

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

CNRS - INSERM - Université de Strasbourg

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline: Sciences du vivant

Recherche clinique et innovation technologique

Par

Dorra H'MIDA-BEN BRAHIM

**Diagnostic moléculaire par cartographie
par homozygotie des ataxies autosomiques récessives et
recherche du gène impliqué dans une nouvelle forme
d'ataxie récessive non progressive**

Soutenue publiquement le 14 Octobre 2009 devant la commission d'examen :

Mr Le Professeur Michel Koenig	Directeur de Thèse
Mme Le Professeur Pascale De Lonlay	Rapporteur externe
Mr Le Docteur Cyril Goizet	Rapporteur externe
Mme Le Professeur Christine Tranchant	Rapporteur interne
Mr Le Professeur Ali Saad	Membre invité

Je remercie les professeurs *Christine Tranchant*, *Pascale de Lonlay* et *Cyril Goizet* qui m'ont fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse.

J'exprime toute ma gratitude au professeur *Michel Koenig* de m'avoir accepté dans son équipe, pour l'accueil chaleureux qu'il m'a offert moi et mon époux lors de notre arrivée à Strasbourg. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour tout ce qu'il m'a appris, pour sa patience pendant les longues explications devant les haplotypes, l'interprétation des profils de microsatellites et les répétitions de présentations orales en anglais. Je le remercie de m'avoir initié à la recherche, de m'avoir donné la chance et l'opportunité de faire une thèse es-science, et de m'avoir guidé pendant ces 4 années malgré les interruptions multiples pendant la dernière année. Merci pour les journées au diag et les explications des résultats de Steinert et de FRDA. Merci d'avoir fait preuve d'humanité et de compréhension en particulier pendant ma grossesse et mes allers-retours en Tunisie.

J'exprime toute ma reconnaissance au professeur *Ali Sâad* pour son soutien permanent. Je le remercie de m'avoir permis d'allier mon activité hospitalo-universitaire à ce travail de thèse. Merci pour les encouragements et les nombreux conseils sur mon orientation professionnelle, m'incitant à aller découvrir d'autres horizons scientifiques.

Je remercie le professeur *Jean-Louis Mandel*, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail de thèse, pour les discussions constructives qu'on a pu avoir sur HapMap et les effets fondateurs. Merci de m'avoir fait découvrir HapMap et pour tous les conseils sur son utilisation. Alors si vous lisez ces remerciements, « j'attends toujours le kilo de chocolat » !

Un grand merci à toute l'équipe des puces (Samira, Serge...) et spécifiquement *Christelle Thibault* pour sa disponibilité, son enthousiasme et ses encouragements et à *Bondo Monga* alias *Ben* pour l'interprétation des puces 6.0. Merci à *Ingrid* pour les centaines de plaques de séquences et microsatellites, qui passaient toujours en priorité.

Je tiens à remercier l'association *connaitre les syndromes cérébelleux (CSC)*, l'*IGBMC* et le ministère Tunisien de la santé publique d'avoir financé mon travail de thèse.

Je remercie chaleureusement *Nathalie Drouot* ma voisine de paillasse, pour son aide inestimable durant toute ma thèse, pour son enthousiasme, sa patience et sa bonne humeur. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour tout le travail de séquençage et de culture

cellulaire qu'elle a pu faire pendant mon absence. Je la remercie de m'avoir toujours tenue au courant par email de l'avancement des manipes, comme si je n'avais jamais quitté le labo. Merci à *Mirna Assoum* pour ses encouragements, pour son esprit d'équipe et pour les bons petits plats libanais qu'elle nous ramenait. Merci à Clotilde de m'avoir permis de suivre avec elle la manipe « puce », et d'avoir été patiente devant tous mes questionnements à propos des puces SNP. Enfin, merci à Mathieu qui rythmait nos semaines par ses visites du Mercredi.

Je tiens à remercier *Moez* qui en me précédant dans la collaboration avec le Professeur Michel Koenig m'a permis d'intégrer cette équipe. Je le remercie pour ses encouragements tout au long de la thèse et surtout pendant les dernières semaines de rédaction en Tunisie.

Je remercie tous nos collaborateurs cliniciens et généticiens, pour l'aide qu'ils ont apportés dans le séquençage et l'envoi d'ADN et des biopsies de peau.

Merci à *mims* pour sa bonne humeur et les envoies de plasmide Xfra en Tunisie.

Merci à toute l'équipe Friedreich, en particulier *Laurence* et *Marie* pour la culture cellulaire et *Alain* pour le fractionnement mitochondrial. Merci à *Hélène Puccio* pour tous ses conseils et son enthousiasme surtout lors de la « fausse » découverte de mutation dans CDK5RAP1.

Je remercie tous mes collègues de l'équipe de génétique Humaine, ceux qui sont partis : *Gretta*, *Anne Sophie*, *Aline*, *Myriam*, *Sabine* et particulièrement *Anna* pour ses encouragements, son hospitalité et son soutien pendant les moments difficiles.

Je voudrais remercier particulièrement *Nadège Calmels* pour son aide au diag, toujours avec le sourire.

Merci à tous ceux qui sont là et en particulier à *Cricri*, *Fabrice*, *Yvon*, *Soumya*, *Fred* et *Alain* pour leur bonne humeur. Merci à tous ceux qui m'ont croisé dans les couloirs du 3^{ème} Nord avec le sourire : *Chantal*, *Aurélien*, *Karine*, *Agatti*, *Murugan*, *Hervé*, *Eric* « notre photographe », *Anne Schneider*, *Anne Toussaint*, *Nadège*, *Thibault*, *Johann*, *Valérie*, *Jocelyn*, *André*, *Thomas*, *Solange* et *Stan*...

Merci aux services communs de l'IGBMC (culture cellulaire, séquençage, puce et service informatique) pour leur aide précieuse.

Merci à toute l'équipe du diag de l'hôpital civil de m'avoir accueillie tous les jeudis. Merci à *Faby* et *Simonne* de m'avoir reçue toujours avec le sourire dans leur bureau. Merci à *Valérie*

Biancalana et Claire Gasnier pour la synthèse de sonde XFra. Merci à *Elisabeth* de m'avoir initié au southern blot chémiluminescent.

Merci à toute l'équipe du laboratoire de cytogénétique, de génétique moléculaire et de biologie de la reproduction en Tunisie pour leur soutien et leurs encouragements. Merci *Soumaya, Sihem, Labiba, Moufida et Mouna*.

Un grand merci pour leur amitié à :

Karim « mon compatriote », pour sa disponibilité sans limites, pour les longues discussions qu'on a pu. Merci de m'avoir accompagné dans la découverte des resto de Strasbourg. A bientôt en Tunisie j'espère.

Marie-Cécile et Sébastien pour leur soutien et disponibilité. Leur présence à Strasbourg et maintenant à Colmar m'a été d'un grand réconfort. Je vous remercie pour votre amitié sincère.

Soraya et ses enfants « Elyes et Gaissa » pour leur amitié. Merci Soraya pour ta disponibilité pour les allers-retours à l'aéroport d'Entzheim avec mes tonnes de bagages.

Lama, pour tout ce qu'elle m'a appris, pour son aide dans les démarches administratives pendant mon absence. Merci « loulou » pour cette amitié que j'espère éternelle et bon courage pour ta soutenance de thèse.

Patricia pour ton amitié, ton humanité, et tes encouragements pendant ma grossesse et surtout après mon retour à Strasbourg après l'accouchement. Je sais que je peux compter sur toi.

Nadia Mama d'être toujours là. Merci pour ton soutien et tes encouragements forts précieux.

Dalinda Naguess, Héléna-Maria-Rosa, Christine Ayoub, Meriam Chendeb,....

Je voudrais enfin remercier toute ma famille : Ma chère maman pour sa présence toujours à mes cotés quelques soient mes choix.

Merci à mon cher mari pour son soutien et sa patience

Merci à mes beaux parents pour avoir veillé sur mon fils pendant mes longs mois d'absence.

Je remercie mes deux sœurs et leurs époux, mon petit frère et sa femme, mon beau frère et ma belle sœur pour leurs encouragements.

Merci à tous ceux que j'ai oublié....

Table des matières

Table des matières

Introduction	p.21
I- Caractéristiques cliniques et génétiques des ataxies autosomiques récessives dégénératives	p.24
A- L'ataxie de Friedreich	p.29
B- Signes biologiques d'orientation diagnostique	p.30
1- AVED	p.30
2- Abétalipoprotéinémie	p.30
3- La xanthomatose cérébrotendineuse	p.31
4- La maladie du Refsum	p.31
5- ARCA2	p.33
6- AOA2	p.33
C- Signes cliniques d'orientation diagnostique	p.34
1- Les ataxies spastiques	p.34
a- ARSACS	p.34
2- Les télangectasies	p.36
a- L'ataxie télangectasie	p.36
b- ATLD	p.37
3- Ophtalmoparésie- ophtalmoplégie	p.38
a- SANDO	p.38
b- IOSCA	p.38
4- L'apraxie oculomotrice	p.39
a- AOA1	p.39

b- SCAN1	p.40
D- Les ataxies cérébelleuses pures	p.40
1- ARCA1	p.40
E- Les Loci d'ataxie récessive	p.42
1- SCAR6	p.42
2- PHARC ou Refsum Like	p.43
II- Quelques notions de génétique des populations	p.47
A- La dérive génétique	p.47
B- La consanguinité	p.48
C- La notion d'isolat génétique	p.48
D- L'effet fondateur	p.49
E- Exemples d'effet fondateurs dans les ataxies autosomiques récessives	p.50
1- ARSACS	p.50
2- ATM	p.51
3- AVED	p.52
4- FRDA	p.52
5- IOSCA	p.52
6- AOA1	p.53
7- ABL	p.53
III- Les α/β hydrolases	p.57
A- Définition	p.57
B- Structure	p. 57
C- Localisation subcellulaire	p.58

D- les membres de la superfamille des α/β hydrolases et leurs Implications dans les pathologies humaines	p.58
1- ABHD1	p.58
2- ABHD2	p.61
3- ABHD3	p.61
4- ABHD4	p.61
5- ABHD5	p.61
6- ABHD6	p.61
7- ABHD7	p.62
8- ABHD8	p.62
9- ABDH9	p.62
10- ABHD10	p.63
11- ABHD11	p.63
12- ABHD12	p.63
13- ABHD12B	p.63
14- ABHD13	p.64
15- ABHD14	p.64
E- ABHD12	p.65
1- Localisation chromosomique et structure nucléotidique	p.65
2- Localisation subcellulaire de la protéine	p.65
3- Homologies	p.65
4- Alignement multiple de la séquence d'ABHD12 avec les membres de la sous familles des α/β hydrolases	p.65
5- Fonction	p.66
F- Le 2-arachidonoylglycerol	p.66

1- Les endocannabinoïdes	p.66
2- Le 2-arachidonoylglycerol	p.70
a- Sites de synthèse et de dégradation	p.70
b- Fonction	p.70
3- Les récepteurs aux endocannabinoïdes	p.71
4- La physiologie cellulaire	p.71
5- Implication de la voie du 2AG dans la neuro-dégénérescence	p.71
IV-Stratégie d'identification des gènes	p.74
A- Le clonage fonctionnel	p.74
B- Le clonage positionnel et la cartographie par homozygotie	p.74
1- Le clonage positionnel	p.74
2- La cartographie par homozygotie	p.76
3- Identification des régions d'homozygotie	p.77
a- Les SNP	p.77
b- Spécificité de la puce 6.0	p.78
c- Identification et analyse des régions homozygotes	p.84
4- Confirmation de l'homozygotie et réduction de la taille de la région homozygote retenue	p.84
a- Les microsatellites	p.85
5- Identification des gènes candidats	p.86
a- Les critères de sélection de gène candidat	p.87
V- Séquençage	p.90
A- Séquençage directe	p.90

B-	Analyse de profils anormaux détectés par HRM	p.90
VI-	La fusion haute résolution	p.91
A-	Principe	p.92
B-	Protocole	p.95
C-	Applications	p.95
1-	Criblage à haut débit des mutations	p.95
2-	Analyse de marqueurs microsatellites et de SNP	p.96
3-	Analyse du degré de méthylation des gènes soumis à l’empreinte	p.96
4-	Analyse simultanées de 2 mutations	p.97
D-	Paramètres expérimentaux importants	p.97
1-	Qualité de l’ADN et de l’amplicon	p.97
2-	Température	p.98
3-	Produits contaminants	p.98
4-	Domaines de dénaturation	p.98
5-	La mutation	p.99
VII-	Le projet HapMap : « Les buts du projet HapMap »	p.100
A-	Créer une base de données publique	p.100
B-	Génotypage des SNP commun	p.101

C- Détermination des « tag SNP »	p.101
D- Permettre le développement de technologies de génotypage, d'outils d'analyse, de conceptions d'études cliniques et de guide éthique	p.101
Résultats	p.105
I- Validation de la stratégie de cartographie par homozygotie utilisant les puces SNP	p.107
A- Identification de 10 mutations chez 11 familles homozygotes dans des régions comprenant 1 gène d'ataxie récessive	p.107
1- Famille 10	p.111
2- Famille 1	p.111
3- Familles diagnostiquées ARSACS	p.112
4- Familles 7 et 8	p.114
5- Famille 9	p.114
6- Famille 11	p.114
B- Les gènes exclus de l'analyse	p.115
C- Seuil de détection des régions homozygotes	p.115
II- Le gène ABHD12 est muté dans une nouvelle forme d'ataxie récessive	p.137
A- Identification d'un nouveau locus d'ataxie récessive en 20p11.23-q13.12	p.137
1- Génotypage à l'aide de puces SNP	p.137
2- Confirmation de la liaison par les marqueurs microsatellites	p.139
B- Recherche de gènes candidats positionnels	p.139

1- Le gène CDK5RAPL1	p.146
2- Le gène XRN2	p.148
3- Le séquençage des 25 autres gènes candidats	p.148
C- Recrutement de nouvelles familles consanguines	p.150
D- Génotypage par puces SNP 6.0	p.150
1- Effet fondateur ou haplotype ancestral fréquent ?	p.151
2- Le gène CDK5RAP1	p.153
E- Identification de 2 mutations dans le gène ABHD12	p.154

Discussion et perspectives p.162

I- Pertinence de la Classification clinico-biologique p.163

II- Stratégie de clonage positionnel et diagnostic par cartographie
par homozygotie p.164

A- Limites de la stratégie de clonage positionnel p.164

B- Nous avons également utilisé la stratégie de cartographie par homozygotie
comme méthode d'aide au diagnostic d'ataxies récessives connues p.165

III- Les patients avec mutations du gène ABHD12 définissent une nouvelle
entité clinique p.166

IV- PHARC et SCAR6 : deux entités différentes p.167

V- La famille Alg 128 : ABHD12 ou SCAR6 p.168

VI- ABHD12/ ABHD5 p.169

VII- Implication des endocannabinoïdes dans la neuro-dégénérescence et la neuro-inflammation	p.170
A- Implication de la neuro-inflammation dans la neuro-dégénérescence	p.171
B- Implication de la neuro-dégénérescence dans la neuro-inflammation	p.171
C- Implication des EC dans la neuro-dégénérescence : une nouvelle voie de signalisation impliquée dans les ataxies récessives	p.171

Références bibliographiques	p.175
------------------------------------	-------

Liste des figures

Figure 1	Colocalisation chromosomique des 2 loci SCAR6 et PHARC	p.46
Figure 2	Arbre généalogique de la grande famille Norvégienne liée au locus SCAR6	p.46
Figure 3	Schéma illustrant la notion d'effet fondateur dans le cadre d'une maladie autosomique récessive	p.54
Figure 4	Cartographie par homozygotie et effet fondateur	p.54
Figure 5	Diagramme de la structure secondaire canonique du repliement des α/β hydrolases	p.59
Figure 6	Alignement multiple du site nucléophile des 15 membres de la superfamille des α/β hydrolases humaines	p.60
Figure 7	Arbre phylogénétique des α/β hydrolases humaines	p.60
Figure 8	Représentation de l'orientation cellulaire des 3 principales 2AG hydrolases (MAGL, ABHD6 et ABHD12)	p.68
Figure 9	Les localisations subcellulaires possibles des 2 Acyl-Glycérol hydrolases	p.68
Figure 10	Structures du 2-Arachidonoylglycerol et ses produits d'hydrolyse : Réaction catalysée par ABHD12	p.69
Figure 11	le 2AG substrat de plusieurs enzymes	p.73
Figure 12	Les différentes stratégies du clonage de gène	p.79
Figure 13	Principe de la cartographie par homozygotie	p.80
Figure 14	Etapes expérimentales de l'étude pangénome par puces de génotypage Affymetrix	p.81

Figure 15	Comparaison des deux technologies utilisées pour l'étude pangéome	p.83
Figure 16	Succès comparé des différentes approches pour cloner un gène impliqué dans une maladie génétique chez l'Homme	p.88
Figure 17	Principe de l'émission de fluorescence du LC Green	p.93
Figure 18	Mécanisme de formation des homo et hétéroduplexes	p.93
Figure 19	Les différents types de profils HRM	p.94
Figure 20	Les étapes du projet HapMap	p.104
Figure 21	Arbre généalogique de la famille 1	p.113
Figure 22	Arbres généalogiques des 5 familles liées au locus 20p12-q21	p.138
Figure 23	Diagramme HomoSNP des résultats de génotypage SNP des 5 familles Algériennes	p.138
Figure 24	Analyse par marqueurs microsatellites des 5 familles liées au locus SCAR6	p.140
Figure 24a	Génotype des individus de la famille Alg128	p.141
Figure 24b	Génotype des individus disponibles de la famille Alg 139	p.142
Figure 24c	Génotype des individus disponibles de la famille Alg 96	p.143
Figure 24d	Génotype de l'individu atteint de la famille Alg 142	p.144
Figure 24e	Génotype des individus disponibles de la famille Alg 28	p.145
Figure 25	Réaction de méthyl-thiolation catalysée par CDK5RAP1	p.147
Figure 26	Résultats de l'analyse en HRM de 312 chromosomes contrôles pour la mutation H470P du gène CDK5RAPL1	p.149
Figure 27	Analyse du gène XRN2 par HRM	p.149
Figure 28	Origine géographique des 5 familles Alg 128, 142, 96, 139 et 28 du nord-est et précisement de la région de Sétif	p.152

