. *Brain*, **89**, 133-158.
- Silvestri, G., Moraes, C.T., Shanske, S., Oh, S.J. and DiMauro, S. (1992) A new mtDNA mutation in the tRNALys gene associated with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Am J Hum Genet*, **51**, 1213-1217.
- Simon, D., Seznec, H., Gansmuller, A., Carelle, N., Weber, P., Metzger, D., Rustin, P., Koenig, M. and Puccio, H. (2004) Friedreich ataxia mouse models with progressive cerebellar and sensory ataxia reveal autophagic neurodegeneration in dorsal root ganglia. *J Neurosci*, **24**, 1987-1995.

- Sjögren, T. (1950) hereditary congenital spinocerebellar ataxia accompanied by congenital cataract and oligophrenia. *Confinia neurol*, **10**, 293-308.
- Slavotinek, A.M., Stone, E.M., Mykytyn, K., Heckenlively, J.R., Green, J.S., Heon, E., Musarella, M.A., Parfrey, P.S., Sheffield, V.C. and Biesecker, L.G. (2000) Mutations in MKKS cause Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet*, **26**, 15-16.
- Smith, U.M., Consugar, M., Tee, L.J., McKee, B.M., Maina, E.N., Whelan, S., Morgan, N.V., Goranson, E., Gissen, P., Lilliquist, S., Aligianis, I.A., Ward, C.J., Pasha, S., Punyashthiti, R., Malik Sharif, S., Batman, P.A., Bennett, C.P., Woods, C.G., McKeown, C., Bucourt, M., Miller, C.A., Cox, P., Algazali, L., Trembath, R.C., Torres, V.E., Attie-Bitach, T., Kelly, D.A., Maher, E.R., Gattone, V.H., 2nd, Harris, P.C. and Johnson, C.A. (2006) The transmembrane protein meckelin (MKS3) is mutated in Meckel-Gruber syndrome and the wpk rat. *Nat Genet*, **38**, 191-196.
- Sobreira, C., Hirano, M., Shanske, S., Keller, R.K., Haller, R.G., Davidson, E., Santorelli, F.M., Miranda, A.F., Bonilla, E., Mojon, D.S., Barreira, A.A., King, M.P. and DiMauro, S. (1997) Mitochondrial encephalomyopathy with coenzyme Q10 deficiency. *Neurology*, **48**, 1238-1243.
- Sobrevilla, L.A., Goodman, M.L. and Kane, C.A. (1964) Demyelinating Central Nervous System Disease, Macular Atrophy and Acanthocytosis (Bassen-Kornzweig Syndrome). *Am J Med*, **37**, 821-828.
- Sorbi, S., Forleo, P., Cellini, E., Piacentini, S., Serio, A., Guarnieri, B. and Petruzzi, C. (2000) Atypical Friedreich ataxia with a very late onset and an unusual limited GAA repeat. *Arch Neurol*, **57**, 1380-1382.
- Spelbrink, J.N., Li, F.Y., Tiranti, V., Nikali, K., Yuan, Q.P., Tariq, M., Wanrooij, S., Garrido, N., Comi, G., Morandi, L., Santoro, L., Toscano, A., Fabrizi, G.M., Somer, H., Croxen, R., Beeson, D., Poulton, J., Suomalainen, A., Jacobs, H.T., Zeviani, M. and Larsson, C. (2001) Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat Genet*, **28**, 223-231.
- Steinlin, M., Schmid, M., Landau, K. and Boltshauser, E. (1997) Follow-up in children with Joubert syndrome. *Neuropediatrics*, **28**, 204-211.
- Stern, N., Hochman, A., Zemach, N., Weizman, N., Hammel, I., Shiloh, Y., Rotman, G. and Barzilai, A. (2002) Accumulation of DNA damage and reduced levels of nicotine adenine dinucleotide in the brains of Atm-deficient mice. *J Biol Chem*, **277**, 602-608.
- Stewart, G.S., Maser, R.S., Stankovic, T., Bressan, D.A., Kaplan, M.I., Jaspers, N.G., Raams, A., Byrd, P.J., Petrini, J.H. and Taylor, A.M. (1999) The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell*, **99**, 577-587.
- Stoetzel, C., Laurier, V., Davis, E.E., Muller, J., Rix, S., Badano, J.L., Leitch, C.C., Salem, N., Chouery, E., Corbani, S., Jalk, N., Vicaire, S., Sarda, P., Hamel, C., Lacombe, D., Holder, M., Odent, S., Holder, S., Brooks, A.S., Elcioglu, N.H., Silva, E.D., Rossillion, B., Sigaudy, S., de Ravel, T.J., Lewis, R.A., Leheup, B., Verloes, A., Amati-Bonneau, P., Megarbane, A., Poch, O., Bonneau, D., Beales, P.L., Mandel, J.L., Katsanis, N. and Dollfus, H. (2006) BBS10 encodes a vertebrate-specific chaperonin-like protein and is a major BBS locus. *Nat Genet*, **38**, 521-524.
- Stoetzel, C., Muller, J., Laurier, V., Davis, E.E., Zaghoul, N.A., Vicaire, S., Jacquelin, C., Plewniak, F., Leitch, C.C., Sarda, P., Hamel, C., de Ravel, T.J., Lewis, R.A., Friederich, E., Thibault, C., Danse, J.M., Verloes, A., Bonneau, D., Katsanis, N., Poch, O., Mandel, J.L. and Dollfus, H. (2007) Identification of a novel BBS gene (BBS12) highlights the major role of a vertebrate-specific branch of chaperonin-related proteins in Bardet-Biedl syndrome. *Am J Hum Genet*, **80**, 1-11.
- Superneau, D.W., Wertelecki, W., Zellweger, H. and Bastian, F. (1987) Myopathy in Marinesco-Sjogren syndrome. *Eur Neurol*, **26**, 8-16.
- Suraweera, A., Becherel, O.J., Chen, P., Rundle, N., Woods, R., Nakamura, J., Gatei, M., Criscuolo, C., Filla, A., Chessa, L., Fusser, M., Epe, B., Gueven, N. and Lavin, M.F. (2007) Senataxin, defective in ataxia oculomotor apraxia type 2, is involved in the defense against oxidative DNA damage. *J Cell Biol*, **177**, 969-979.

- Suzuki, Y., Murakami, N., Goto, Y., Orimo, S., Komiyama, A., Kuroiwa, Y. and Nonaka, I. (1997) Apoptotic nuclear degeneration in Marinesco-Sjogren syndrome. *Acta Neuropathol (Berl)*, **94**, 410-415.
- Swift, M., Heim, R.A. and Lench, N.J. (1993) Genetic aspects of ataxia telangiectasia. *Adv Neurol*, **61**, 115-125.
- Szabo, A., Langer, T., Schroder, H., Flanagan, J., Bukau, B. and Hartl, F.U. (1994) The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the Escherichia coli Hsp70 system DnaK, DnaJ, and GrpE. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 10345-10349.
- Sztriha, L., Al-Gazali, L.I., Aithala, G.R. and Nork, M. (1999) Joubert's syndrome: new cases and review of clinicopathologic correlation. *Pediatr Neurol*, **20**, 274-281.
- Tachi, N., Nagata, N., Wakai, S. and Chiba, S. (1991) Congenital muscular dystrophy in Marinesco-Sjogren syndrome. *Pediatr Neurol*, **7**, 296-298.
- Takahashi, T., Yamaguchi, T., Shitashige, M., Okamoto, T. and Kishi, T. (1995) Reduction of ubiquinone in membrane lipids by rat liver cytosol and its involvement in the cellular defence system against lipid peroxidation. *Biochem J*, **309** ( Pt 3), 883-890.
- Takashima, H., Boerkoel, C.F., John, J., Saifi, G.M., Salih, M.A., Armstrong, D., Mao, Y., Quijcho, F.A., Roa, B.B., Nakagawa, M., Stockton, D.W. and Lupski, J.R. (2002) Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. *Nat Genet*, **32**, 267-272.
- Takiyama, Y. (2006) Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Neuropathology*, **26**, 368-375.
- Tang, B.S., Zhao, G.H., Luo, W., Xia, K., Cai, F., Pan, Q., Zhang, R.X., Zhang, F.F., Liu, X.M., Chen, B., Zhang, C., Shen, L., Jiang, H., Long, Z.G. and Dai, H.P. (2005) Small heat-shock protein 22 mutated in autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2L. *Hum Genet*, **116**, 222-224.
- Taroni, F. and DiDonato, S. (2004) Pathways to motor incoordination: the inherited ataxias. *Nat Rev Neurosci*, **5**, 641-655.
- Tatuch, Y., Christodoulou, J., Feigenbaum, A., Clarke, J.T.R., Wherret, J., Smith, C., Rudd, N., Petrova-Benedict, R. and Robinson, B.H. (1992) Heteroplasmic mtDNA mutation (T->G) at 8993 can cause Leigh disease when the percentage of abnormal mtDNA is high. *Am J Hum Genet*, **50**, 852-858.