Figure 29	Zones d'homozygotie détectées par les puces SNP 6.0, superposées aux résultats des puces 10 et 50K générés par HomoSNP	p.156
Figure 30	La reconstruction de l'haplotype en bases nucléotidiques et les 6 gènes compris dans les 989 Kb	p.157
Figure 31	Confirmation de l'homozygotie chez la famille émiratie G21 par analyses des marqueurs microsatellites	p.158
Figure 32	Résultats de la réaction PCR de l'exon 1 du gène ABHD12	p.159
Figure 33	Résultats de la réaction PCR longue couvrant la délétion de plus de 13Kb qui englobe l'exon 1 du gène ABHD12	p.159
Figure 34	Résultats du séquençage du gène ABHD12	p.160
Figure 35	Equilibre entre neuro-dégénérescence et neuro-inflammation	p.174
Figure 36	Prédiction des domaines d'ABHD12	p.174

Liste des tableaux

Tableau 1	Classification des ataxies autosomiques récessives dégénératives proposée par Koenig (2003)	p.26
Tableau 2	Classification des ataxies autosomiques récessives dégénératives proposée par Lagier-Tourenne (2008)	p.27
Tableau 3	Les signes cliniques et biologiques d'orientation diagnostique des différentes formes d'ataxies récessives dégénératives	p.28
Tableau 4	Nomenclature et caractéristiques cliniques des loci d'ataxies récessives	p.45
Tableau 5	Caractéristiques des différentes puces de genotypage utilisées dans ce travail ainsi qu'une comparaison avec le tour du génome utilisant des marqueurs microsatellites	p.82
Tableau 6	Classification des gènes candidats selon la fonction de leur protéine	p.89
Tableau 7	Origine géographique des familles analysées par puce 10 et 50K	p.110
Tableau 8	le code couleur attribué aux régions homozygotes sur les puces 1à et 50K selon le nombre de SNP homozygotes successifs	p.110
Tableau 9	Le nombre de familles par gène connu	p.115
Tableau 10	Critères de sélection des 27 gènes candidats positionnels séquencés	p.147
Tableau 11	Caractéristiques cliniques des patients porteurs de la mutation dans le gène ABHD12	p.161

Liste des abréviations

2AG	2-arachidonic glycérol
ABHD	Alpha/beta hydrolase
ABL	Abetalipoprotéinémie
ADNmt	ADN mitochondrial
AEA	Arachidonyl-ethanolamide
AOA1	Ataxie avec apraxie oculomotrice de type 1
AOA2	Ataxie avec apraxie oculomotrice de type 2
ARCA	Ataxie cérébelleuse autosomique récessive
ARCA1	Ataxie cérébelleuse autosomique récessive de type 1
ARCA2	Ataxie cérébelleuse autosomique récessive de type 2
ARSACS	Ataxie spastique autosomique récessive du Charlevoix-Saguenay
AT	Ataxie téléangiectasie
ATLD	Ataxia téléangiectasia-like disorder
AVED	Ataxie avec déficit en vitamine E
CABD	Ataxie avec cécité et surdité
CB1	Récepteur aux cannabinoïdes 1
CB2	Récepteur aux cannabinoïdes 2
CEPH	Centre d'Etude des Polymorphismes Humains
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CNG	Centre national de génotypage
CNV	Copy number variation
Cox2	COX Cytochrome c oxydase
CTX	Xanthomatose cérébrotendineuse
EC	Encocannabinoïdes
EEG	Electroencephalogramme
EMG	Electromyogramme
FAAH	Fatty Acid Amide Hydrolase
FRDA	Ataxie de Friedreich
GDAS	GeneChip DNA Analysis Software
GTYPE	GeneChip Genotyping Analysis Software
HRM	High resolution melting
IOSCA	Ataxie spino-cérébelleuse de début infantile
IRM	Imagerie par résonance magnétique
KO	knock out
MAGL	monoacyl glycérol
MIRAS	ataxie mitochondriale récessive
PCR	Polymerase chain reaction
POLG	Polymérase gamma
RRF	Ragged-red fibers: Fibres rouges déchiquetées
PEO	Ophthalmoplégie progressive externe

PGE	Prostaglandines Glycerol Ester
PHARC	Polyneuropathy, Hearing loss, Ataxia, Retinitis pigmentosa and Cataract
RD	Maladie de Refsum
SANDO	Neuropathie sensitive ataxiante avec dysarthrie et ophtalmoparésie
SARA	Scale for the Assessment and Rating of Ataxia
SCAN1	Ataxie cérébelleuse avec neuropathie de type 1
SCAR6	Spino-cerebellar ataxia 6
SLA	Sclérose latérale amyotrophique
SNC	Système nerveux central
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms
SPECT	TDM computerisée à émission de photons
TDM	Tomodensitométrie
TP-PCR	Triplet primed PCR
TTPA	Protéine de transfert de l' α -tocopherol
UBL	Ubiquitine like
VitE	Vitamine E
VLDL	Very low density lipoprotein

Introduction

Introduction :

Le diagnostic des pathologies héréditaires rares devient de plus en plus difficile à cause de leur origine multigénique. Cette multigénicité est très bien illustrée par les ataxies autosomiques récessives. A ce jour 14 gènes responsables d'ataxies autosomiques récessives ainsi que plusieurs loci ont été identifiés. Cependant plusieurs gènes restent à découvrir.

L'ataxie est un symptôme qui se définit par une incoordination du mouvement sous-tendue par une atteinte neurologique. Ce trouble du mouvement peut être aussi bien acquis que héréditaire. Selon leur mode de transmission les ataxies héréditaires sont autosomiques dominantes ou récessives, gonosomiques liées à l'X ou mitochondriales. Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés exclusivement aux ataxies héréditaires et plus spécifiquement aux ataxies autosomiques récessives dégénératives qui font partie des maladies rares et constituent à elles seules un groupe très hétérogène de pathologies neurodégénératives.

Je détaillerai seulement les ataxies autosomiques récessives dégénératives. Je décrirai brièvement dans un premier chapitre les caractéristiques de ces ataxies. Plusieurs classifications ont été proposées se basant sur le mode de transmission, le site principal de neuro-dégénérescence, la symptomatologie clinique ou la fonction du gène muté. Dans ce manuscrit, j'ai choisi une classification qui reflète la réalité clinique du praticien devant un patient qui présente une ataxie autosomique récessive. En effet j'ai essayé de classer les ataxies selon le signe clinique et/ou biologique d'orientation diagnostique.

Mon travail de thèse a consisté à identifier un nouveau gène d'ataxie récessive à partir de l'étude de 4 familles Algériennes et une famille des Emirats Arabes Unis. J'ai ainsi pu identifier 2 mutations dans le gène codant pour l' α/β hydrolase 12 (ABHD12). Je décrirai donc dans un second chapitre les membres de la famille des α/β hydrolases. Je parlerai plus spécifiquement de l' α/β hydrolase 12 (ABHD12) et de son substrat le 2-arachidonic-glycérol (2AG).

L'identification de ce nouveau gène d'ataxie récessive a été réalisée par une approche de clonage positionnel et plus précisément par cartographie par homozygotie. Le principe de cette approche ainsi que les techniques utilisées seront présentées. Au cours de l'identification

de ce gène nous avons utilisé des données du projet HapMap ainsi que la notion d'effet fondateur. Ces deux thèmes seront donc aussi abordés.

Enfin, les résultats issus de ce travail seront décrits et discutés dans les chapitres résultats et discussion.

I- Caractéristiques cliniques et génétiques des ataxies autosomiques récessives dégénératives :

Les ataxies autosomiques récessives (ARCA) appartiennent au groupe d'ataxies héréditaires. Il s'agit d'un désordre neurologique caractérisé par : une dégénérescence ou un développement anormal du cervelet et/ou de la moelle épinière une transmission héréditaire selon le mode autosomique récessif. Selon leur mode de transmission ces ataxies sont soit congénitales avec un début dès la naissance qui se manifeste par une hypotonie néonatale, soit dégénératives avec un âge de début variable et une aggravation progressive des symptômes. Les ataxies dégénératives sont caractérisées dans la plupart des cas par un âge précoce de début de la maladie, avant 20 ans. Ce groupe comprend un grand nombre de pathologies, la plus fréquente étant l'ataxie de Friedreich.

Différents critères sont utilisés pour classer ces ARCA, de ces critères découlent plusieurs classifications qui restent cependant controversées.

Ces classifications se basent sur le mode de transmission, le site principal de neuro-dégénérescence, la symptomatologie clinique ou la fonction du gène muté. En 1983, Harding a proposé une classification clinico-génétique de toutes les ataxies héréditaires selon leur mode de transmission et le signe clinique les caractérisant (Harding, 1983). La classification de Koenig (Koenig, 2003) présentée dans le tableau 1 se base sur le site de neuro-dégénérescence, elle présente les ataxies comme suit : les ataxies cérébelleuses pures, les ataxies sensitives et spino-cérébelleuses, les ataxies cérébelleuses avec neuropathie sensitivomotrice. Cliniquement cette différenciation n'est pas évidente, en effet une ataxie cérébelleuse est difficilement distinguable d'une ataxie spino-cérébelleuse. Lagier-Tourenne et al. 2008 (identification des gènes responsables du syndrome de Marinosco-Sjogren et d'une forme d'ataxie avec Déficit en Coenzyme Q10 ; Strasbourg, université Louis Pasteur) a proposé une classification basée sur le mécanisme physio-pathologique (Tableau 2).

Dans ce manuscrit, les différentes ataxies récessives dégénératives seront classées selon leur signes cliniques et ou biologique d'orientation diagnostique. Bien que ces signes ne soient pas pathognomoniques, ils sont d'un grand secours au clinicien et/ou généticien pour orienter la recherche de mutation et établir un diagnostic génétique (Tableau 3).

Au cours de ce travail de thèse, notre stratégie d'investigation pour tout patient adressé pour ataxie récessive ou sporadique, quelque soit sa présentation clinique, a été d'éliminer en priorité le diagnostic d'ataxie de Friedreich, qui est l'ataxie héréditaire la plus fréquente et dont le test moléculaire est extrêmement simple. A cause de sa fréquence élevée et de sa grande variabilité phénotypique, j'ai choisi dans ce manuscrit de présenter l'ataxie de Friedreich en premier sans la classer dans aucune des rubriques d'orientation clinique. Cette distinction, met l'accent sur la nécessité d'évoquer le diagnostic de FRDA en priorité devant tout malade se présentant pour une ataxie autosomique récessive ou même sporadique.

Tableau 1: Classification des ataxies autosomiques récessives dégénératives proposée par Koenig (2003).

Maladie	Locus	Gène
<u>Ataxie Cérébelleuse pure</u>		
Ataxie télangectasie(AT)	11q22	<i>ATM</i>
Ataxie télangectasie-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>
<u>Ataxie sensitive et spino-cérébelleuse</u>		
Ataxie de Friedreich (FRDA)	9q13	<i>FXN</i>
Ataxie avec déficit en vitamine E (AVED)	8q13	<i>TTPA</i>
Abêtalipoprotéïnémie (ABL)	4q23	<i>MTTP</i>
Ataxie spino-cérébelleuse de début infantile (IOSCA)	10q24	<i>Twinkle</i>
Maladie de Refsum (RD)	10p13	<i>PHYH</i>
<u>Ataxie cérébelleuse et neuropathie sensitivo-motrice</u>		
Ataxie avec apraxie oculomotrice de type 1 (AOA1)	9p13	<i>APTX</i>
Ataxie avec apraxie oculomotrice de type 2 (AOA2)	9q34	<i>SETX</i>
Ataxie spino-cérébelleuse plus neuropathie (SCAN1)	14q31	<i>TDP1</i>

**Tableau 2 : Classification des ataxies autosomiques récessives dégénératives
proposée par Lagier-Tourenne (2008)**

Maladie	Locus	Gène	Protéines
<u>Protéines mitochondriales et Stress oxydant</u>			
FRDA	9q13	<i>FXN</i>	Expansion GAA
AVED	8q13	<i>TTPA</i>	Protéine de transfert de l'α Tocopherol
ABL	4q23	<i>MTTP</i>	Grande sous-unité de la protéine microsomale de transfert des triglycérides
IOSCA	10q24	<i>C10orf2</i>	Twinkle
SANDO	15q26	<i>POLG</i>	Polymérase γ
<u>Protéines nucléaires et réparation de l'ADN</u>			
AT	11q22	<i>ATM</i>	Phosphatidylinositol 3-kinase-type
ATLD	11q21	<i>MRE11</i>	<i>MRE11</i>
AOA1	9p13	<i>APTX</i>	Aprataxine
AOA2	9q34	<i>SETX</i>	Senataxine
SCAN1	14q31	<i>TDP1</i>	Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1
<u>Autres mécanismes moléculaires</u>			
ARSACS	13q12	<i>SACS</i>	sacsine
ARCA1	6q25	<i>SYNE1</i>	Syne-1

Tableau 3: Les signes cliniques et biologiques d'orientation diagnostique des différentes formes d'ataxies récessives dégénératives

Maladie	F R D A	A V E D	A B L	R D	C T X	S A N D O	S C A N 1	A T	A T L D	A O A 1	A O A 2	A R S A C S	I O S C A	A R C A 1	A R C A 2
Signes cliniques d'orientation diagnostique															
Spasticité	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Télangectasies oculaires	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Apraxia oculomotrice	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Ophtalmoplégie	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Striations réiniennes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Signes biologiques d'orientation diagnostique															
VitE ↓	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acides gras solubles ↓	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Albumine ↓	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Lipoprotéine ↓	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Immunité ↓	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Acide phytanique ↑	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Choléstanol ↑	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alcools biliaires ↑	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
αFP ↑	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Cholestérol ↑	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
Acanthocytes	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : signe clinique ou biologique généralement présent et caractéristique, - : signe clinique ou biologique absent, peu retrouvé ou non rapporté dans la littérature, ↑ : augmenté, ↓ = diminué ou absent.

A- L'ataxie de Friedreich

L'ataxie de Friedreich (FRDA, MIM 229300) constitue l'ataxie héréditaire la plus fréquente dans la population caucasienne, sa fréquence est estimée entre 1 :50000 et 1 :30000 (Cossee, et al., 1997; Lopez-Arlandis, et al., 1995). L'âge de début de la maladie se situe habituellement entre 5 et 25 ans. Quelques cas atypiques sont décrits avec un âge de début plus tardif. Le patient se présente le plus souvent avec une ataxie progressive associée à une dysarthrie, des anomalies des mouvements oculaires, une altération de la sensibilité proprioceptive et de la vibration, une aréflexie, un signe de Babinski et un syndrome pyramidal. L'évolution est progressive et se complique le plus souvent d'une cardiomyopathie hypertrophique, d'un diabète, d'une surdité de perception, d'une atrophie optique et de déformations squelettiques. Cette présentation clinique est très variable, et l'absence de certains signes tels que l'aréflexie, l'âge de début inférieur à 25 ans ne doivent en aucun cas faire éliminer le diagnostic.

L'IRM montre une atrophie cérébelleuse modérée, associée à 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).

Le gène responsable de la maladie de Friedreich, *FXN* a été identifié en 1996 dans notre laboratoire, en collaboration avec celui du Pr M. Pandolfo (Campuzano et al., 1996). *FXN* est localisé en 9q13. Une expansion du triplet GAA > à 90 répétitions au niveau du premier intron est retrouvée à l'état homozygote chez plus de 95% des patients. La taille de la plus petite expansion est inversement corrélée à l'âge de début de la maladie et à la sévérité (Durr, et al., 1996; Filla, et al., 1996; Gellera, et al., 1997; Isnard, et al., 1997; Montermini, et al., 1997). *FXN* code pour une protéine, la frataxine, localisée dans la mitochondrie et impliquée dans le métabolisme des centres fer-soufre. Son rôle dans la biosynthèse des centres fer-soufre est actuellement bien établi (Chen, et al., 2002).

B- Signes biologiques d'orientation diagnostique :

1- AVED : (AVED ; MIM 277460)

Cette ataxie a été décrite en 1981 par Burck et al. comme une ataxie très proche de l'ataxie de Friedreich (Burck, et al., 1981). Ce n'est qu'en 1995 que le gène a été identifié par Ben Hamida et al. dans des familles d'origine Tunisienne (Ben Hamida, et al., 1993a). Ce gène localisé en 8q13 code pour la protéine de transfert de l'alpha tocophérol. Le seul signe pathognomonique est la baisse du taux de vitamine E et du RRR-alpha-tocophérol. α -TTP est la seule protéine responsable du transfert de la vitamine E vers les VLDL au niveau du foie, permettant ainsi sa recirculation au niveau sanguin (Traber, et al., 1990).

AVED est caractérisée par une ataxie cérébelleuse et sensitive progressive avec un âge de début inférieur à 20 ans. Le tableau clinique regroupe une ataxie progressive, une aréflexie et un tremblement de la tête inconstant (Benomar, et al., 2002; Cavalier, et al., 1998). D'autres signes sont retrouvés : la dystonie, les troubles de la sensibilité profonde, les fasciculations de la langue et les anomalies squelettiques (Burck, et al., 1981; Martinello, et al., 1998).

L'IRM montre une atrophie cérébelleuse avec ou sans anomalie de la substance blanche périventriculaire. Le diagnostic repose sur le dosage de la vitamine E, qui met en évidence un taux très bas en l'absence de mal absorption des graisses. Le traitement repose sur une supplémentation en VitE qui permet de limiter la progression de la maladie (Gabsi, et al., 2001; Martinello, et al., 1998).

2- Abétalipoprotéinémie (ABL ; MIM 200100)

L'abétalipoprotéinémie ou syndrome de Bassen-Kornzweig est une affection rare (Bassen and Kornzweig, 1950). Elle est liée à une erreur innée du métabolisme des lipoprotéines suite à une anomalie de la protéine microsomale de transfert des triglycérides (Narcisi, et al., 1995; Sharp, et al., 1993). Le gène *MTTP* est localisé en 4q22-q24. Il catalyse le transport des esters de triglycéride (TG) et de cholestérol entre les surfaces lipidiques. Une absence de lipoprotéines entraîne un défaut d'absorption des vitamines liposolubles, responsables de la gravité de l'affection et de ses complications neurologiques (Azizi, et al., 1978; Muller and Lloyd, 1982; Muller, et al., 1977). La présentation clinique inclut un syndrome de malabsorption, une dégénérescence pigmentaire de la rétine et une ataxie progressive. Le

bilan biologique retrouve des taux effondrés du cholestérol et des triglycérides, une absence de lipoprotéines riches en apo E. Le diagnostic est confirmé par la présence de globules rouges déformés : les acanthocytes (Bassen and Kornzweig, 1950).

3- La xanthomatose cérébrotendineuse (CTX, MIM 213700)

CTX est un désordre lié au gène *CYP27* localisé en 2q33-qter. Ce gène code pour une enzyme mitochondriale la stérol 27-hydroxylase, qui fait partie de la voie de synthèse des acides biliaires (Lorincz, et al., 2005; Verrips, et al., 2000). Une mutation de *CYP27* résulte en une augmentation du taux sérique du choléstanol et des alcools biliaires. L'accumulation de ces métabolites dans le SNC est responsable du phénotype clinique (Moghadasian, et al., 2002). La CTX est une pathologie rare, plutôt rencontrée dans les ethnies juives Sépharades d'origine Marocaine (Berginer, et al., 1981).