- Tavani, F., Zimmerman, R.A., Berry, G.T., Sullivan, K., Gatti, R. and Bingham, P. (2003) Ataxia-telangiectasia: the pattern of cerebellar atrophy on MRI. *Neuroradiology*, **45**, 315-319.
- Thiffault, I., Rioux, M.F., Tetreault, M., Jarry, J., Loiselle, L., Poirier, J., Gros-Louis, F., Mathieu, J., Vanasse, M., Rouleau, G.A., Bouchard, J.P., Lesage, J. and Brais, B. (2006) A new autosomal recessive spastic ataxia associated with frequent white matter changes maps to 2q33-34. *Brain*, **129**, 2332-2340.
- Tomasetti, M., Alleva, R., Borghi, B. and Collins, A.R. (2001) In vivo supplementation with coenzyme Q10 enhances the recovery of human lymphocytes from oxidative DNA damage. *Faseb J*, **15**, 1425-1427.
- Tomasetti, M., Littarru, G.P., Stocker, R. and Alleva, R. (1999) Coenzyme Q10 enrichment decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Free Radic Biol Med*, **27**, 1027-1032.
- Torbergson, T., Stalberg, E., Aasly, J. and Lindal, S. (1991) Myopathy in Marinesco-Sjogren syndrome: an electrophysiological study. *Acta Neurol Scand*, **84**, 132-138.
- Tournev, I., Kalaydjieva, L., Youl, B., Ishpekova, B., Guerguelcheva, V., Kamenov, O., Katarova, M., Kamenov, Z., Raicheva-Terzieva, M., King, R.H., Romanski, K., Petkov, R., Schmarov, A., Dimitrova, G., Popova, N., Uzunova, M., Milanov, S., Petrova, J., Petkov, Y., Kolarov, G., Aneva, L., Radeva, O. and Thomas, P.K. (1999a) Congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome, a novel complex genetic disease in Balkan Gypsies: clinical and electrophysiological observations. *Ann Neurol*, **45**, 742-750.

- Tournev, I., King, R.H., Workman, J., Nourallah, M., Muddle, J.R., Kalaydjieva, L., Romanski, K. and Thomas, P.K. (1999b) Peripheral nerve abnormalities in the congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy (CCFDN) syndrome. *Acta Neuropathol (Berl)*, **98**, 165-170.
- Traber, M.G., Sokol, R.J., Burton, G.W., Ingold, K.U., Papas, A.M., Huffaker, J.E. and Kayden, H.J. (1990) Impaired ability of patients with familial isolated vitamin E deficiency to incorporate alpha-tocopherol into lipoproteins secreted by the liver. *J Clin Invest*, **85**, 397-407.
- Tran, U.C. and Clarke, C.F. (2007) Endogenous synthesis of coenzyme Q in eukaryotes. *Mitochondrion*, **7 Suppl**, S62-71.
- Tran, U.C., Marbois, B., Gin, P., Gulmezian, M., Jonassen, T. and Clarke, C.F. (2006) Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* coq7 mutants by mitochondrial targeting of the *Escherichia coli* UbiF polypeptide: two functions of yeast Coq7 polypeptide in coenzyme Q biosynthesis. *J Biol Chem*, **281**, 16401-16409.
- Tranchant, C., Fleury, M., Moreira, M.C., Koenig, M. and Warter, J.M. (2003) Phenotypic variability of aprataxin gene mutations. *Neurology*, **60**, 868-870.
- Tranebjaerg, L., Teslovich, T.M., Jones, M., Barmada, M.M., Fagerheim, T., Dahl, A., Escolar, D.M., Trent, J.M., Gillanders, E.M. and Stephan, D.A. (2003) Genome-wide homozygosity mapping localizes a gene for autosomal recessive non-progressive infantile ataxia to 20q11-q13. *Hum Genet*, **113**, 293-295.
- Tsukahara, M., Masuda, M., Ohshiro, K., Kobayashi, K., Kajii, T., Ejima, Y. and Sasaki, M.S. (1986) Ataxia telangiectasia with generalized skin pigmentation and early death. *Eur J Pediatr*, **145**, 121-124.
- Turkmen, S., Demirhan, O., Hoffmann, K., Diers, A., Zimmer, C., Sperling, K. and Mundlos, S. (2006) Cerebellar hypoplasia and quadrupedal locomotion in humans as a recessive trait mapping to chromosome 17p. *J Med Genet*, **43**, 461-464.
- Turunen, M., Olsson, J. and Dallner, G. (2004) Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta*, **1660**, 171-199.