La symptomatologie neurologique commence avant 20 ans. Une ataxie avec signes pyramidaux et extrapyramidaux, une neuropathie périphérique sensitivo-motrice, une épilepsie et des troubles psychiatriques allant jusqu'à la démence sont décrits. Une symptomatologie extra-neurologique est aussi retrouvée à type de cataracte et de xanthomes tendineux. Une athérosclérose précoce, une ostéoporose et une diarrhée chronique sont rencontrés (Moghadasian, 2004). Les xanthomes et l'athérosclérose sont aussi rencontrés dans d'autres anomalies du métabolisme lipidique : la phytostérolémie et l'hypercholestérolémie familiale. Le diagnostic différentiel se fera dans ces cas sur la progressivité des signes neurologiques et la cataracte (Moghadasian, 2004). L'IRM objective une atrophie cérébelleuse avec anomalies diffuses de la substance blanche (Lorincz, et al., 2005; Verrips, et al., 2000).

Le diagnostic repose essentiellement sur un dosage sérique et tendineux du choléstanol. Le traitement repose sur l'utilisation de l'acide cholique ou chenodeoxycholique (Meiner, 2000).

4- La maladie de Refsum: (RD, 266500)

La maladie de Refsum est aussi appelée : hérédoataxie poly-neuritiforme, maladie de surcharge en acide phytanique ou encore neuropathie sensitivo-motrice de type IV (HMSN IV)

En 1946, Sir Sigvald Refsum a décrit une nouvelle entité neurologique qu'il a surnommé hérédoataxie polyneuritique (Refsum, et al., 1949). Il s'agit d'une forme rare d'ataxie récessive, avec un âge de début généralement inférieur à 20 ans, liée à une mutation du gène de la phytanoylCoAhydroxylase PHYH localisé en 10pter-11.2 (Jansen, et al., 2004; Weinstein, 1999; Wills, et al., 2001). La mutation de PHYH est responsable d'un déficit en alpha oxydation péroxysomale des acides gras. L'accumulation de l'acide phytanique est due à une déficience dans la première étape de sa dégradation : l'alpha oxydation qui a lieu dans le péroxysome (Jansen, et al., 2000; Jansen, et al., 1997).

Ce syndrome est caractérisé par la présence d'une ataxie cérébelleuse associée avec une rétinite pigmentaire, une surdité neuro-sensorielle, une anosmie, une polyneuropathie chronique, des anomalies squelettiques, une ichtyose et des anomalies rénales. Ces signes sont associés à une hyper-proteinorachie sans pléocytose (Refsum, et al., 1949). Une cardiomyopathie avec troubles du rythme a aussi été décrite. Tous les patients présentent une accumulation de l'acide phytanique au niveau des tissus et du sang. La manifestation squelettique caractéristique est le raccourcissement de la phalange distale du pouce.

Cette hétérogénéité clinique est associée à une hétérogénéité génétique. En effet la maladie de Refsum ne doit pas être confondue avec la maladie du Refsum infantile due à un déficit de synthèse des péroxysomes lié à une mutation du récepteur de la péroxine 7 *PEX7* localisé en 6q21-22.2. La maladie du Refsum et la forme infantile ont en commun un taux élevé d'acide phytanique dans le sang, la maladie du Refsum infantile se présente cependant avec un très mauvais pronostic. Elle se manifeste à un âge très précoce avec diarrhées profuses et anomalies de la déglutition, ainsi qu'un retard mental (Jansen, et al., 2004; Weinstein, 1999).

Une mutation de *PEX7* est aussi à l'origine d'autres maladies encore plus sévères. Du plus sévère au moins sévère nous citons: le syndrome de Zellweger, la forme (Jansen, et al., 2004). *PEX7* est aussi responsable de la chondrodysplasie rhizomélique punctata de type I, caractérisée par un phénotype très différent (van den Brink, et al., 2003). Certains patients avec une maladie de Refsum de l'adulte typique ont été décrits avec des mutations perte de fonction partielle du gène *PEX7* (Braverman, et al., 2002; van den Brink, et al., 2003).

5- ARCA2 (SCAR9, MIM 612016)

ARCA2 est une forme d'ataxie identifiée récemment dans notre laboratoire. Elle est responsable d'un déficit en Coenzyme Q10. Ce dernier né de la famille des ataxies récessives a été retrouvé chez une famille consanguine Algérienne, ainsi que chez des patients Français et Américains. Le gène responsable *ADCK3* est localisé en 1q41q42. Les patients présentent une ataxie cérébelleuse progressive qui débute dans l'enfance, parfois associée à une intolérance à l'exercice et une élévation modérée des lactates. Un retard mental modéré, des reflexes vifs et des pieds creux sont notés (Lagier-Tourenne, et al., 2008; Mollet, et al., 2007).

6- AOA2 (MIM 606002)

AOA2 a été rapportée pour la première fois en 1988 par Watanabe et al. chez 4 patients d'une famille Japonaise (Watanabe, et al., 1998). Le signe d'orientation biologique est l'élévation de l'alpha foetoprotéine. L'âge de début plus tardif que AOA1, se situe entre 11 et 22 ans. Le premier symptôme est l'ataxie cérébelleuse dans 80% des cas, et plus rarement une dystonie focale voire un strabisme. L'apraxie oculo-motrice n'est mise en évidence que dans un quart des cas rapportés (Criscuolo, et al., 2005; Le Ber, et al., 2004; Watanabe, et al., 1998); (Duquette, et al., 2005); (Asaka, et al., 2006), et ne constitue donc pas un élément d'orientation clinique. L'évolution de cette maladie est moins sévère que celle de l'AOA1 avec en particulier l'absence de troubles cognitifs. Il existe comme dans l'AT une élévation de l' α -foetoprotéine (1 à 5 fois la limite supérieure de la normale). L'IRM cérébrale révèle une atrophie cérébelleuse précoce et sévère prédominant sur le vermis.

Le gène impliqué, *SETX*, localisé en 9q34 (Moreira, et al., 2004) code pour la senataxine, une ADN/ARN hélicase dont l'homologue chez la levure *SEN1p*, est impliqué dans la terminaison de la transcription et la maturation des ARNs non-codants (Ursic, et al., 2004). Le rôle de la senataxine dans la réparation de l'ADN n'a pas été clairement démontré à ce jour.

C- Signes cliniques d'orientation diagnostique :

1- Les ataxies spastiques

a-ARSACS « Ataxie du Charlevoix-Saguenay » (MIM 270550)

L'ataxie autosomique récessive du Charlevoix-Saguenay est caractérisée par une ataxie cérébelleuse précoce avec spasticité, un syndrome pyramidal et une neuropathie périphérique. L'ARSACS a été initialement décrite en 1978 chez des patients originaires des régions du Saguenay-Lac-St-Jean et du Charlevoix au Québec où son incidence à la naissance a été estimée à 1 sur 1932 et la prévalence des porteurs sains à 1/22 (Bouchard, et al., 1978). La symptomatologie débute souvent à l'âge de la marche autonome, vers 12 à 18 mois (Bouchard, et al., 1998). Chez certains patients d'origine non Québécoise en l'occurrence Tunisienne et Japonaise, le début est plus tardif vers l'âge de 4 et 5 ans (Takiyama, 2007).

Cette ataxie est due à une atrophie précoce du vermis cérébelleux supérieur suivie par une atrophie marquée des hémisphères cérébelleux et de la moelle épinière (Martin, et al., 2007). Les patients présentent des signes précoces de spasticité essentiellement au niveau des membres inférieurs, généralement observés à l'initiation à la marche, les signes cérébelleux sont alors peu marqués (Bouchard, et al., 1998).

L'atteinte pyramidale domine le tableau clinique. Elle se traduit par une spasticité progressive essentiellement au niveau des membres inférieurs avec des reflexes ostéo-tendineux vifs et un signe de Babinski bilatéral. La neuropathie périphérique apparaît plus tardivement et entraîne une abolition des reflexes achilléens (Bouchard, et al., 1998; El Euch-Fayache, et al., 2003), une amyotrophie distale et une perturbation de la sensibilité profonde notamment vibratoire. La neuropathie périphérique peut même aboutir chez certains patients à la régression de la spasticité (Takiyama, 2007).

Un retard mental a été décrit chez certains patients Japonais, Italiens et Turcs, jamais chez des patients Québécois. Les autres signes précoces de l'ataxie cérébelleuse incluent une dysarthrie et un nystagmus. Une atteinte ophtalmologique est notée à type de striations rétinienne observées au fond d'œil. Cette striation traduit une prédominance des fibres myélinisées rétinienne irradiant depuis le disque optique et enchâssant les vaisseaux rétinienne

(Bouchard, et al., 1978; Bouchard, et al., 1998), sans occasionner de perte de la vision. Elle est constante chez les patients d'origine Québécoise, 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, 2007; Yamamoto, et al., 2005). Il s'agit d'un signe très utile pour orienter le diagnostic, surtout en l'absence de spasticité. Une altération de la poursuite oculaire peut être notée ainsi qu'une ophtalmoplégie. D'autres signes sont observés à type de prolapsus de la valve mitrale, pieds creux, déformation des mains et de dysfonction vésicale et rectale chez des patients québécois et non-québécois.

L'imagerie par résonance magnétique révèle une atrophie cérébelleuse marquée au niveau du vermis supérieur et une atrophie progressive des hémisphères cérébelleux et de la moelle épinière. Une méga-citerne et une atrophie de la moelle cervicale sont occasionnellement observées. Les hémisphères cérébraux ainsi que la substance blanche cérébelleuse sont intactes. La TDM computerisée à émission de photons (SPECT) montre une diminution du flux sanguin au niveau du vermis supérieur. Une seule autopsie de patient ARSACS a été rapportée dans la littérature, elle confirme les données de l'imagerie et retrouve une absence de cellules de Purkinje et une atrophie des faisceaux spino- cérébelleux au niveau du pont (Takiyama, 2007).

L'étude électrophysiologique révèle une neuropathie axonale sensitivo-motrice démyélinisante qui se traduit par une absence de potentiels d'action sensitifs et une réduction de la vitesse de conduction nerveuse motrice. L'EEG révèle des anomalies à type de bouffées d'ondes lentes généralisées sans crises épileptiques associées. La biopsie nerveuse et musculaire retrouve une atrophie musculaire de type neurogène groupée ainsi qu'une démyélinisation nerveuse.

Le gène *SACS* a été identifié sur le bras long du chromosome 13 en q12.12 (Engert, et al., 2000; Richter, et al., 1999), chez des patients originaires des régions du Saguenay-Lac-St-Jean et du Charlevoix au Québec appartenant à 12 familles québécoises non apparentées. Une seule et même mutation a été retrouvée chez tous ces patients (6954delT) confortant l'hypothèse d'un effet fondateur Canadien. D'autres mutations ont été retrouvées chez des patients de diverses origines (Criscuolo, et al., 2004; 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. Il code pour une protéine (la saccine) de 3829 acides aminés. L'analyse des domaines de la protéine *SACS* prédit 3 domaines coiled-coil, 2 leucines zippers, 7 signaux de localisation nucléaire et un domaine heat-shock (DnaJ). L'analyse de l'expression du transcrite de *SACS* retrouve une expression élevée au niveau des fibroblastes, du cerveau et du muscle squelettique et un niveau d'expression faible au niveau du pancréas. En N-terminal un motif DnaJ et un motif ubiquitine like (UBL) sont retrouvés. L'interaction de ces 2 domaines UBL et DnaJ avec la protéine HSP70 confère à ce complexe protéique une fonction de protéine chaperonne récemment impliquée dans la protection contre les expansions polyQ de la protéine ataxine 1 (Parfitt, et al., 2009).

2- Les télangectasies :

a- L'ataxie télangectasie (AT, MIM 208900)

Longtemps appelée l'ataxie de Friedreich like, l'ataxie télangectasie constitue chez l'enfant la forme d'ataxie la plus fréquente après l'ataxie de Friedreich. Sa fréquence est estimée à 1 cas par 100.000 naissances. L'âge de début se situe entre 2 et 3 ans. Le tableau clinique se caractérise par un déficit immunitaire et une ataxie cérébelleuse. Ces deux principales manifestations cliniques font que cette forme d'ataxie est essentiellement recensée dans les services d'immunologie et de neurologie. En effet elle associe un déficit immunitaire mixte et sévère, surtout humoral à une ataxie cérébelleuse progressive. En plus du déficit immunitaire, il existe une prédisposition importante aux cancers. Ce risque s'élève à 38%, dont 85% sont des hémopathies, mais des tumeurs solides ont aussi été rapportées. Le pronostic vital reste sévère en raison des complications infectieuses et ou néoplasiques. Les télangectasies qui ont donné leur nom à la maladie ne sont cependant pas évidentes aux premiers stades de la maladie.

Le taux de l'alpha fœto-protéine sérique est élevé chez 80% des patients. Les immunités humorale et cellulaire sont réduites. Des cassures chromosomiques ainsi qu'une translocation (7 ; 14) sont retrouvées au caryotype. L'IRM met en évidence une atrophie vermienne (Tavani, et al., 2003).

L'AT résulte d'une mutation du gène *ATM* localisé en 11q22 et constitué de 62 exons codants (Savitsky, et al., 1995). Cette grande capacité codante explique la difficulté de

l'analyse moléculaire de ce gène. Les mutations décrites sont généralement tronquantes responsables d'un phénotype sévère. La protéine ATM est une sérine thréonine kinase impliquée dans la réparation des cassures de l'ADN double brin. Une perturbation de ce mécanisme de réparation induit une apoptose cellulaire et une instabilité génomique (Stern, et al., 2002).

b- ATLD (MIM 604391)

Bien que les télangectasies soient absentes de ce syndrome, le chevauchement de son spectre clinique avec l'ATM m'ont amené à le classer dans la même rubrique.

Il s'agit d'un syndrome très rare, seules 6 familles ont été décrites à ce jour. La présentation neurologique est très proche de celle de l'AT (Delia, et al., 2004; Fernet, et al., 2005; Pitts, et al., 2001; Stewart, et al., 1999). Le début est cependant moins précoce et l'évolution moins sévère. L'absence de télangectasies oculaires et un taux normal de l'alpha fœto-protéine sérique sans anomalies de l'immunité sont les principaux critères cliniques distinctifs. Le caryotype est généralement normal, sauf présence comme dans l'AT d'une translocation (7 ; 14).

ATLD est dûe à une mutation du gène *MRE11* localisé en 11q21 (Stewart, et al., 1999). *MRE11* est une nucléotidase faisant partie du complexe MRN (*MRE11*, *NBS1*, *Rad50*), qui est le « senseur » des cassures doubles brins de l'ADN. A ce titre, il participe à la surveillance de l'intégrité génomique. De plus, *MRE11* est responsable de la libération d'extrémité 5' sortante par son activité 3'->5' exonucléasique sur ces cassures doubles brins, ce qui constitue la première étape de la réparation. Cette étape est activée par ATM. En temps normal *MRE11* et *NBS1* phosphorylées se colocalisent avec PCNA sur les sites de réplication active, ce qui témoigne de leur implication dans la suppression de l'instabilité génétique (Uziel, et al., 2003). Les mutations ATLD de *MRE11* sont des pertes de fonction partielles, en général faux-sens ou troncations C-terminales, ce qui explique le peu d'anomalies chromosomiques, comparé à AT, et la rareté du syndrome. Le KO du gène *Mre11* chez la souris n'est pas viable.

3- Ophtalmoparésie- ophtalmoplégie :

a- SANDO : (MIM 607459)

Le gène *POLG* localisé en 15q26, code pour la grande sous unité catalytique de la polymérase Gamma mitochondriale. Cette protéine fait partie d'un complexe multienzymatique localisé sur la membrane interne de la mitochondrie et qui a un rôle fondamental dans le réplication et la réparation de l'ADNmt (Kaguni, 2004). Les mutations de ce gène sont responsables d'un large spectre de manifestations cliniques incluant le syndrome d'Alpers, l'ophtalmoplégie progressive externe (PEO) dans sa forme dominante et des syndromes ataxiques avec transmission autosomique récessive. Ces syndromes ataxiques sont au nombre de 2 : la neuropathie sensitive ataxiante avec dysarthrie et ophtalmoparésie (SANDO, MIM 607459) (Fadic, et al., 1997; Van Goethem, et al., 2003b), et le syndrome avec ataxie mitochondriale récessive (également appelé MIRAS) (Hakonen, et al., 2005; Winterthun, et al., 2005). Ces deux maladies sont dues à des effets fondateurs avec la mutation W748S principalement retrouvée en Finlande et la mutation A467T principalement retrouvée en Belgique. La mutation W748S est la cause la plus fréquente d'ataxie héréditaire en Finlande (Hakonen, et al., 2005). L'ataxie peut être cérébelleuse ou secondaire à une neuropathie sensitive. Elle peut être associée à une myopathie, une neuropathie périphérique, une ophtalmoplégie, des migraines, une épilepsie 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.

b- IOSCA : (MIM 271245)

Il s'agit d'une ataxie spino-cérébelleuse sévère et rare qui n'a été décrite que dans la population Finlandaise (Koskinen, et al., 1994; Lonnqvist, et al., 1998; Nikali, et al., 1997). IOSCA se manifeste à un âge de début très précoce par une hypotonie, une hyporéflexie, une athétose et une neuropathie axonale sensitive.

Une ophtalmoplégie, une atrophie optique, une surdité, des mouvements involontaires et une épilepsie peuvent compliquer l'évolution. L'IRM objective une atrophie cérébelleuse, médullaire et du tronc cérébral (Nikali, et al., 1997).

Le gène *C10orf2* code pour la protéine Twinkle, qui est une hélicase mitochondriale. L'une des 2 seules mutations connues dans ce syndrome, Y508C, est responsable de l'effet fondateur Finlandais (Nikali, et al., 2005).

4- La neuropathie sensitivo-motrice périphérique :

a- AOA1 (ataxie avec apraxie oculomotrice) : (EAOH ; MIM 208920)

Cette affection est caractérisée par une ataxie cérébelleuse débutant généralement avant l'âge de 7 ans. La symptomatologie clinique se caractérise par une apraxie oculo-motrice, une aréflexie puis une amyotrophie distale majeure et des déformations squelettiques, dues à une neuropathie axonale sensitivo-motrice sévère (Barbot, et al., 2001b; Fukuhara, et al., 1995; Le Ber, et al., 2003; Shimazaki, et al., 2002). Un début plus tardif a aussi été décrit (Criscuolo, et al., 2004; Criscuolo, et al., 2005; Date, et al., 2001; Tranchant, et al., 2003).