- Tyynismaa, H., Sembongi, H., Bokori-Brown, M., Granycome, C., Ashley, N., Poulton, J., Jalanko, A., Spelbrink, J.N., Holt, I.J. and Suomalainen, A. (2004) Twinkle helicase is essential for mtDNA maintenance and regulates mtDNA copy number. *Hum Mol Genet*, **13**, 3219-3227.
- Tzagoloff, A., Akai, A. and Needleman, R.B. (1975a) Assembly of the mitochondrial membrane system. Characterization of nuclear mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with defects in mitochondrial ATPase and respiratory enzymes. *J Biol Chem*, **250**, 8228-8235.
- Tzagoloff, A., Akai, A. and Needleman, R.B. (1975b) Assembly of the mitochondrial membrane system: isolation of nuclear and cytoplasmic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with specific defects in mitochondrial functions. *J Bacteriol*, **122**, 826-831.
- Tzagoloff, A. and Shtanko, A. (1995) Mitochondrial and cytoplasmic isoleucyl-, glutamyl- and arginyl-tRNA synthetases of yeast are encoded by separate genes. *Eur J Biochem*, **230**, 582-586.
- Tzoulis, C., Engelsen, B.A., Telstad, W., Aasly, J., Zeviani, M., Winterthun, S., Ferrari, G., Aarseth, J.H. and Bindoff, L.A. (2006) The spectrum of clinical disease caused by the A467T and W748S POLG mutations: a study of 26 cases. *Brain*, **129**, 1685-1692.
- Ursic, D., Chinchilla, K., Finkel, J.S. and Culbertson, M.R. (2004) Multiple protein/protein and protein/RNA interactions suggest roles for yeast DNA/RNA helicase Sen1p in transcription, transcription-coupled DNA repair and RNA processing. *Nucleic Acids Res*, **32**, 2441-2452.
- Utsch, B., Sayer, J.A., Attanasio, M., Pereira, R.R., Eccles, M., Hennies, H.C., Otto, E.A. and Hildebrandt, F. (2006) Identification of the first AHI1 gene mutations in nephronophthisis-associated Joubert syndrome. *Pediatr Nephrol*, **21**, 32-35.
- Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L. and Shiloh, Y. (2003) Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *Embo J*, **22**, 5612-5621.
- Vajo, Z., King, L.M., Jonassen, T., Wilkin, D.J., Ho, N., Munnich, A., Clarke, C.F. and Francomano, C.A. (1999) Conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene *clk-1* from yeast to human: a gene



- required for ubiquinone biosynthesis with potential implications for aging. *Mamm Genome*, **10**, 1000-1004.
- Valente, E.M., Brancati, F., Silhavy, J.L., Castori, M., Marsh, S.E., Barrano, G., Bertini, E., Boltshauser, E., Zaki, M.S., Abdel-Aleem, A., Abdel-Salam, G.M., Bellacchio, E., Battini, R., Cruse, R.P., Dobyns, W.B., Krishnamoorthy, K.S., Lagier-Tourenne, C., Magee, A., Pascual-Castroviejo, I., Salpietro, C.D., Sarco, D., Dallapiccola, B. and Gleeson, J.G. (2006a) AHI1 gene mutations cause specific forms of Joubert syndrome-related disorders. *Ann Neurol*, **59**, 527-534.
- Valente, E.M., Marsh, S.E., Castori, M., Dixon-Salazar, T., Bertini, E., Al-Gazali, L., Messer, J., Barbot, C., Woods, C.G., Boltshauser, E., Al-Tawari, A.A., Salpietro, C.D., Kayserili, H., Sztriha, L., Gribaa, M., Koenig, M., Dallapiccola, B. and Gleeson, J.G. (2005) Distinguishing the four genetic causes of Jouberts syndrome-related disorders. *Ann Neurol*, **57**, 513-519.
- Valente, E.M., Salpietro, D.C., Brancati, F., Bertini, E., Galluccio, T., Tortorella, G., Briuglia, S. and Dallapiccola, B. (2003) Description, nomenclature, and mapping of a novel cerebello-renal syndrome with the molar tooth malformation. *Am J Hum Genet*, **73**, 663-670.
- Valente, E.M., Silhavy, J.L., Brancati, F., Barrano, G., Krishnaswami, S.R., Castori, M., Lancaster, M.A., Boltshauser, E., Boccone, L., Al-Gazali, L., Fazzi, E., Signorini, S., Louie, C.M., Bellacchio, E., Bertini, E., Dallapiccola, B. and Gleeson, J.G. (2006b) Mutations in CEP290, which encodes a centrosomal protein, cause pleiotropic forms of Joubert syndrome. *Nat Genet*, **38**, 623-625.