L'apraxie oculomotrice qui donne son nom à la maladie correspond à une dissociation entre les mouvements de la tête et des yeux. Elle apparaît généralement après plusieurs années d'évolution et est présente dans environ 86% des cas (Le Ber, et al., 2003). Ce signe est inconstant aussi bien chez les patients AOA1 que AOA2.

Un retard mental modéré est noté chez 30 à 40 % des patients. 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. 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). AOA1 est la cause la plus fréquente d'ataxie récessive au Japon. Son diagnostic moléculaire est facilité par le fait que les mutations identifiées à ce jour sont toutes localisées dans les quatre derniers exons (4, 5, 6, et 7), en dehors d'une délétion de

l'ensemble du gène (Amouri, et al., 2004). *APTX* code pour une protéine qui possède un domaine apparenté au domaine N-terminal de la PNKP impliquée dans la réparation (BER) des cassures d'ADN simple brin. Ce domaine est responsable de l'association de ces deux protéines avec XRCC1, qui est la protéine de recrutement (scaffold) pour la réparation des anomalies de l'ADN par excision de base. Le domaine C terminal d'*APTX* contient un motif HIT (histidine triad) responsable de l'activité catalytique qui est une hydrolyse de l'ADP en liaison 5'-5' diphosphate sur l'extrémité 5' des cassures simples brin de l'ADN (étape abortive de la ligation).

b- SCAN1 (SCAN1, MIM 607250)

SCAN1 est une ataxie rare, qui partage plusieurs caractéristiques cliniques avec AOA1. En effet on y retrouve l'atrophie cérébelleuse avec neuropathie axonale sensori-motrice, mais sans apraxie oculomotrice. L'albuminémie est légèrement en dessous de la normale et le taux de cholestérol est élevé. Le début de la maladie se fait vers l'adolescence. Cette entité a été rapportée chez une seule grande famille consanguine d'Arabie Saoudite dans laquelle 9 individus sont atteints (Takashima, et al., 2002).

Le gène responsable est le *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 (Katyal, et al., 2007).

D- Les ataxies cérébelleuses pures :

La seule entité d'ataxie cérébelleuse pure où le gène est identifié est ARCA1.

1- ARCA1 : (MIM 610743)

L'ataxie cérébelleuse autosomique récessive de type 1 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). 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). Ce gène 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).

E- Les Loci d'ataxie récessive :

Ces dernières années, de nombreux loci responsables d'ataxies héréditaires ont été proposés, renforçant la notion d'une vaste hétérogénéité génétique parmi les ataxies héréditaires (Tableau 4).

Ces loci sont souvent définis par l'étude d'une ou de quelques familles. 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. J'ai choisi de présenter dans le cadre de ce travail seulement deux de ces loci : SCAR6 et PHARC. Ces deux loci se chevauchent sur le chromosome 20 (Figure 1). Ils ont de plus été rapportés chez deux familles certes non apparentées mais toutes deux originaires de la Norvège.

1- SCAR6

Bien qu'étant un locus, j'ai choisi de présenter cette forme spécifique d'ataxie parmi les ataxies cérébelleuses pures. SCAR6 « Spino Cerebellar Ataxia 6 » est une entité clinique très bien définie décrite pour la première et seule fois par Kvistad en 1985 chez 7 patients consanguins appartenant à une grande famille d'origine Norvégienne (Kvistad, et al., 1985).

Il s'agit d'une ataxie autosomique récessive non progressive qui commence à un âge précoce. Cette précocité la fait classer par certains auteurs parmi les ataxies congénitales. Cette forme spécifique a été retrouvée chez 7 patients consanguins (Figure2) qui ont présenté une ataxie héréditaire très précoce sans aucune aggravation ultérieure. Les 7 patients présentaient clairement la même symptomatologie clinique.

Aucun patient n'a présenté de symptôme avant l'âge de 1 an. Le signe révélateur a consisté en un retard de la marche sans aide ni appui. Plus tard une maladresse et une hypotonie musculaire sont apparues. Les patients sont tous scolarisés et aucune déficience mentale n'a été retrouvée malgré une très lente acquisition de la parole. Il s'agit d'une ataxie pure sans aucun signe extra-neurologique, à l'exception d'une petite taille. A l'âge adulte la symptomatologie se résume en une démarche ataxique, une petite taille entre -2 et -3

déviation standard et des pieds plats, sans autres malformations squelettiques. Ce retard statural était variable dans le temps et d'un patient à un autre, mais synchronisé avec le début des signes neurologiques. Toutes les origines endocriniennes ou carencielles pouvant être à l'origine du retard du développement ont été éliminées. L'examen neurologique a en outre révélé une parole monotone, lente et saccadée, ainsi qu'un nystagmus modéré au regard latéral. L'hypotonie musculaire est marquée. L'ataxie cérébelleuse se présente à des degrés variables avec un tremblement d'intention, une maladresse des mains, une dysdiadococinésie et un phénomène de rebond. Cette ataxie qui ne concerne pas le tronc, s'associe à une force musculaire et une sensibilité normales. Les réflexes ostéo-tendineux sont vifs, avec une spasticité notée essentiellement au niveau des membres inférieurs. L'association de cette spasticité à un signe de Babinski n'est pas retrouvée chez tous les patients. La TDM cérébrale a révélée dans la plupart des cas une atrophie vermineuse. Les explorations neurophysiologiques, en l'occurrence l'EEG, sont normales. Les explorations biochimiques et immunologiques sont normales et aucun organe autre que le système nerveux central n'est touché. Malgré l'absence de progression et de détérioration clinique, la dégénérescence cérébelleuse est progressive. Ceci est illustré par la TDM qui montre une atrophie cérébelleuse plus marquée chez les patients les plus âgés et une absence d'atrophie cérébelleuse chez les plus jeunes. Ceci suggère que le début de la maladie est plus précoce et probablement avant un an, surtout parce que les signes cérébelleux sont difficiles à évaluer avant la maturation du SNC.

Cette famille Norvégienne a fait l'objet d'un clonage positionnel par cartographie par homozygotie utilisant des marqueurs microsatellites (Tranebjaerg, et al., 2003). Une analyse du génome entier utilisant 408 marqueurs microsatellites fluorescents a été pratiquée et a révélé une homozygotie par descendance au niveau de la zone péri-centromérique du chromosome 20 en p12-q12 entre les deux marqueurs microsatellites D20S471 et D20S119. Cette région homozygote s'étend sur 23Mb et comprend plus de 220 gènes.

2- PHARC ou Refsum Like

PHARC est l'acronyme de Polyneuropathy, Hearing loss, Ataxia, Retinitis pigmentosa and Cataract. A cause de la ressemblance de la présentation clinique avec le syndrome de

Refsum, ce syndrome a été décrit en tant que «Refsum Like ». Le locus de ce syndrome Refsum like a été récemment publié (Fiskerstrand, et al., 2009) à partir de l'étude chez 3 patients d'une famille originaire d'une petite île Norvégienne. Il s'agit d'une ataxie très progressive liée au chromosome 20 dans l'intervalle 20p11.21-q12 entre les microsatellites D20S477 et D20S107 et contenant près de 200 gènes. L'analyse biochimique des taux d'acide pristanique et phytanique, ainsi que l'activité enzymatique alpha-oxydative sont normales chez les 3 patients, excluant ainsi définitivement le syndrome du Refsum. L'étude des vitesses de conduction nerveuses montrent une nette diminution indiquant une neuropathie démyélinisante. L'IRM cérébrale révèle une atrophie cérébelleuse.

Au cours de mon travail de thèse, j'ai également identifié six familles liées à la région pericentromérique du chromosome 20, par cartographie par consanguinité et identification d'un effet fondateur.

Tableau 4 : 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 rétinite 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 quadrup�dale	17p	Turkmen 2006
Nouvelle forme d'ataxie-épilepsie	Epilepsie avant 1 an, ataxie cérébelleuse, retard mental, anomalies de la substance blanche	16q21	Gribaa 2007

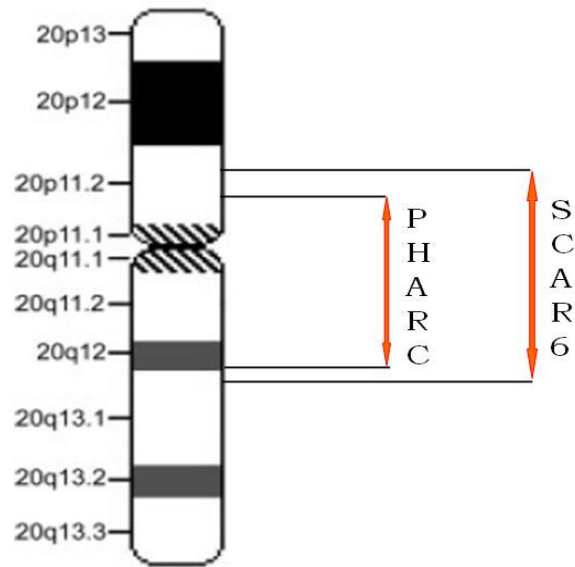


Figure 1 : Colocalisation chromosomique des 2 loci SCAR6 et PHARC
(Limites chromosomiques d'après UCSC 2006)

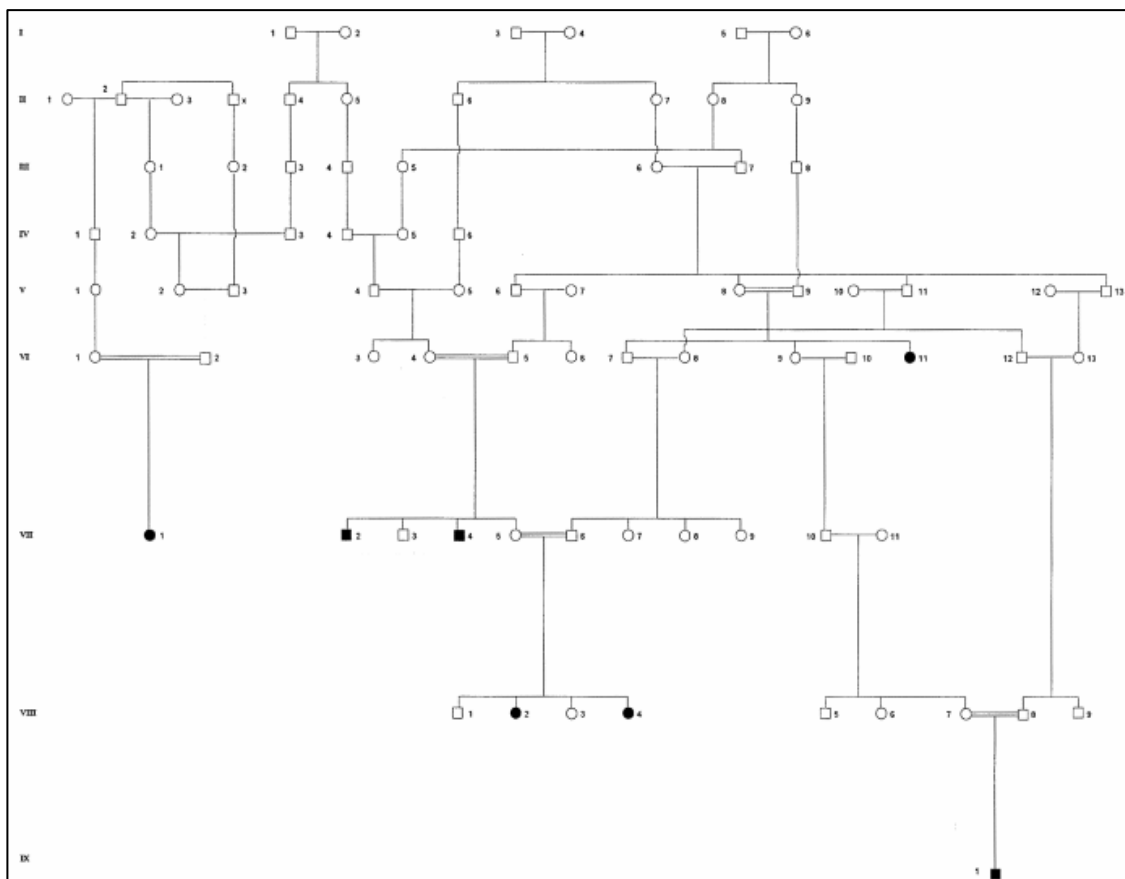


Figure 2 : Arbre généalogique de la grande famille Norvégienne liée au locus SCAR6

(D'après Kavistad et al., 1985)

II- Quelques notions de génétique des populations :

Les notions théoriques traitées dans ce chapitre concernent l'analyse des 5 familles Algériennes de la région de Constantine liées au locus du chromosome 20, chez lesquelles j'ai identifié un effet fondateur. Les applications de ces notions théoriques seront traitées dans le chapitre résultat.

A- La dérive génétique :

La dérive génétique est le changement de la fréquence allélique dans une population due à l'accumulation d'évènements au hasard. Elle se distingue de la sélection naturelle, qui est un processus non aléatoire traduisant l'effet de certains allèles sur le comportement adaptatif et ou reproductif d'une espèce.

La dérive génétique est généralement observée dans des populations de petite taille à cause d'un effet fondateur ou d'un goulot d'étranglement. La sélection naturelle est par contre rapportée dans des populations de grandes tailles. L'effet de la dérive génétique est faiblement ressenti dans une population de grande taille. En effet, la perte d'une copie d'un certain allèle présent chez un individu sans descendance sera compensée par le fait qu'un autre individu possédant le même allèle aura plusieurs descendants. De cette manière, les fréquences alléliques fluctuent peu dans les grandes populations. Par contre, elles varient fortement dans les petites populations, où cet effet de moyenne n'agit pas. Il faut cependant garder en mémoire que ces deux phénomènes agissent toujours ensemble, et que c'est la prédominance de l'effet de l'un sur l'autre qui régit les variations des fréquences alléliques dans une population.

La dérive génétique peut jouer un rôle très important dans la détermination des caractéristiques génétique de la population nouvellement créée. Dans cette population fondée, les prévalences des caractéristiques génétiques vont augmenter y compris celles des mutations pathogènes. Les individus fondateurs d'une population ne seront pas également représentés. Leur représentativité dépendra de leur date d'arrivée dans la nouvelle population et du fait qu'ils aient eu ou non des descendants. Au cours des générations qui suivent la migration, la dérive génétique peut aussi modifier les fréquences alléliques et l'ampleur de son effet sera fonction de l'effectif et de la dynamique démographique de la nouvelle population.

Les conséquences de la dérive génétique sont :

- a- L'apparition d'un isolat génétique par augmentation de la consanguinité et donc de la proportion d'homozygotes par rapport aux hétérozygotes.
- b- Une fluctuation des fréquences alléliques de génération en génération, l'amplitude de ces fluctuations sera d'autant plus grande que la taille de la population sera petite.
- c- Une différenciation génétique progressive de 2 populations issues d'une même population mère. ces 2 populations auront initialement les mêmes fréquences alléliques, mais elles vont connaître des processus de dérive génétique indépendants. Chacune des populations va avoir des fréquences alléliques se modifiant aléatoirement au cours du temps. La variabilité génétique de l'espèce va ainsi augmenter, ceci d'autant plus qu'elle sera composée de petites populations isolées les unes des autres.

B- La consanguinité

Dans une population panmictique où l'équilibre de Hardy Weinberg est démontré ($(p+q)^2=1$ ($p^2+q^2+2pq=1$)), les mariages se font au hasard et les proportions d'homozygotes p^2 et q^2 ainsi que les proportions d'hétérozygotes $2pq$ sont constantes. Sachant que la plupart des populations naturelles ne sont pas panmictiques, les gamètes ne s'unissent donc pas au hasard du fait de la taille limitée des populations et de ses structures internes qui empêchent la libre rencontre des individus. Ces limites de dispersion des gamètes font que les organismes vont se reproduire avec des individus qui sont nés à proximité d'eux, avec qui ils sont apparentés.

Ces individus posséderont un lien de parenté et un ou plusieurs ancêtres communs donc une certaine proportion de copies alléliques identiques par descendance. Ils sont définis comme consanguins.

C- La notion d'isolat génétique : consanguinité rapprochée, «Inbreeding », endogamie

Dans une population de petite taille, où les possibilités de mariage au hasard sont faibles la proportion d'hétérozygotes va nettement diminuer d'une génération à la suivante au

profit des homozygotes. « L'inbreeding » ou endogamie dans cette population va augmenter à cause de la diminution des possibilités de mariage au hasard.

Le cas extrême d'« inbreeding » étant l'autofécondation ou homogamie. Ce phénomène sera d'autant plus rapide que la taille de la population sera faible. Dans l'espèce humaine ce phénomène s'applique, mais avec une génération de retard par rapport aux espèces ou l'homogamie est possible.

D- L'effet fondateur (Figures 3 et 4)

Il s'agit de la réduction du pool de gènes liés à l'établissement d'une nouvelle population sur un territoire neuf à partir d'une population parentale d'origine. Il se caractérise par un changement du profil des fréquences alléliques dans le groupe migrant par rapport à sa population d'origine. Il s'explique par la stochastique de l'échantillonnage des chromosomes et devient d'autant plus important lorsque le nombre des migrants est petit et que le groupe des migrants est formé de fratries ou de familles.

Dans cette population nouvellement formée, on note la présence d'une fraction des variations génétiques de la population d'origine. Cette nouvelle population sera par conséquent génétiquement et phénotypiquement différente de la population de départ. La caractérisation d'un effet fondateur s'appuie le plus souvent sur l'observation des maladies monogéniques. Les exemples d'effet fondateur sont très fréquents dans les maladies mendéliennes.

L'effet fondateur comporte dans sa définition la notion de goulot d'étranglement démographique aussi surnommé « goulot d'étranglement par migration » qui indique une importante réduction de taille de la population fondatrice par rapport à la population mère.

Cette notion de goulot d'étranglement augmente la dérive génétique puisque le taux de dérive est inversement proportionnel à la taille de la population. Il augmente par ailleurs l'« inbreeding » en réduisant les possibilités de mariages au hasard.

Les répercussions de l'effet fondateur sur le pool génique d'une population dépendent non seulement du comportement reproductif associé à une plus grande fécondité mais aussi de la diversité initiale du système génétique examiné. La variance d'échantillonnage est beaucoup

plus grande pour des allèles rares. L'effet fondateur pourrait ainsi être sans conséquence sur la fréquence des polymorphismes communs dont l'importance dans l'étiologie des phénotypes associés aux traits complexes ou à la réponse thérapeutique au traitement est très controversées.

E- Exemples d'effets fondateurs dans les ataxies autosomiques récessives :

Dans le cadre des maladies monogéniques on peut parler de mutation fondatrice retrouvée chez un grand nombre de patients ou d'haplotype fondateur lorsque le gène en cause n'est pas encore identifié. Tous les porteurs d'une mutation fondatrice auront forcément le même haplotype, ce dernier va être réduit en taille au fur et à mesure des générations à cause des recombinaisons homologues qui peuvent survenir à chaque méiose. La fréquence d'un haplotype dans une population pourra nous renseigner sur l'extension géographique des descendants du fondateur.

La notion d'haplotype sera abordée plus en détail un peu plus loin dans ce manuscrit. La notion de mutations fondatrices a été souvent évoquée dans les ataxies récessives. La prédominance d'une ou plusieurs mutations fondatrices dans un petit groupe une fois confirmée va nous permettre de faire un screening de cette population et un suivi épidémiologique des porteurs hétérozygotes (Gilad, et al., 1996).

1- ARSACS :

ARSACS a été décrite pour la première fois en 1978 par J-P Bouchard dans la région du Charlevoix-Saguenay. Il s'agit d'une ataxie spastique qui illustre parfaitement la notion d'effet fondateur dans cette région du Québec (Engert, et al., 2000). Dans cette région du Nord-est du Québec existe une vingtaine de maladies héréditaires décrites avec un effet fondateur Québécois. La mutation fondatrice du gène de la saccine (6594delT) est retrouvée chez 96% des patients Québécois.

2- ATM :

L'ataxie télangectasie est un exemple d'ataxie récessive dans laquelle ont été retrouvées plusieurs mutations fondatrices dans différentes populations. Il existe en fait plus de 250 mutations décrites dans le gène ATM. Certaines de ces mutations sont fondatrices dans des populations bien spécifiques telles que la population des îles Britanniques (Stankovic, et al., 1998), les Italiens de Naples (Gilad, et al., 1996), les Polonais, les juifs nord-africains, les Costariciens, les Japonais (Ejima and Sasaki, 1998). Les Druzes et les Russes. Nous allons citer quelques mutations fondatrices répertoriées chez deux populations fréquemment décrites dans la littérature, la population Japonaise et la population juive nord-africaine.

Deux mutations fondatrices ont été décrites dans 8 familles Japonaises non consanguines et non apparentées : 4612del165 au niveau de l'exon 33 et 7883del15 au niveau de l'exon 55, une étude par microsatellites de l'haplotype qui entoure ces mutations a aussi révélé la présence d'un haplotype commun fondateur (Ejima and Sasaki, 1998). Parmi 16 familles juives nord-africaines du Maroc et du nord de la Tunisie (de Tunis et de la ville de Nabeul) une mutation fondatrice tronquante 103C>T (R35X) a été retrouvée chez 15 familles. Il s'agit d'une mutation spécifique de la population juive nord-africaine qui n'a pas été retrouvée chez les Tunisiens non juifs originaires de la même région (Gilad, et al., 1996).

De telles observations ont permis en 1998 de mener une étude épidémiologique dans le but de faire un screening des mutations du gène ATM et de dépister les individus à haut risque de cancer. Vu le grand nombre de mutations décrites dans l'AT (plus de 250), un screening de toutes ces mutations paraît impossible. 70% de ces mutations sont par contre tronquantes, justifiant ainsi un screening basé sur la détection de la protéine. Cette recherche a permis de détecter 60% des mutations connues chez 76% des Costariciens, 50% des Norvégiens, 25% des Polonais et 14% des Italiens. Des mutations ont aussi été détectées chez les Amish, les Japonais, les mormons de l'Utah, les africains américains et les patients des îles britanniques (Telatar, et al., 1998a; Telatar, et al., 1998b).

3- AVED :

L'effet fondateur nord africain de l'ataxie avec déficit en vitamine E est maintenant bien étudié. Il s'agit de la mutation 744delA au niveau de l'exon 5 cause un décalage du cadre de lecture. Cet effet fondateur a tout d'abord été décrit dans des familles Tunisiennes et Italiennes (Ben Hamida, et al., 1993a; Ben Hamida, et al., 1993b). Cette même mutation a ensuite été retrouvée chez des patients Marocains (Benomar, et al., 2002; Marzouki, et al., 2005) et Algériens. Une seconde mutation fréquente, 513insTT, a été décrite dans la population caucasienne et Nord américaine. La mutation la plus fréquente au Japon est un faux sens H101Q, associé avec un phénotype très peu sévère et un début tardif de la maladie.

4- FRDA :

L'effet fondateur rapporté dans l'ataxie de Friedreich en 1996 par Monros E et al. (Monros, et al., 1996), à partir de l'observation d'un haplotype commun en microsatellite, a été identifié en même temps que la mutation responsable. Cette mutation consiste en une expansion GAA au niveau de l'intron 1 du gène de la frataxine. Cette mutation est retrouvée dans 98% des chromosomes FRDA. Des effets fondateurs mineurs ont été par la suite rapportés. Chez 4 familles de différentes origines (Française, Irlandaise et Anglaise) une mutation ponctuelle G130V suggère la présence d'un second effet fondateur, cette mutation confère de plus un phénotype atypique de l'ataxie de Friedreich avec des reflexes vifs absence de dysarthrie et une incoordination très discrète, l'âge de début reste cependant le même (Cossee, et al., 1999). Un troisième effet fondateur Italien a été retrouvé dans le sud de l'Italie I154F (Campuzano, et al., 1996). Enfin un quatrième effet fondateur avec un haplotype commun a été décrit chez 3 patients non apparentés M1I (Zuhlke, et al., 1998).

5- IOSCA :

A ce jour des mutations ont seulement été rapportées dans la population Finlandaise, ce qui suggère un effet fondateur propre dans cette population. Une mutation fondatrice a été décrite : la mutation majoritaire 1708 A>G (Y508C), la mutation silencieuse 1472C>T a été décrite chez un patient hétérozygote composite avec la mutation majoritaire.

6- AOA1 :

Il s'agit d'une ataxie très fréquente au Japon à cause de la présence de 2 mutations fondatrices (689insT et P260L). Une troisième mutation fondatrice W279X, initialement trouvée dans la population du nord du Portugal, a été retrouvée dans l'ensemble de la population caucasienne. D'autres mutations ont été retrouvées chez des patients de diverses origines.

7- ABL :

Une mutation fondatrice G865X a été retrouvée chez les juifs ashkénase (Benayoun, et al., 2007).

Dans les cas d'ARSACS, de IOSCA et d'AOA1, les effets fondateurs ont permis d'identifier les gènes responsables des maladies (Date, et al., 2001; Engert, et al., 2000; Moreira, et al., 2001a; Nikali, et al., 2005).

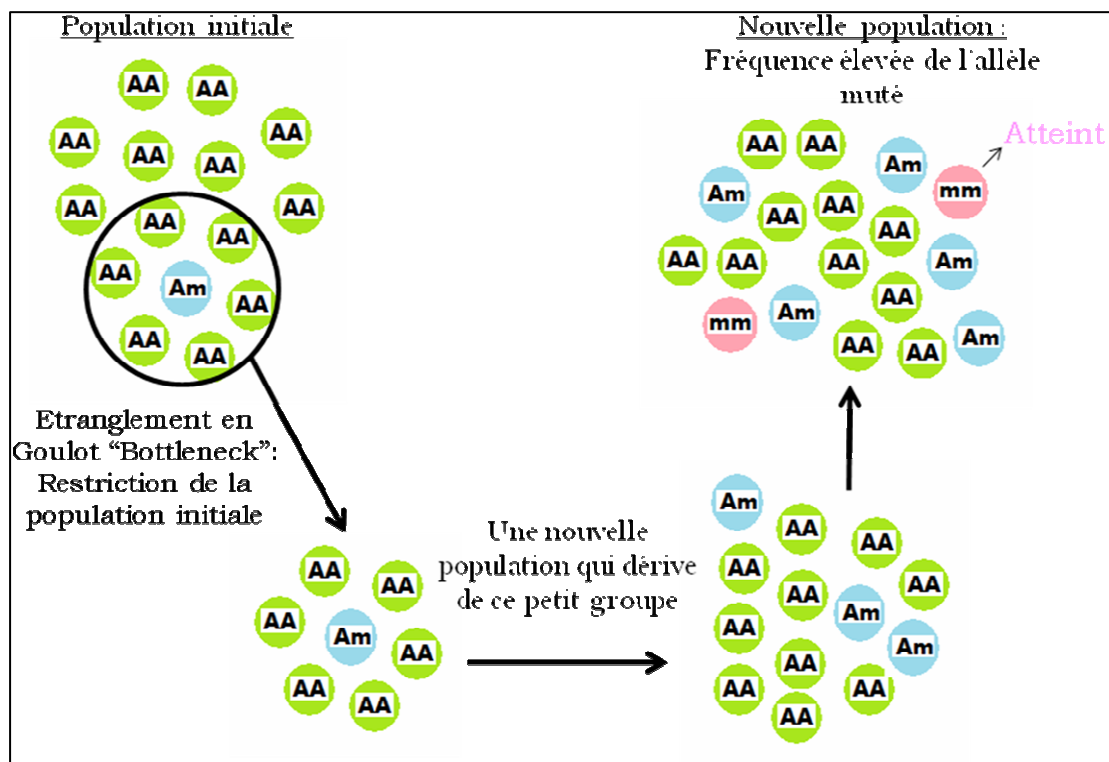


Figure 3: Schéma illustrant la notion d'effet fondateur dans le cadre d'une maladie autosomique récessive

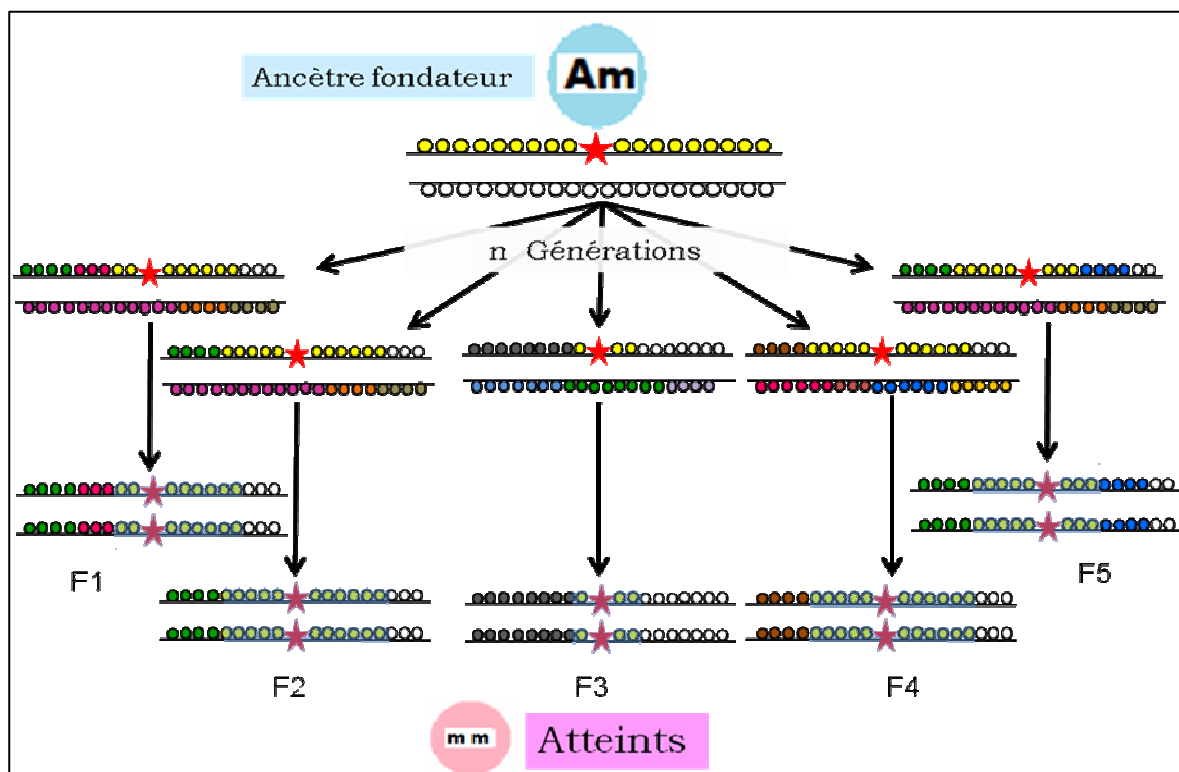


Figure 4: Cartographie par homozygotie et effet fondateur

III- Les α/β hydrolases :

Au cours de ce travail, nous avons identifié des mutations au niveau d'une α/β hydrolase : ABHD12, dans une nouvelle forme d'ataxie liée au chromosome 20. Dans ce chapitre je détaillerai les caractéristiques biochimiques, la localisation subcellulaire et la fonction des α/β hydrolases en m'attardant sur ABHD12. Je détaillerai, par ailleurs les caractéristiques biochimiques et fonctionnelles du seul substrat d'ABHD12 connu à ce jour: l'endocannabinoïde : 2-arachidonoylglycerol (2AG).

Je me suis basée en grande partie dans la recherche bibliographique de ce chapitre, sur les données fournies par la base de données ESTHER créée en 1995 <http://bioweb.ensam.inra.fr/esther>, destinée à l'analyse des séquences de protéines et d'acides nucléiques appartenant à la superfamille des alpha/beta hydrolases. Dans cette base de donnée sont répertoriées toutes les α/β hydrolases, leurs fonctions (lorsqu'elles sont connues), leurs structures, et récemment ont été rajoutées leurs implications dans les pathologies humaines.

A- Définition :

Les α/β hydrolases constituent une classe d'enzymes qui catalysent les réactions d'hydrolyse d'esther, de liaison peptidiques, et de liaisons osidiques. Ces enzymes sont classées EC3 dans la classification EC. Elles ne nécessitent généralement pas de coenzyme, car elles sont activables par des cations (Ollis, et al., 1992).

B- Structure :

Les hydrolases sont des enzymes hydrolytiques avec des origines phylogénétiques et des activités catalytiques très diverses. La superfamille des alpha/beta hydrolases (ABHD) a été décrite pour la première fois en 1992 par Ollis et al. (Ollis, et al., 1992). Toutes les ABHD possèdent un même coeur enzymatique composé d'au moins 5 feuillets beta (5 à 8) connectés entre eux par des hélices alpha. Tous les feuillets beta sont parallèles entre eux sauf le β_2 qui est antiparallèle. Toutes ces enzymes dérivent d'une même protéine ancestrale où le domaine catalytique est conservé, sans qu'il y ait pour autant une conservation du site de liaison à la molécule cible. L'élément le mieux conservé est la triade catalytique Nucléophile. Cette triade est généralement formée par une Sérine ou une cysteine ou un acide aspartique), un acide

(généralement l'acide Aspartique) et une histidine, formant le coude nucléophile. Dans cette triade l'élément le plus conservé étant l'histidine (Nardini and Dijkstra, 1999; Ollis, et al., 1992) (Figure 5).

Un alignement des séquences des 15 α/β hydrolases montre que 12 ABHD/15 utilisent l'acide aminé nucléophile Sérine G-X-S-X-G pour former le coude nucléophile (Simon and Cravatt, 2006). Ces 12 gènes y compris ABHD12 contenant une Sérine dans leur site catalytique, sont regroupés sous le nom de Sérine hydrolases (Figure 6).

C- Localisation subcellulaire :

On a longtemps pensé que la localisation subcellulaire des hydrolases était exclusivement microsomale. En 2006, Enayatallah AE a montré que la localisation des α/β hydrolases était tissu dépendante et qu'elle pouvait être aussi bien cytosolique que microsomale (Enayatallah, et al., 2006; Rawal, et al., 2009).

D-les membres de la superfamille des α/β hydrolases et leurs Implications dans les pathologies humaines :

Les α/β hydrolases sont impliquées dans la majeure partie des processus physiologiques et pathologiques, ce qui en a fait une cible thérapeutique dans plusieurs maladies telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer, l'obésité et les anomalies de la crase sanguine (Thornberry and Weber, 2007). A ce jour 15 gènes contenant un domaine α/β hydrolase ont été identifiés chez l'homme et la souris et les fonctions de la majorité des protéines correspondantes n'ont pas encore été élucidées. (Figure 7)

1- ABHD1/ LABH1 :

ABHD1 est localisé sur le chromosome 2 en p23.3. Le site catalytique d'ABHD1 est formé par une triade Ser-Asp-His caractéristique des peroxydases. Il code pour une protéine impliquée dans le métabolisme des xénobiotiques générés par le tabagisme (Cummins, et al., 2007). Cette protéine aurait par ailleurs un rôle protecteur contre l'hypertension artérielle (Stoelting, et al., 2009). Son taux d'expression est élevé au niveau du muscle, du foie et de la peau (Edgar, 2003).

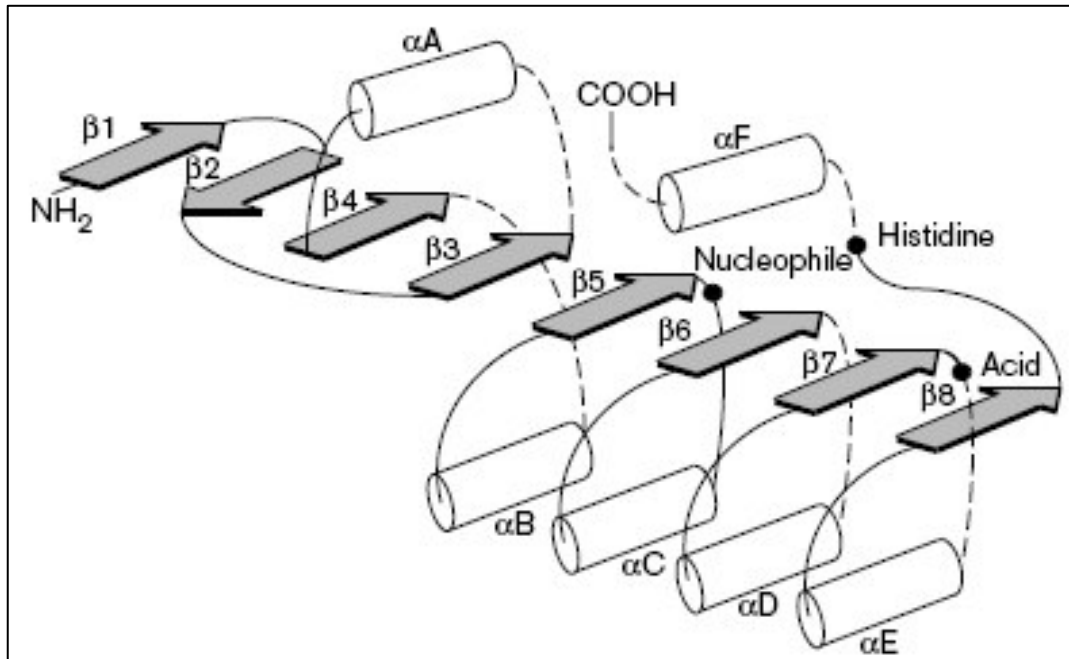


Figure 5 : Diagramme de la structure secondaire canonique du repliement des α/β hydrolases.