- Van Goethem, G., Dermaut, B., Lofgren, A., Martin, J.J. and Van Broeckhoven, C. (2001) Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat Genet*, **28**, 211-212.
- Van Goethem, G., Martin, J.J., Dermaut, B., Lofgren, A., Wibail, A., Ververken, D., Tack, P., Dehaene, I., Van Zandijcke, M., Moonen, M., Ceuterick, C., De Jonghe, P. and Van Broeckhoven, C. (2003) Recessive POLG mutations presenting with sensory and ataxic neuropathy in compound heterozygote patients with progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscul Disord*, **13**, 133-142.
- Van Maldergem, L., Trijbels, F., DiMauro, S., Sindelar, P.J., Musumeci, O., Janssen, A., Delberghe, X., Martin, J.J. and Gillerot, Y. (2002) Coenzyme Q-responsive Leigh's encephalopathy in two sisters. *Ann Neurol*, **52**, 750-754.
- Varon, R., Gooding, R., Steglich, C., Marns, L., Tang, H., Angelicheva, D., Yong, K.K., Ambrugger, P., Reinhold, A., Morar, B., Baas, F., Kwa, M., Tournev, I., Guerguelcheva, V., Kremensky, I., Lochmuller, H., Mullner-Eidenbock, A., Merlini, L., Neumann, L., Burger, J., Walter, M., Swoboda, K., Thomas, P.K., von Moers, A., Risch, N. and Kalaydjieva, L. (2003) Partial deficiency of the C-terminal-domain phosphatase of RNA polymerase II is associated with congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome. *Nat Genet*, **35**, 185-189.
- Varon, R., Vissinga, C., Platzer, M., Cerosaletti, K.M., Chrzanowska, K.H., Saar, K., Beckmann, G., Seemanova, E., Cooper, P.R., Nowak, N.J., Stumm, M., Weemaes, C.M., Gatti, R.A., Wilson, R.K., Digweed, M., Rosenthal, A., Sperling, K., Concannon, P. and Reis, A. (1998) Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell*, **93**, 467-476.
- Verkerk, A.J., Pieretti, M., Sutcliffe, J.S., Fu, Y.H., Kuhl, D.P., Pizzuti, A., Reiner, O., Richards, S., Victoria, M.F., Zhang, F.P. and et al. (1991) Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*, **65**, 905-914.
- Verloes, A. and Lambotte, C. (1989) Further delineation of a syndrome of cerebellar vermis hypo/aplasia, oligophrenia, congenital ataxia, coloboma, and hepatic fibrosis. *Am J Med Genet*, **32**, 227-232.
- Vicart, P., Caron, A., Guicheney, P., Li, Z., Prevost, M.C., Faure, A., Chateau, D., Chapon, F., Tome, F., Dupret, J.M., Paulin, D. and Fardeau, M. (1998) A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet*, **20**, 92-95.
- Voncken, M., Ioannou, P. and Delatycki, M.B. (2004) Friedreich ataxia-update on pathogenesis and possible therapies. *Neurogenetics*, **5**, 1-8.

- Walker, P.D., Blitzer, M.G. and Shapira, E. (1985) Marinesco-Sjogren syndrome: evidence for a lysosomal storage disorder. *Neurology*, **35**, 415-419.
- Walter, L., Nogueira, V., Leverve, X., Heitz, M.P., Bernardi, P. and Fontaine, E. (2000) Three classes of ubiquinone analogs regulate the mitochondrial permeability transition pore through a common site. *J Biol Chem*, **275**, 29521-29527.
- Warner, G.J., Berry, M.J., Moustafa, M.E., Carlson, B.A., Hatfield, D.L. and Faust, J.R. (2000) Inhibition of selenoprotein synthesis by selenocysteine tRNA[Ser]<sup>Sec</sup> lacking isopentenyladenosine. *J Biol Chem*, **275**, 28110-28119.
- Warner, J.P., Barron, L.H., Goudie, D., Kelly, K., Dow, D., Fitzpatrick, D.R. and Brock, D.J. (1996) A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR. *J Med Genet*, **33**, 1022-1026.
- Warrick, J.M., Chan, H.Y., Gray-Board, G.L., Chai, Y., Paulson, H.L. and Bonini, N.M. (1999) Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in Drosophila by the molecular chaperone HSP70. *Nat Genet*, **23**, 425-428.