Les hélices α et les feuillets β sont respectivement représentés par des cylindres blancs et des flèches grisées. La triade catalytique est indiquée par des points noirs. Les lignes en trait interrompu représentent les endroits où l'insertion est possible. (D'après Marco Nardini 1999)

Abh4	141	ILLGHS LGGF L
Abh5	150	ILLGHNLGGFL
Abh6	143	HLIGTSMGGHV
Abh14b	106	VVISPSLS GMY
Abh14a	142	VLVSPSLSGSY
Abh9	232	ILVSHDWGASTL
Abh7	162	VLIGHDWGGMI
Abh1	206	LAVGISFEGGIL
Abh3	215	LAAGVSMGGML
Abh2	202	VVVCFSLGCNI
Abh10	138	ILVGS SLGGWL
Abh12	241	YIWGHS LGTG V
Abh13	188	FLFGRSLGGAV
Abh8	239	VLIGHSYGVFF
Abh11	128	VLVGHSMGGKT

Figure 6 : Alignement multiple du site nucléophile des 15 membres de la superfamille des α/β hydrolases humaines (D'après Simon and Cravatt, 2006)

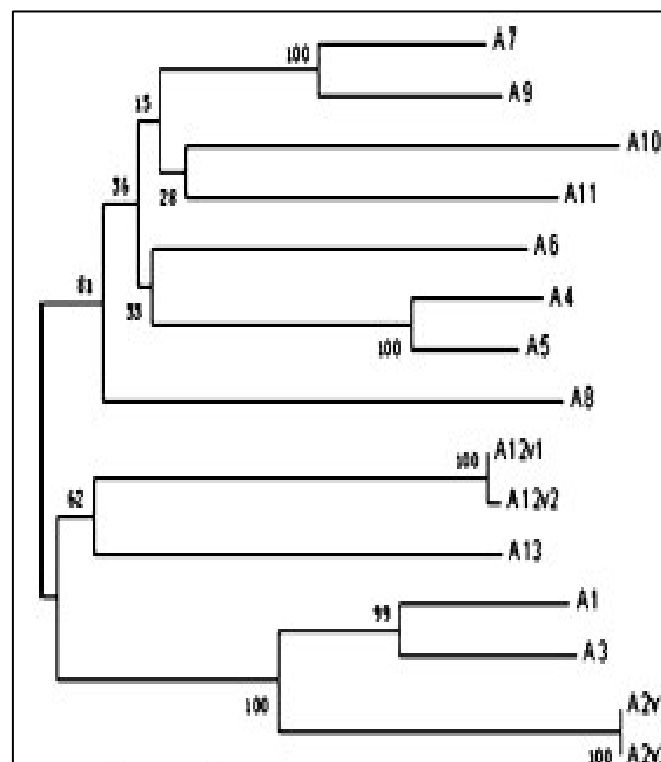


Figure 7 : Arbre phylogénétique des α/β hydrolases humaines

(D'après Li et al., 2009)

2- ABHD2 :

ABHD2 est localisé sur le chromosome 15 en 15q26. Elle a principalement été étudiée par Miyata et al qui a montré son rôle dans la migration des cellules musculaires lisses endothéliales (Miyata, et al., 2008; Miyata, et al., 2005). Dans une seconde étude menée par la même équipe, l'expression d'*ABHD2* humaine a été retrouvée élevée dans les monocytes se différenciant en macrophage : étape critique dans le développement de l'athérosclérose (Miyata, et al., 2008). *ABHD2* est aussi impliquée dans le processus inflammatoire et l'emphysème pulmonaire. En effet une mutagenèse dirigée d'*ABHD2* chez la souris provoque une infiltration inflammatoire au niveau des alvéoles pulmonaires ainsi qu'une augmentation de l'apoptose, suite à la baisse significative du taux de phosphatidylcholine dans le liquide de lavage alvéolaire (Jin, et al., 2009).

3- ABHD3/ LABH3 :

ABHD3 est localisé sur le chromosome 18 en q11.1. Il code pour une protéine intégrale de la membrane plasmique. Son site catalytique est formé par une triade Ser-Asp-His caractéristique des peroxydases. Aucune implication physiologique, ni pathologique ne lui a été attribuée à ce jour.

4- ABHD4 :

ABHD4 est localisé sur le chromosome 14 en q11.2. Il est impliqué dans la voie de synthèse accessoire des endocannabinoïdes. *ABHD4* est une lyso-NAPE (N-acyl phosphatidyl-ethanolamine) lipase aussi bien au niveau du SNC qu'au niveau des tissus périphériques. Il permet la synthèse des endocannabinoïdes N-acétyl-ethanolamines (NAE) à partir des lysoNAPE. La protéine *ABHD4* est exprimée à des taux élevés au niveau du SNC, suivi par ordre décroissant par les testicules, les reins, et le foie (Simon and Cravatt, 2006).

5- ABHD5/ CGI58/ NCIE2 :

ABHD5 est localisé sur le chromosome 3 en 3p21.33. Son homologie avec *ABHD 4* est de 55%. *ABHD5* ne possède aucune activité catalytique directe à cause de la présence d'une asparagine (N153) à la place de la sérine nucléophile (Simon and Cravatt, 2006). Une mutation dans *ABHD5* a été impliquée dans le syndrome de Chanarin-Dorfman, un trouble

autosomique récessif du métabolisme inné des lipides neutres. Cette maladie se traduit par une accumulation multi-systémique des triglycérides, avec tout de même des concentrations plasmatiques normales (Brown, et al., 2007; Doganci, et al., 2005; Lefevre, et al., 2001; Schweiger, et al., 2009). Le syndrome de Chanarin-Dorfman regroupe les manifestations cliniques suivantes : Stéatose hépatique, hépato-splénomégalie, cardiomyopathie, cataracte bilatérale, retard de croissance, ataxie, surdité neurosensorielle bilatérale, nystagmus horizontal, un retard mental et une ichtyose. Récemment, Schweiger a montré que ABHD5 même dépourvu de son activité catalytique intervient par un mécanisme non encore élucidé, dans la stimulation l'hydrolyse des TG (Schweiger, et al., 2009).

6- ABHD6 :

ABHD6 a été identifié en 2006 par Maier et al, *ABHD6* est localisé sur le chromosome 3 en 3p14.3. Il s'agit comme ABHD3, d'une protéine intégrale de la membrane plasmique. Il s'agit d'un gène cible de l'EBV, impliqué dans le lymphome de BURKITT, le lymphome de Hodgkin et le lymphome post-transplant (Maier, et al., 2006). Il a par ailleurs été impliqué dans le métabolisme et la signalisation au niveau du système nerveux central, spécifiquement dans l'hydrolyse des Endocannabinoïdes (2AG) (Blankman, et al., 2007). Récemment, devant la constatation d'une expression différentielle dans les cellules tumorales pulmonaires, une implication possible d'ABHD6 dans la tumorigénèse a aussi été évoquée (Li, et al., 2009)(Figure 8).

7- ABHD7 :

ABHD7 est Localisé sur le chromosome 1 en 1p 22.1. Il s'agit d'une protéine intégrale de la membrane plasmique, qui possède un acide aspartique nucléophile, ce qui lui confère une activité époxyde hydrolase.

8- ABHD8 :

ABHD8 est localisé sur le chromosome 19 en 19p13.11, il s'agit d'une époxyde hydrolase qui contient un domaine lipase-sécrétoire.

9- ABDH9/EPHX3/epoxide hydrolase 3 :

ABHD9 est localisé sur le chromosome 19 en 19p13.12. Il s'agit d'un marqueur de récurrence du cancer de la prostate (Weiss, et al., 2009). Son dosage contribue ainsi à un meilleur suivi thérapeutique (Cottrell, et al., 2007).

10- ABHD10 :

ABHD10 est localisé en 3q13.2 ; il s'agit d'une Sérine peptidase mitochondriale. Elle contient un domaine en doigt de zinc de type FYVE.

11- ABHD11/ WBSCR21 :

ABHD11 est localisé sur le chromosome 7 en 7q11.23. Il code pour une protéine du réticulum endoplasmique. Elle agit en tant que GPI inositol-deacylase. Cette deacylation est importante pour assurer un transport efficace des protéines GPI-ancrées du RE vers l'appareil de Golgi. Ce gène est délété dans le syndrome de Williams Beuren, sans que son rôle exact dans ce syndrome soit pour autant connu.

12- ABHD12 :

ABHD12, aussi connue sous le nom de Monoacylglycerol lipase ou encore 2AG hydrolase, a été isolée récemment en 2007 par Blankman et al (Blankman, et al., 2007), et dès 2007 l'équipe de Nephi Stella ont suspecté son rôle dans l'hydrolyse du 2AG (Muccioli, et al., 2007) . *ABHD12* est une glycoprotéine intégrale de la membrane. Il s'agit d'une molécule membranaire à traversée unique, qui a perdu son signal peptidique « single-pass membrane protein ».

ABHD 12 sera abordée plus en détail dans la partie E de ce chapitre.

13- ABHD12 B :

ABHD12B est localisé sur le chromosome 14 en 14q22.1. Il est très homologue à *ABHD12*. Aucune fonction n'a encore été attribuée à cette protéine.

14- ABHD13 :

ABHD13 est localisé sur le chromosome 13 en 13q33.3, il code pour une protéine intégrante à la membrane. Aucune fonction n'a encore été attribuée à cette protéine.

15- ABHD14 :

ABHD14 est localisé sur le chromosome 3 en 3p21.2. Deux isoformes sont décrites ABHD14A et B localisées sur le même chromosome. L'homologue chez la souris, *Zic1*, (Hoshino, et al., 2003) est exprimé dans les granules cérébelleux.

E- ABHD12 :

1- Localisation chromosomique et structure nucléotidique :

ABHD12 est localisé sur le chromosome 20 en 20p11.21. Il couvre 96.24 kb, de la position 25275380 pb à la position 25371477 pb (UCSC, Février 2009). Sa séquence nucléotidique est composée de 13 exons qui codent pour une protéine de 398 acides aminés. *ABHD12* est transcrit sur le brin négatif, en 4 ARNm différents.

2- Localisation subcellulaire de la protéine:

Son site actif « catalytique » se situe du côté luminal. Elle présente du côté N-terminal deux domaines transmembranaires: un premier du 5^{ème} acide aminé à l'acide aminé en position 24 et un deuxième de l'acide aminé 31 à 53 (prédits par SMART). La présence de ces 2 domaines fait d'ABHD12 une protéine intégrante à la membrane (Cravatt, et al., 1996). Son extrémité C-terminale se situe du côté luminal (Figures 8 et 9).

3- Homologies :

Il existe une homologie de 93 % entre la protéine humaine et murine avec une E-value=0.0. Il existe également un orthologue d'ABHD12 chez le vers nématode *C. elegans* (gène 5I465 (e=10-64,)). Les homologues chez les protozoaires, levures et plantes ne sont pas des orthologues (*A.thaliana* (gènes AT1G13610 (e=3 10-13,)), WAV2 (e=10-11,)), AT2G24320 (e=5 10-11,)), AT3G01690 (e=8 10-11)). La structure cristalline disponible de la protéine la plus proche est celle de la proline iminopeptidase-related protein TTHA1809 de *Thermus thermophilus* HB8 (PDB 2yys).

4- Alignement multiple de la séquence d'ABHD12 avec les membres de la sous familles des α/β hydrolases :

Un alignement multiple de toutes les α/β hydrolases montre que ABHD12B suivie par ABHD13 sont les plus homologues à ABHD12. En effet ABHD12B dérive d'une duplication récente d'ABHD12.

5- Fonction :

α/β hydrolase domain containing protein 12 est aussi connue sous le nom de Monoacylglycerol lipase ABHD12 ou encore 2AG hydrolase. Elle est classée EC3.1.1.23 dans la nomenclature EC. L'existence d'ABHD12 a été suspectée en 2007 par l'équipe de Nephi Stella (Muccioli, et al., 2007). En effet en 2007, Muccioli et al. constate la présence d'une activité endocannabinoïde hydrolase dans les cellules microgliales murines connue déficiente en Monoacylglycérol lipase (MAGL), l'unique 2AG hydrolase connue jusqu'à lors. Ils concluent alors à la présence d'une nouvelle hydrolase, non encore identifiée. Quelques mois plus tard, JL Blankman, caractérise au niveau des cellules cérébrales murines, les protéines responsables de cette activité d'hydrolyse indépendante de MAGL : ABHD6 et ABHD12 (Figure 10).

Chez le modèle murin, l'hydrolyse du 2AG est assurée par 3 hydrolases : ABHD12, ABHD6 et la MAGL (Figures 8, 9 et 10). La MAGL est responsable de l'hydrolyse de 85% du 2AG, suivie par ABHD12 ; 9% et ABHD6 ; 4%. L'hydrolyse des 2% restantes est assurée par d'autres hydrolases telles que la Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) (Figure 9). ABHD12 est en effet une enzyme régulatrice de la voie de signalisation des endocannabinoïdes (Blankman, et al., 2007; Dinh, et al., 2002). et donc une bonne cible thérapeutique dans le traitement de la douleur.

F- Le 2AG : Sa voie de dégradation et son implication dans les processus pathologiques :

Le 2AG est un lipide endogène, il forme avec l'arachidonyle-éthanolamide (AEA) les deux principaux lipides cannabinoïdes endogènes, encore appelés endocannabinoïdes.

1- Les endocannabinoïdes :

Définition : Les cannabinoïdes endogènes ou endocannabinoïdes, sont des lipides endogènes. Ils interviennent dans la signalisation rétrograde au niveau du système nerveux central. Ils contrôlent ainsi les réponses comportementales à la douleur ou l'anxiété. Ce sont également d'importants stimulateurs de la prise alimentaire et de la lipogenèse. Au niveau central, les endo-cannabinoïdes stimulent la prise alimentaire, en modulant l'expression de

neuropeptides orexigènes et anorexigènes. À la périphérie, ils stimulent la lipogenèse dans le foie et le tissu adipeux blanc.

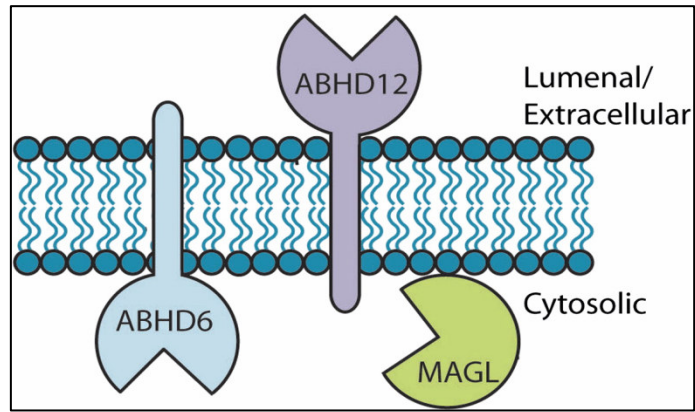


Figure 8 : Représentation de l'orientation cellulaire des 3 principales 2AG hydrolases : MGL, ABHD6 et ABHD12 (D'après JL Blankman 2007)

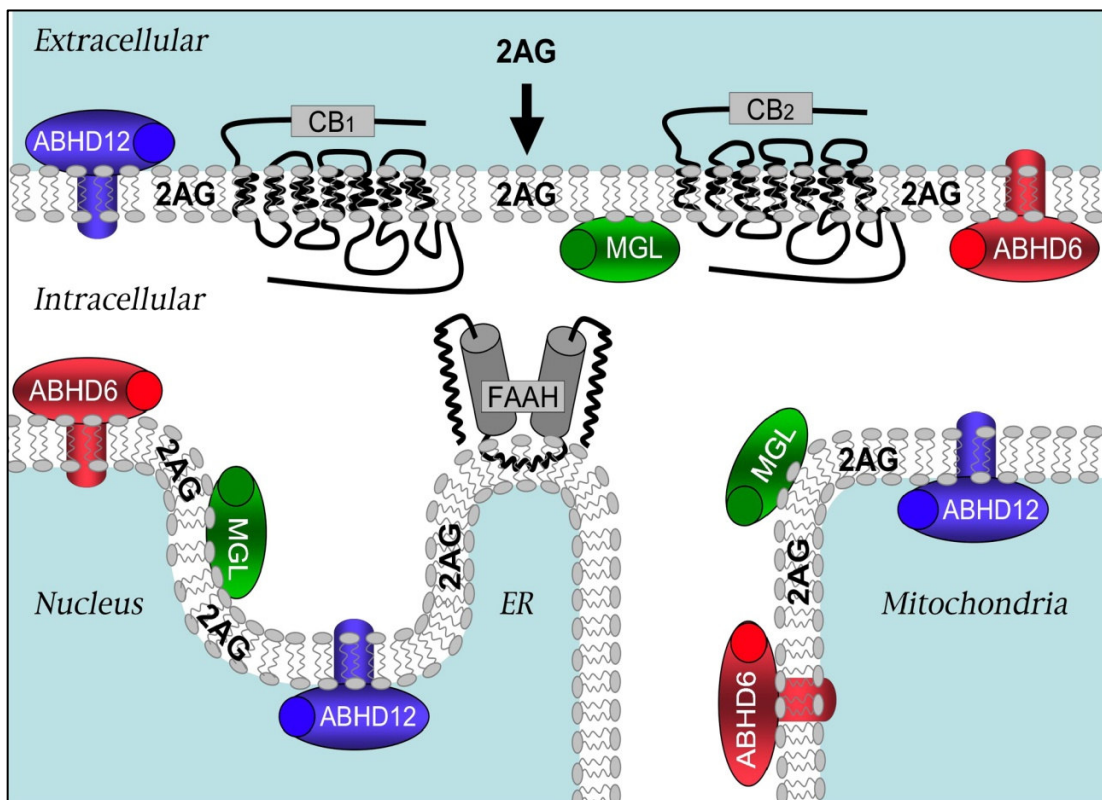


Figure 9 : Les localisations subcellulaires possibles des 2 Acyl-Glycérol hydrolases:

MAGL, ABHD6 et ABHD12 peuvent être localisées au niveau de la membrane plasmique, au niveau de la membrane nucléaire et au niveau de la membrane mitochondriale. Les récepteurs aux cannabinoïdes CB1 et CB2 sont très abondants au niveau de la membrane plasmique, alors que la FAAH est plus abondante au niveau de la membrane du RE. (D'après William Marris 2007)

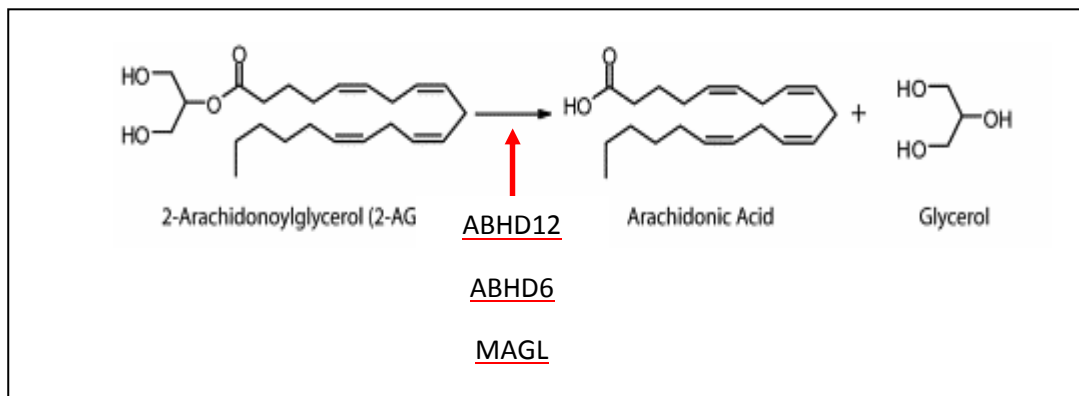


Figure 10 : Structures du 2-Arachidonoylglycerol et ses produits d'hydrolyse : Réaction catalysée par ABHD12 (D'après JL Blankman 2007)

Le système des endocannabinoïdes est un champ de recherche très vaste et très actif, vu l'implication des EC dans une très grande partie des processus physiologiques et physiopathologiques.