- Watanabe, M., Sugai, Y., Concannon, P., Koenig, M., Schmitt, M., Sato, M., Shizuka, M., Mizushima, K., Ikeda, Y., Tomidokoro, Y., Okamoto, K. and Shoji, M. (1998) Familial spinocerebellar ataxia with cerebellar atrophy, peripheral neuropathy, and elevated level of serum creatine kinase, gamma-globulin, and alpha-fetoprotein. *Ann Neurol*, **44**, 265-269.
- Waters, M.F., Minassian, N.A., Stevanin, G., Figueroa, K.P., Bannister, J.P., Nolte, D., Mock, A.F., Evidente, V.G., Fee, D.B., Muller, U., Durr, A., Brice, A., Papazian, D.M. and Pulst, S.M. (2006) Mutations in voltage-gated potassium channel KCNC3 cause degenerative and developmental central nervous system phenotypes. *Nat Genet*, **38**, 447-451.
- Weemaes, C.M., Hustinx, T.W., Scheres, J.M., van Munster, P.J., Bakkeren, J.A. and Taalman, R.D. (1981) A new chromosomal instability disorder: the Nijmegen breakage syndrome. *Acta Paediatr Scand*, **70**, 557-564.
- Weyer, A., Abele, M., Schmitz-Hubsch, T., Schoch, B., Frings, M., Timmann, D. and Klockgether, T. (2007) Reliability and validity of the scale for the assessment and rating of ataxia: a study in 64 ataxia patients. *Mov Disord*, **22**, 1633-1637.
- Whitehouse, C.J., Taylor, R.M., Thistlethwaite, A., Zhang, H., Karimi-Busheri, F., Lasko, D.D., Weinfeld, M. and Caldecott, K.W. (2001) XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair. *Cell*, **104**, 107-117.
- Wilson, R.B. and Roof, D.M. (1997) Respiratory deficiency due to loss of mitochondrial DNA in yeast lacking the frataxin homologue. *Nat Genet*, **16**, 352-357.
- Winkelbauer, M.E., Schafer, J.C., Haycraft, C.J., Swoboda, P. and Yoder, B.K. (2005) The C. elegans homologs of nephrocystin-1 and nephrocystin-4 are cilia transition zone proteins involved in chemosensory perception. *J Cell Sci*, **118**, 5575-5587.
- Winter, R.M., Harding, A.E., Baraitser, M. and Bravery, M.B. (1981) Intrafamilial correlation in Friedreich's ataxia. *Clin Genet*, **20**, 419-427.
- Winterthun, S., Ferrari, G., He, L., Taylor, R.W., Zeviani, M., Turnbull, D.M., Engelsens, B.A., Moen, G. and Bindoff, L.A. (2005) Autosomal recessive mitochondrial ataxic syndrome due to mitochondrial polymerase gamma mutations. *Neurology*, **64**, 1204-1208.
- Witting, P.K., Pettersson, K., Letters, J. and Stocker, R. (2000) Anti-atherogenic effect of coenzyme Q10 in apolipoprotein E gene knockout mice. *Free Radic Biol Med*, **29**, 295-305.
- Wong, A., Yang, J., Cavadini, P., Gellera, C., Lonnerdal, B., Taroni, F. and Cortopassi, G. (1999) The Friedreich's ataxia mutation confers cellular sensitivity to oxidant stress which is rescued by chelators of iron and calcium and inhibitors of apoptosis. *Hum Mol Genet*, **8**, 425-430.
- Woods, C.G. and Taylor, A.M. (1992) Ataxia telangiectasia in the British Isles: the clinical and laboratory features of 70 affected individuals. *Q J Med*, **82**, 169-179.
- Xiao, Y. and Weaver, D.T. (1997) Conditional gene targeted deletion by Cre recombinase demonstrates the requirement for the double-strand break repair Mre11 protein in murine embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*, **25**, 2985-2991.

- Yabe, I., Matsushima, M., Soma, H., Basri, R. and Sasaki, H. (2007) Usefulness of the Scale for Assessment and Rating of Ataxia (SARA). *J Neurol Sci*.
- Yamamoto, Y., Hiraoka, K., Araki, M., Nagano, S., Shimazaki, H., Takiyama, Y. and Sakoda, S. (2005) Novel compound heterozygous mutations in sarsin-related ataxia. *J Neurol Sci*, **239**, 101-104.
- Yang, Y., Turner, R.S. and Gaut, J.R. (1998) The chaperone BiP/GRP78 binds to amyloid precursor protein and decreases Abeta40 and Abeta42 secretion. *J Biol Chem*, **273**, 25552-25555.
- Yokota, T., Igarashi, K., Uchihara, T., Jishage, K., Tomita, H., Inaba, A., Li, Y., Arita, M., Suzuki, H., Mizusawa, H. and Arai, H. (2001) Delayed-onset ataxia in mice lacking alpha-tocopherol transfer protein: model for neuronal degeneration caused by chronic oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 15185-15190.
- Yokota, T., Shiojiri, T., Gotoda, T., Arita, M., Arai, H., Ohga, T., Kanda, T., Suzuki, J., Imai, T., Matsumoto, H., Harino, S., Kiyosawa, M., Mizusawa, H. and Inoue, K. (1997) Friedreich-like ataxia with retinitis pigmentosa caused by the His101Gln mutation of the alpha-tocopherol transfer protein gene. *Ann Neurol*, **41**, 826-832.
- Yoon, T. and Cowan, J.A. (2003) Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins. *J Am Chem Soc*, **125**, 6078-6084.
- Yu, S., Pritchard, M., Kremer, E., Lynch, M., Nancarrow, J., Baker, E., Holman, K., Mulley, J., Warren, S., Schlessinger, D. and Et, A. (1991) Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science*, **252**, 1179-1181.
- Zeviani, M., Muntoni, F., Savarese, N., Serra, G., Tiranti, V., Carrara, F., Mariotti, C. and DiDonato, S. (1993) A MERRF/MELAS overlap syndrome with a new point mutation in the mitochondrial DNA tRNALys gene. *Eur J Hum Genet*, **1**, 80-87.
- Zhang, K. and Kaufman, R.J. (2004) Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **279**, 25935-25938.
- Zhang, Q., Bethmann, C., Worth, N.F., Davies, J.D., Wasner, C., Feuer, A., Ragnauth, C.D., Yi, Q., Mellad, J.A., Warren, D.T., Wheeler, M.A., Ellis, J.A., Skepper, J.N., Vorgerd, M., Schlotter-Weigel, B., Weissberg, P.L., Roberts, R.G., Wehnert, M. and Shanahan, C.M. (2007a) Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity. *Hum Mol Genet*, **16**, 2816-2833.
- Zhang, X., Xu, R., Zhu, B., Yang, X., Ding, X., Duan, S., Xu, T., Zhuang, Y. and Han, M. (2007b) Syne-1 and Syne-2 play crucial roles in myonuclear anchorage and motor neuron innervation. *Development*, **134**, 901-908.
- Zhao, L., Longo-Guess, C., Harris, B.S., Lee, J.W. and Ackerman, S.L. (2005) Protein accumulation and neurodegeneration in the woozy mutant mouse is caused by disruption of SIL1, a cochaperone of BiP. *Nat Genet*, **37**, 974-979.
- Zimmer, C., Gosztanyi, G., Cervos-Navarro, J., von Moers, A. and Schroder, J.M. (1992) Neuropathy with lysosomal changes in Marinesco-Sjogren syndrome: fine structural findings in skeletal muscle and conjunctiva. *Neuropediatrics*, **23**, 329-335.
- Zoccolella, S., Torraco, A., Amati, A., Lamberti, P., Serlenga, L., Papa, S. and Petruzzella, V. (2006) Unusual clinical presentation of a patient carrying a novel single 1.8 kb deletion of mitochondrial DNA. *Funct Neurol*, **21**, 39-41.
- Zouari, M., Feki, M., Ben Hamida, C., Larnaout, A., Turki, I., Belal, S., Mebazaa, A., Ben Hamida, M. and Hentati, F. (1998) Electrophysiology and nerve biopsy: comparative study in Friedreich's ataxia and Friedreich's ataxia phenotype with vitamin E deficiency. *Neuromuscul Disord*, **8**, 416-425.
- Zuchner, S., De Jonghe, P., Jordanova, A., Claeys, K.G., Guergueltcheva, V., Cherninkova, S., Hamilton, S.R., Van Stavern, G., Krajewski, K.M., Stajich, J., Tournev, I., Verhoeven, K., Langerhorst, C.T., de Visser, M., Baas, F., Bird, T., Timmerman, V., Shy, M. and Vance, J.M. (2006) Axonal neuropathy with optic atrophy is caused by mutations in mitofusin 2. *Ann Neurol*, **59**, 276-281.