2- Le 2AG :

Nous ne décrivons dans ce paragraphe que le 2AG : Substrat d'ABHD12.

Le 2AG remplit les 3 critères d'appartenance aux endocannabinoïdes (EC) : (i) il inactive les récepteurs des cannabinoïdes; (ii) il est produit par les neurones de manière activité dépendante (iii) il est rapidement éliminé. Sa dégradation est restée jusqu'en 2007 en très grande partie inconnue. Jusqu'en 2007, seule la MAGL était connue comme hydrolase du 2AG (Blankman, et al., 2007; Dinh, et al., 2002).

a- Sites de synthèse et de dégradation :

Le 2AG est un neuromodulateur rétrograde. Il est synthétisé dans le SNC, au niveau de la membrane post-synaptique, il est ensuite transporté au niveau pré-synaptique en suivant un courant rétrograde (Di Marzo, et al., 2006; Hermann, et al., 2006; Jonsson, et al., 2006). Les AG lipases sont préférentiellement exprimées au niveau du système nerveux central. Elles sont localisées au niveau du cytosol et des membranes intra-cellulaires du côté pré-synaptique. Elles sont localisées aussi bien au niveau du cortex cérébelleux, dans la cellule de Purkinje qu'au niveau des cellules pyramidales principales du cerveau (Fernandez-Espejo, et al., 2005).

b- Fonction :

Le 2AG est impliqué dans une multitude de voies de signalisation, telles que celles de la douleur (Hohmann and Suplita, 2006), l'appétit (Kirkham and Tucci, 2006), de l'anxiété (Witkin, et al., 2005), de la fertilité (Wang, et al., 2006), de la réponse immune (Ashton, 2007; Ashton and Glass, 2007). En plus de ces fonctions, de Fonseca cite le rôle des endocannabinoïdes dans l'apprentissage et la motricité involontaire (Navarro, et al., 1998).

3- Les récepteurs aux endocannabinoïdes :

Les EC remplissent leurs divers rôles physiologiques et physiopathologiques via deux récepteurs CB1 et CB2. Ces deux récepteurs sont principalement pré-synaptiques. Ils sont rencontrés au niveau des tissus périphériques et du SNC. Ils contrôlent durant le développement cérébral, la différenciation cellulaire (Rueda, et al., 2002). Ils sont aussi retrouvés dans les tumeurs développées à partir de cellules microgliales.

La distribution de CB1 et CB2 au niveau des tissus périphériques, reflète la distribution des cellules qui les portent. Dans le système nerveux central, cette distribution est beaucoup plus complexe et structurée. Elle reflète clairement l'importance de ce système dans la transmission synaptique. Au niveau de l'hippocampe, par exemple, la distribution de CB1 et CB2, des EC et des hydrolases est complémentaire, alors que dans le thalamus il existe un réel déséquilibre entre l'absence de CB1 et une activité accrue de MAGL. (de Fonseca and Schneider, 2008; Fernandez-Espejo, et al., 2005)

4- La physiologie cellulaire :

Les endocannabinoïdes sont produits et sécrétés suite à une stimulation Ca^{++} dépendante des récepteurs CB1 et 2 ou suite à une dépolarisation cellulaire. Une fois produits, ils vont agir sur la cellule émettrice ou les cellules environnantes. Au niveau du SNC, la haute densité en récepteurs CB1 et 2 au niveau des synapses GABAergiques et glutamatergiques, suggère leur implication dans la transmission synaptique.

5- Implication de la voie du 2AG dans la neuro-dégénérescence :

Comme mentionné dans le paragraphe 2.b relatif à la fonction du 2AG, ce lipide endogène est impliqué dans une très grande majorité des processus physiologiques et physiopathologiques. Nous ne détaillerons ici que le mécanisme physiologique et physiopathologique qui implique le 2AG dans le processus de neuro-dégénérescence.

Une fois transporté par le courant rétrograde en position présynaptique, le 2AG peut être soit hydrolysé par ABHD12, ABHD6 et MAGL en acide arachidonique et glycérol (Figure 10), soit subir une réaction d'oxydation par la Cyclo-oxygénase 2 (Cox2) en prostaglandines glycerol ester (PGE). Deux autres enzymes, les P450-hydroxygénase et P450-époxygénase sont responsables de la transformation du 2AG respectivement en acide 2, hydroxy eicosatétraénoïque; et acide 2 époxyeicosatétraénoïque. (Figure 11) (Guindon and Hohmann, 2008; Hohmann and Suplita, 2006).

La Cox 2 joue un rôle clef dans la neuro-inflammation grâce à son substrat le PGE. Le PGE est un neuromodulateur de la transmission glutamatergique et de la plasticité synaptique. Ce substrat est impliqué dans les pathologies neurodégénératives telles que la sclérose en plaque, la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer. Une surexpression du PGE, stimule la transmission glutamatergique stimulatrice (Sang, et al., 2005), au même titre qu'une altération de la transmission gabaergique ou une hyperstimulation des récepteurs glutamatergiques (Toscano, et al., 2008).

La figure 11 illustre qu'une inactivation d'ABHD12, va dévier le 2AG vers la voie d'oxydation par la Cox2, et provoquer ainsi une surproduction du PGE. La présence de PGE en quantités neurotoxiques est à l'origine de l'inflammation du SNC et de la neurodégénérescence. (Centonze, et al., 2007; Maccarrone, et al., 2007; Yang and Chen, 2008; Yang, et al., 2008).

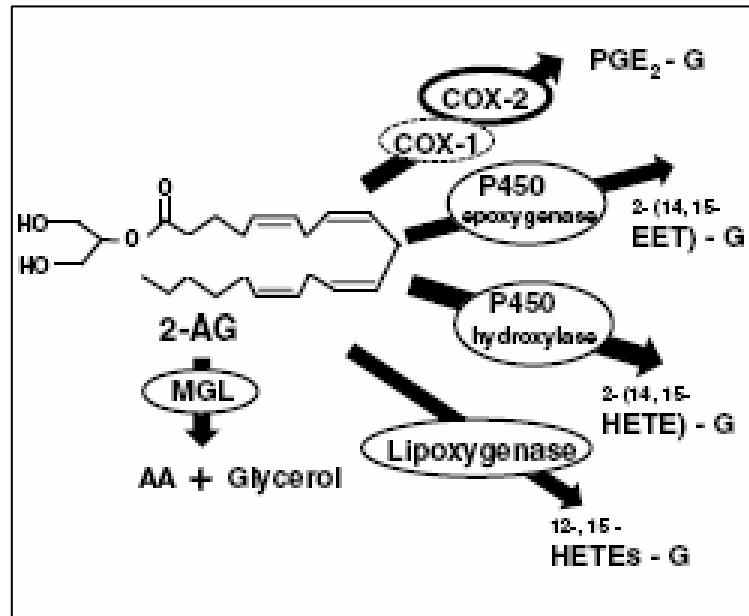


Figure 11 : le 2AG substrat de plusieurs enzymes

(D'après J Guindon and AG Hohmann 2008)

IV- Stratégie d'identification des gènes impliqués dans les ataxies récessives :

Le choix de la stratégie utilisée pour identifier un gène responsable de maladie génétique dépend des ressources et de la quantité d'informations disponibles sur la pathogénie de la maladie. Deux stratégies peuvent être utilisées pour identifier les gènes responsables de maladie : le clonage fonctionnel (Gitschier, et al., 1984) et le clonage positionnel (Collins, 1992; Royer-Pokora, et al., 1986) (Figure 12).

A- Le clonage fonctionnel :

Le clonage fonctionnel est historiquement la première stratégie utilisée pour identifier des gènes responsable de maladie. Il consiste en l'utilisation des connaissances sur la fonction d'un gène morbide non identifié. Deux approches sont essentiellement utilisées : celle qui repose sur la disponibilité du produit purifié du gène (production d'oligonucléotides correspondant à la « rétrotraduction » de la protéine ou d'anticorps dirigés spécifiquement contre le produit du gène) et celle pour laquelle un test fonctionnel du gène peut être réalisé (complémentation fonctionnelle). A part pour le déficit en vitamine E et l'abetalipoprotéïnémie, cette stratégie n'a pas trouvé d'application dans les ataxies récessives, Cette approche est en général fructueuse dans le cas des maladies métaboliques, comme pour l'identification de la phénylalanine hydroxylase, gène responsable de la phénylcétonurie (Robson, et al., 1982) et dans les cas des hémoglobinopathies (thalassémies et drépanocytose).

B- Le clonage positionnel et la cartographie par homozygotie:

1- Le clonage positionnel :

Le clonage positionnel correspond à l'isolement du gène uniquement à partir de sa localisation sub-chromosomique déduite de l'analyse familiale, sans nécessiter aucune information sur la pathogénèse de la maladie ou la fonction biochimique de la protéine. Cette cartographie se base sur l'analyse d'évènements de recombinaisons méiotiques qui se sont produites entre les marqueurs utilisés et le locus de la maladie. Plus un marqueur sera génétiquement proche de la mutation moins il aura de chances de recombiner avec celle-ci. Les marqueurs non liés génétiquement auront autant de chances de ségréger avec la mutation

qu'avec l'allèle sauvage. Autrement dit, pour localiser précisément la mutation, il faut chercher des marqueurs qui ne recombinent pas ou très peu avec elle ; une grande partie du clonage positionnel consiste à identifier ces marqueurs. Le lien entre la carte physique (la molécule d'ADN) et la carte génétique est donné par des marqueurs génétiques moléculaires, c'est à dire les polymorphismes, même s'il n'y a pas de relation linéaire stricte entre cM (distance génétique) et kb (distance physique). Chez l'Homme, selon la position sur le chromosome, 1cM varie le plus souvent entre 0,5 et 1,5Mb ; les régions les moins recombinogènes sont proches des centromères (Copenhaver, et al., 1998).

L'approche générale consiste à essayer de construire des cartes physique et génétique de la région, à définir la localisation sub-chromosomique, puis à identifier les gènes de la région pour mettre en évidence un gène candidat. Le clonage positionnel demeure difficile et devient de moins en moins nécessaire lorsque les informations s'accroissent, permettant une approche positionnelle du gène candidat.

La carte physique et génétique du génome humain étant actuellement bien établie, la première étape consiste à définir une région candidate la plus étroite possible, la taille de cette région déterminant le travail nécessaire pour arriver jusqu'au gène. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour localiser la région candidate.

- Analyse de liaison génétique :
 - * analyse de crossing-over ;
 - * déséquilibres de liaison.
- Analyse d'anomalies génétiques :
 - * duplications / délétions chromosomiques ;
 - * translocations / inversions chromosomiques.

L'utilisation des marqueurs génétiques polymorphes est nécessaire pour localiser un gène par analyse de liaison génétique. Par définition, un marqueur génétique doit être polymorphe et doit pouvoir être positionné sur le génome de façon non ambiguë. Il doit aussi être stable d'une génération à l'autre. Pour cartographier une mutation récessive, on adoptera des marqueurs dominants voire co-dominants (SNP, microsatellites).

Une fois la région candidate minimale déterminée, les gènes localisés dans la région sont identifiés par une recherche dans les bases de données du génome humain. Si plusieurs gènes sont présents dans l'intervalle candidat, on essaye de déterminer le meilleur gène candidat,

c'est-à-dire le gène pour lequel une perte ou un gain de fonction serait compatible avec le phénotype observé chez les patients. Un gène candidat ne sera validé que par la mise en évidence de mutations délétères spécifiquement chez les patients.

2- La cartographie par homozygotie :

Dans le cadre des maladies récessives et devant la petite taille des familles étudiées nous avons opté pour une variante du clonage positionnel, la cartographie par homozygotie (Ben Hamida, et al., 1993a; Lander and Botstein, 1987). Le principe de la cartographie par homozygotie s'appuie sur l'hypothèse selon laquelle chez un enfant atteint d'une maladie récessive rare et dont les parents sont consanguins, les deux allèles mutés du gène proviennent d'un ancêtre commun. Cependant, dans une famille consanguine, une homozygotie par descendance peut également être retrouvée dans une région chromosomique non liée à la maladie (Figure 13). En fonction du degré de consanguinité de ses parents, le nombre de régions homozygotes observées chez un individu sera plus ou moins important. Dans une famille consanguine au premier degré (parents cousins germains), on s'attend à trouver au moins un 1/16 du génome des descendants homozygote. Grâce à la haute densité en SNP des puces de génotypage, plusieurs régions homozygotes seront détectées dont bien sûr une seule comporte le gène lié à la maladie. L'ensemble des régions homozygotes autres que celle qui comprend le gène muté doivent donc être exclues, par l'analyse d'autres individus de la famille ou par l'analyse de familles supplémentaires. Ces régions sont homozygotes par hasard ou par manque d'informativité des marqueurs utilisés.

Nous avons utilisé cette stratégie dans un premier temps pour analyser l'ensemble des familles d'ataxies récessives adressées à notre laboratoire. Nous avons pour cela commencé par la validation de la stratégie de cartographie par homozygotie appliquée aux ataxies récessives. Cette étape nous a permis de retrouver le gène en cause chez 10 familles parmi 96 familles étudiées par puces de génotypage (H'mida-Ben Brahim et al., soumis à publication). La seconde étape a consisté en la recherche parmi les 86 familles restantes par clonage positionnel d'un nouveau gène d'ataxie récessive. Nous avons utilisé dans ce travail deux types de marqueurs polymorphes, les microsatellites et les SNP.

3- Identification des régions d'homozygotie :

Afin d'identifier les régions d'homozygotie chez les familles étudiées, nous avons procédé à une étude «pangénome » par génotypage de marqueurs SNP chez les atteints nés de parents consanguins. Notre stratégie consiste en l'analyse de tout le génome des atteints d'une même famille et la comparaison des ces régions d'homozygotie afin d'identifier la ou les régions communes chez les atteints. Dans un deuxième temps, les frères et soeurs sains et les parents sont analysées à l'aide de marqueurs microsatellites au niveau des régions candidates pour tester la ségrégation des haplotypes par rapport aux patients.

a- Les SNP

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). Ces marqueurs bialléliques et donc peu informatifs sont analysable sur des puces de génotypage à très haute densité ; ces puces permettent une bonne couverture de tout le génome et une analyse fine des régions d'homozygotie. Au cours de ce travail nous avons utilisé des puces GeneChip Human Mapping d'Affymetrix avec différentes densité de SNP : 10K, 50K et 6.0 (≈ 1000K). Les caractéristiques de chacune des puces sont résumées dans le tableau 5.

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.

Le protocole expérimental suit les mêmes étapes pour les 3 catégories de puces. L'ADN génomique est digéré est ensuite ligué à un adaptateur qui reconnaît les bouts cohésifs de 4 paires de bases générés par l'enzyme spécifique. Tous les fragments générés par la digestion enzymatique, peu importe leur taille, sont soumis à une ligation. Une amorce générique qui reconnaît les séquences adaptatrice est utilisée pour amplifier l'ADN précédemment digéré et ligué. Les conditions PCR sont optimisées de manière à amplifier des fragments dont la taille

varie entre 200 et 1100 pb. Les produit d'amplification correspondant à chaque enzyme sont mélangés et purifiés. Cet ADN est ensuite fragmenté et marqué à l'aide d'un anticorps anti-streptavidine biotinilé et hybridé sur la puce. (Figure 14)

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 15a). 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.

b- Spécificité de la puce 6.0 :

Cette puce comporte un panel de 1.852 million de marqueurs subdivisés comme suit : 946,000 sondes non polymorphiques « potentielles » et 906,000 SNP. Les 906,000 SNP ont tous été testés sur 500 échantillons d'ADN dont 270 échantillons HapMap. Une partie des SNP dérivent d'une sélection non biaisée de 494,000 SNP à partir des puces des générations précédentes 5.0 et 500K, dont 6,000 SNP non assignés. Au total 482,000 SNP ont été retenus pour l'inclusion sur la puce 6.0. Les 424,000 SNP restant sont des : Tag SNP, des SNP du chromosome X, Y et des SNP mitochondriaux ; 100K SNP ont été rajoutés à partir de la base de données HapMap, ainsi que quelques SNP situés au niveau de points chauds de recombinaison.

Chaque SNP est représenté par seulement 3 à 4 sondes avec appariement parfait « perfect match ». La puce 6.0 offre une des meilleures couvertures en sondes CNV En effet elle couvre jusqu'à 90.5% des 3400 variations de nombre de copies connues. Un SNP est analysé en moyenne tous les 3,23 Kb, et une sonde CNV en moyenne tous les 3,16. Au total l'information en SNP et CNV est analysé tous les 1,60 Kb en moyenne. L'utilisation de ce type de puce à très haute densité nous a permis d'identifier un effet fondateur chez 4 familles Algériennes. Ces données seront rapportées dans le chapitre résultat.