- Zuchner, S., Mersyanova, I.V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E.L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., Parman, Y., Evgrafov, O., Jonghe, P.D., Takahashi, Y.,

Tsuji, S., Pericak-Vance, M.A., Quattrone, A., Battaloglu, E., Polyakov, A.V., Timmerman, V., Schroder, J.M. and Vance, J.M. (2004) Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet*, **36**, 449-451.

## Résumé

Les ataxies héréditaires constituent un groupe hétérogène de pathologies neurodégénératives caractérisées par des anomalies de coordination des mouvements associées à des troubles de l'équilibre et de la marche. Plusieurs gènes ont été impliqués dans ces pathologies et les corrélations génotype-phénotype ont permis une meilleure caractérisation des différentes entités incluant une ataxie. Par une stratégie de clonage positionnel, et plus précisément de cartographie par homozygotie, ce travail de thèse a permis l'identification des gènes responsables de deux ataxies autosomiques récessives : le syndrome de Marinesco-Sjögren et une nouvelle forme d'ataxie associée à un déficit en coenzyme Q<sub>10</sub>.

Le syndrome de Marinesco-Sjögren (MS) est une affection congénitale caractérisée par l'association d'une ataxie cérébelleuse, d'une cataracte bilatérale, d'un retard psychomoteur modéré, d'une myopathie, d'un retard de croissance staturo-pondérale et d'un hypogonadisme. Le diagnostic différentiel principal du syndrome de Marinesco-Sjögren est le syndrome CCFDN (Cataracte Congénitale, Dymorphie Faciale, Neuropathie). L'étude moléculaire de deux familles nous a permis de distinguer clairement ces deux syndromes dont les spectres cliniques se chevauchent, et de proposer des critères de diagnostic du syndrome de Marinesco-Sjögren. Dans un second temps, nous avons localisé le gène responsable du syndrome de MS en 5q31, puis une collaboration avec le Pr Lehesjoki a permis l'identification de mutations dans le gène *SILI*. Ce gène code pour un facteur d'échange nucléotidique pour HSPA5, un membre de la famille des protéines chaperonnes HSP70. Ces résultats suggèrent qu'une anomalie d'interaction entre SIL1 et HSPA5 responsable d'un déficit des processus de repliements protéiques est un événement majeur dans la physiopathologie du syndrome de MS.

Dans un second temps, nous avons localisé un nouveau gène d'ataxie autosomique récessive en 1q41q42, puis nous avons identifié des mutations dans *ADCK3* chez des patients présentant une ataxie cérébelleuse débutant dans l'enfance, parfois associée à une intolérance à l'exercice et une élévation modérée des lactates. Les homologues d'*ADCK3* chez *E. coli* et *S. cerevisiae* (respectivement *ubiB* et *abc1/coq8*) sont impliqués dans la biosynthèse du coenzyme Q<sub>10</sub>. Nous avons retrouvé un déficit majeur du CoQ<sub>10</sub> dans la biopsie musculaire d'un des patients et un déficit modéré dans les fibroblastes de 3 des 4 patients testés. Les mutations du gène *ADCK3* sont donc responsables d'une ataxie associée à un déficit en coenzyme Q<sub>10</sub>. Par comparaison de séquences nous avons identifié les homologues procaryotes et eucaryotes d'*ADCK3* qui constituent une famille de protéines représentée par 1 gène chez *E. Coli*, 3 chez *S. cerevisiae* et 5 paralogues chez l'homme (*ADCK1* à *ADCK5*). Tous les membres de cette famille présentent des similarités avec les motifs retrouvés dans le « noyau universel » des kinases (motifs I, II, VIb et VII) et nécessaires à la fixation de l'ATP et à la réaction de phospho-transfert. L'analyse phylogénétique de la famille et l'absence des motifs classiquement présents en C-terminal des protéines kinases (motifs VIII à XI), nous a permis de proposer que les protéines ADCKs appartiennent à la super-famille des « kinases atypiques ». Les études futures seront ciblées sur l'analyse de la fonction kinase de ces protéines et tenteront d'identifier leur(s) substrat(s). Enfin l'identification de mutations d'*ADCK3* dans une nouvelle forme d'ataxie autosomique récessive permet de souligner l'implication d'un déficit en coenzyme Q<sub>10</sub> dans la physiopathologie de cette ataxie, et implique des orientations thérapeutiques avec en particulier la possibilité de proposer un traitement substitutif en Coenzyme Q<sub>10</sub>.

**Mots clés :** Ataxies héréditaires, Syndrome de Marinesco-Sjögren, gène *SILI*, chaperones moléculaires, Coenzyme Q, gène *ADCK3*, mitochondrie, clonage positionnel, cartographie par homozygotie.