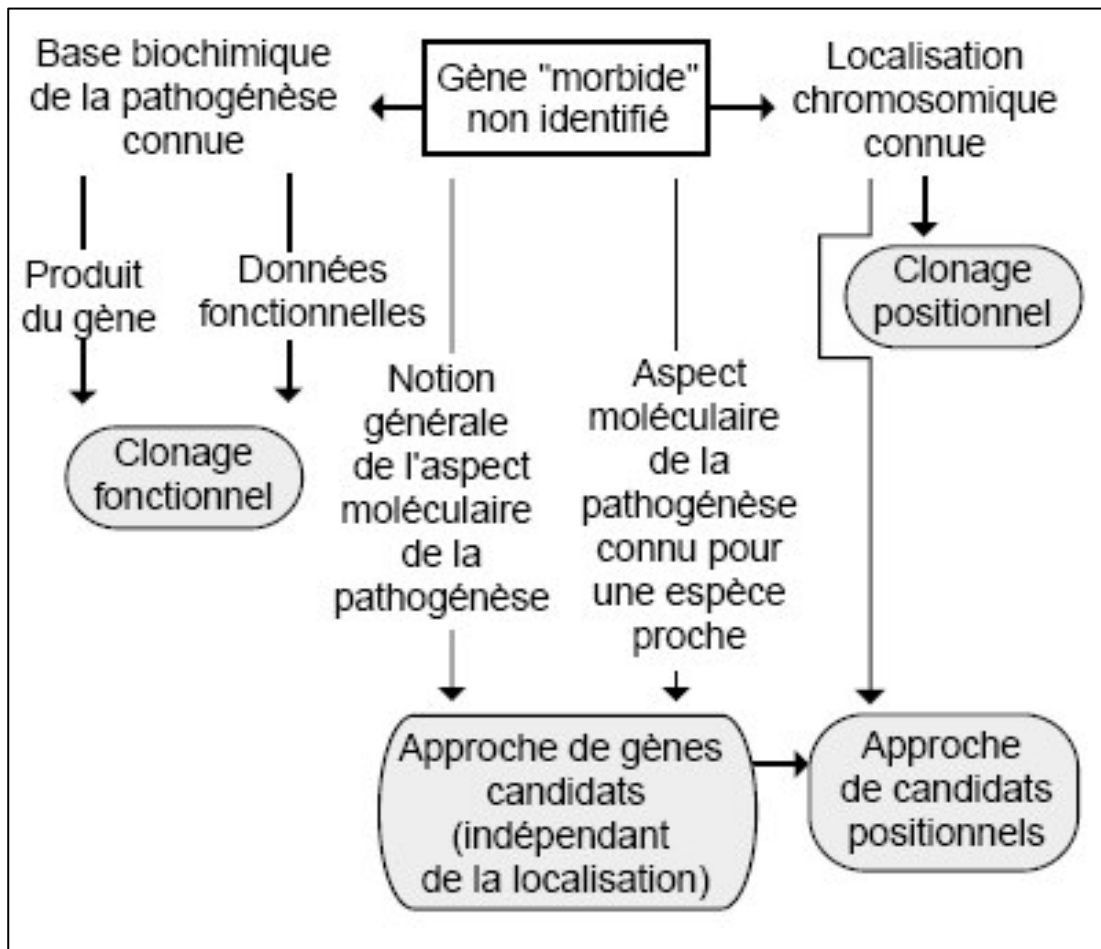


Figure 12 : Les différentes stratégies du clonage de gène

Il y a plusieurs voies pour découvrir un gène de maladie génétique, mais l'étape commune est l'identification d'un gène candidat plausible, qui pourra ensuite être testé pour des mutations chez des personnes atteintes (ex d'une anomalie génétique chez l'Homme, Strachan et Read 1998).

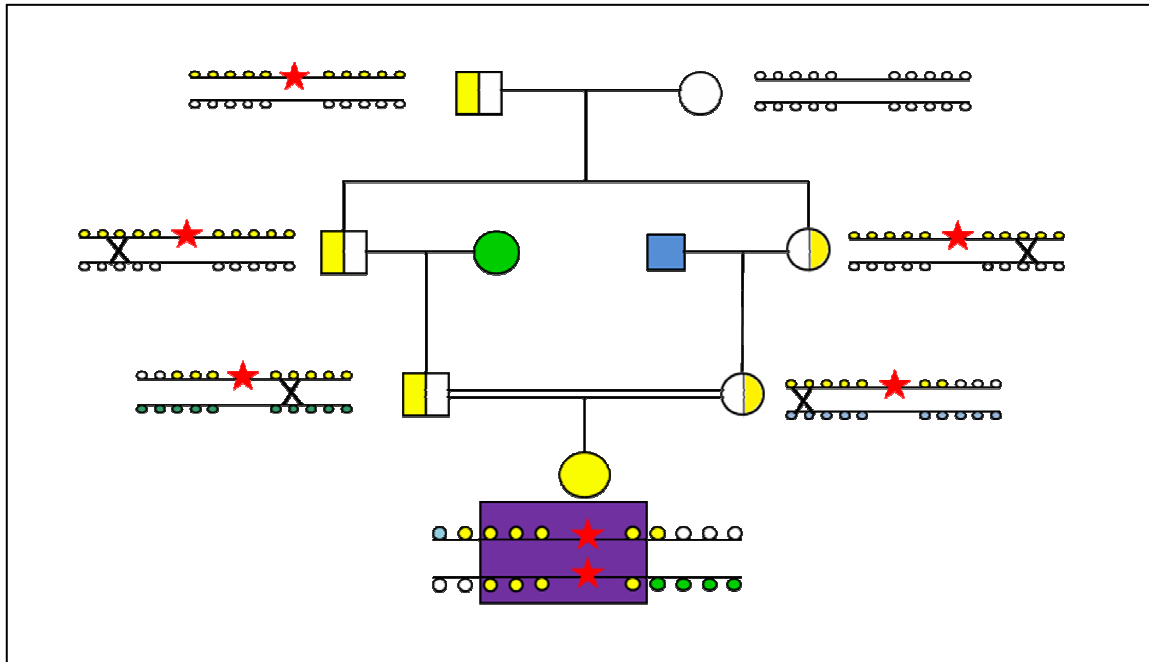


Figure 13 : Principe de la cartographie par homozygotie

Un patient atteint d'une maladie génétique rare et issu de parents consanguins a probablement hérité sur ses deux chromosomes d'une mutation (étoile rouge) 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 violet).

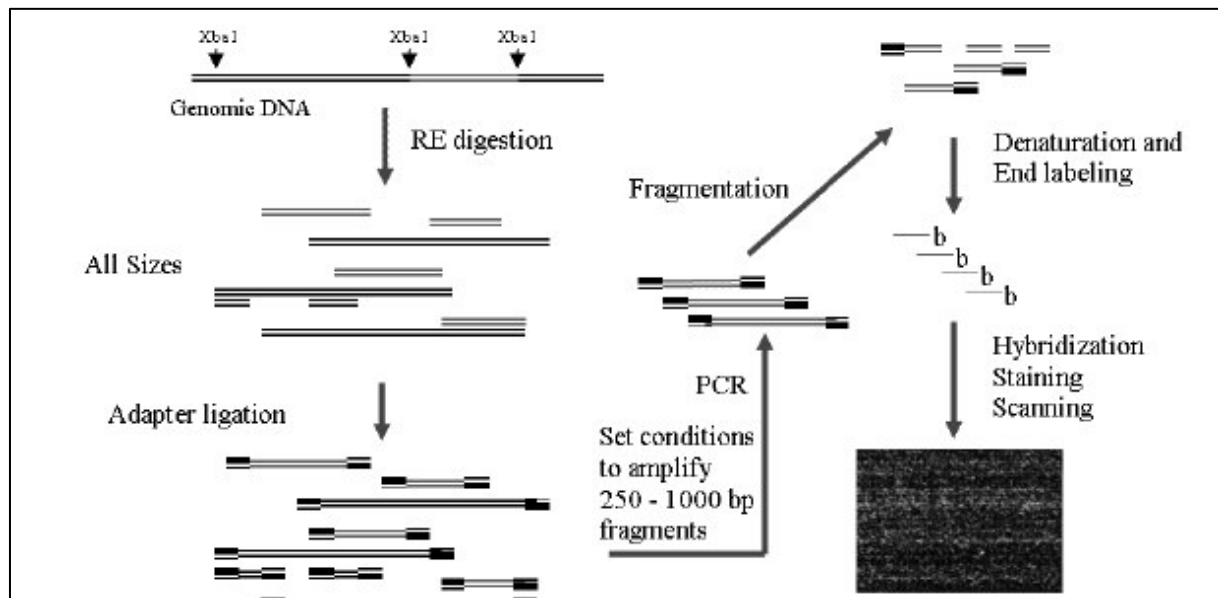


Figure 14: Etapes expérimentales de l'étude pangéome par puces de géotypage Affymetrix

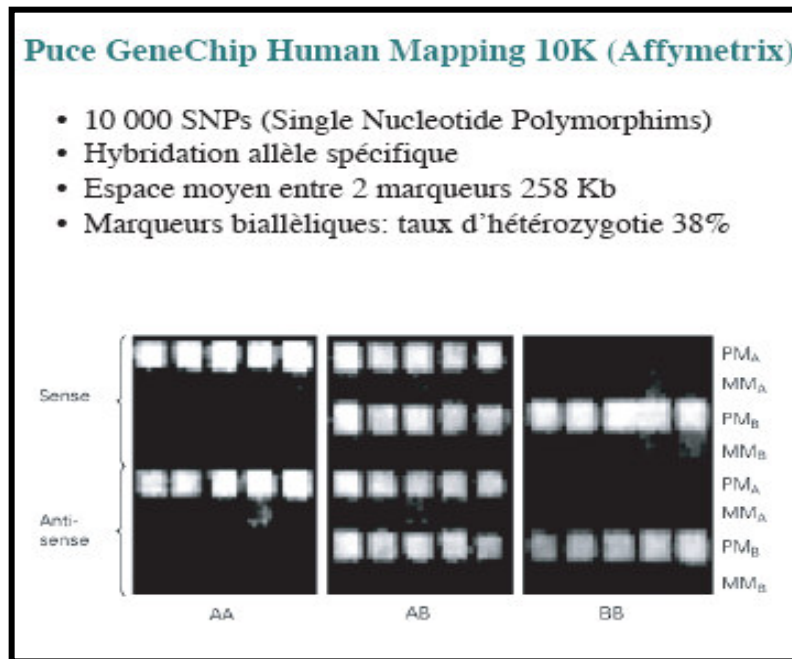
250 ng d'ADN génomique sont digérés avec une enzyme de restriction; un adaptateur est ligé aux fragments; une PCR avec une amorce complémentaire de l'adaptateur amplifie préférentiellement des fragments d'environ 250 à 1000 pb; l'ADN amplifié est fragmenté; puis marqué et hybridé sur la puce. D'après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

(L'enzymes de restriction mentionnée sur cette figure est spécifique à la puce 10K)

Tableau 5 : Caractéristiques des différentes puces de génotypage utilisées dans ce travail ainsi qu'une comparaison avec le tour du génome utilisant des marqueurs microsatellites.

Genotypage	Tour du génome en microsatellites	10K	100K (2* 50K)	6.0
Densité en marqueurs	400 microsatellites	10.204 SNP	116.204 SNP (2x 50.000)	906.000 SNP 946.000 CNV
DNA genomic nécessaire	8 µg (400 * 20 ng)	250 ng	2x 250 ng	500 ng
Enzyme de restriction	Non	XbaI	XbaI Hind III	NstI et StyI
Taille des fragments générés par PCR après digestion enzymatique	Non	200 à 1100 pb	200 à 1100 pb	200 à 1100 pb
Distance médiane entre 2 marqueurs	4.7 Mb	113 Kb	8.5 Kb	ND
Distance moyenne entre 2 marqueurs	5.6Mb	258 Kb	23.6 Kb	ND
Taille moyennes des Gap	5.9 cM	0.36	ND	ND
% d'hétérozygotie	0.76	0.38	0.3	0.267
Couverture du génome	ND	40%	92%	ND

(a)



(b)

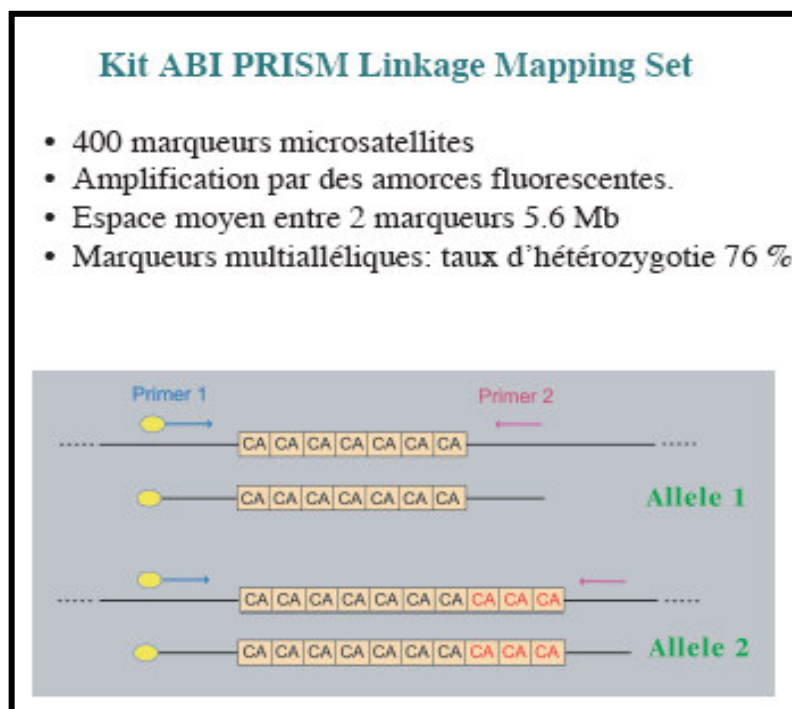


Figure 15: Comparaison des deux technologies utilisées pour l'étude pangéome :
(a)SNP, (b) Marqueurs microsatellites

c- Identification et analyse des régions homozygotes :

Les régions homozygotes sont identifiées et analysées grâce au programme HomoSNP développé par Frédéric Plevniak dans notre institut pour visualiser les régions homozygotes qui s'étendent sur plus de 15 SNP homozygotes successifs sur puces 10K et plus de 20 SNP homozygotes successifs sur puces 50K, et partagées entre les atteints d'une famille consanguine. Ce logiciel correspond à une interface graphique permettant de visualiser les régions pour lesquelles un nombre défini de SNP consécutifs sont homozygotes. Les régions homozygotes sont représentées en rose, mauve et bleu foncé 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 également de comparer ces régions d'homozygotie avec la localisation des gènes déjà connus pour une maladie donnée. Cette interface nous permet d'assigner de façon visuelle les gènes et loci d'ataxie autosomique récessive connus. La colocalisation d'un gène ou locus connu avec une région homozygote nous permet directement d'orienter l'analyse moléculaire à la recherche d'une mutation dans ce gène. Cette approche nous a permis d'identifier le gène en cause dans 10 familles consanguines parmi 96 analysées. Nous avons ainsi démontré l'efficacité d'une telle approche dans un cadre diagnostique. Je décrirai ces résultats dans le premier manuscrit cité dans ce travail.

A cause de leur haute densité la version actuelle du logiciel HomoSNP ne permet pas l'analyse des puces 6.0. L'analyse des données générées par ce type de puce se fait de façon manuelle à partir de fichiers Excel, chromosome par chromosome. Ces puces ont été dans le cas de notre étude utilisées dans le but d'analyser un locus précédemment identifié sur le chromosome 20 à l'aide des puces 10K et 50K et nous n'avons donc eu qu'à analyser ce chromosome.

4- Confirmation de l'homozygotie et réduction de la taille de la région homozygote retenue :

Comme mentionné ci-dessus, 1/16 du génome d'un enfant né de parents consanguins au premier degré est homozygote. Une fois analysé par puce SNP, le génome de ces patients

révèle un grand nombre de régions homozygotes, dont toutes sauf une sont à exclure. Un certain nombre de ces régions sera homozygote à cause du manque d'informativité des SNP. Ces régions faussement homozygotes peuvent être exclues grâce à une analyse par des marqueurs plus polymorphes : les microsatellites. L'analyse des microsatellites chez tous les atteints, les parents et la fratrie saine d'une même famille aide beaucoup à réduire la ou les zones d'homozygotie retenues grâce à l'informativité de ces marqueurs.

a- Les marqueurs microsatellites :

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 répétitions des 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, 2000a; Schlotterer, 2000b). 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 (Figure 15b).

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. 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 par le CNG comprend 400 couples d'amorces fluorescentes, permettant l'amplification de microsatellites hautement informatifs, sélectionnés dans la carte du Génethon (Dib, et al., 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).

Dans notre laboratoire, le génotypage de tous les microsatellites est réalisé en utilisant une même amorce dite "universelle" marquée avec un fluorophore. 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. 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).

Bien que les marqueurs microsatellites soient hautement informatifs et bien répartis dans tout le génome, leur faible densité nous fait courir le risque de ne pas identifier une petite région d'homozygotie pouvant contenir le gène muté. Cependant l'identification de plusieurs nouveaux gènes s'est faite grâce à un tour du génome utilisant le kit ABI prism Linkage mapping set qui comprend 400 marqueurs microsatellites hautement informatifs sélectionnés dans la carte du génethon. Cette approche a permis d'identifier dans notre laboratoire 4 gènes d'ataxie récessive (AOA1, AOA2, AVED et GAN) et de localiser les gènes de 5 autres maladies génétiques (la maladie de Refsum, le syndrome de Marinesco-Sjögren, le syndrome de Joubert de type 3, l'ataxie avec cécité et surdité (CABD) et l'ataxie avec épilepsie localisée en 16p). L'acquisition en 2004 de la plateforme de génotypage par puce SNP dans notre institut, a déclassé l'utilisation de ces marqueurs en seconde intention après les SNP.

5- Identification des gènes candidats

Quand l'intervalle de liaison avec les familles disponibles on ne peut plus réduire, c'est-à-dire quand tous les événements de recombinaison ont été précisément cartographiés, il reste à chercher une mutation dans cette région homozygote. À cette étape, selon que le locus est grand ou petit on ne suivra pas exactement le même ordre des stratégies. Si le locus est grand, on ne peut pas se permettre de séquencer un par un, tous les gènes. Il faudra essayer de

commencer par les gènes candidats dont la fonction se rapproche le plus avec des gènes connus impliquée dans la pathologie étudiée. Ce travail est long et fastidieux.

Si la fenêtre est petite et ne contient que quelques gènes, on peut séquencer systématiquement tous les gènes de l'intervalle. Ceci n'empêche pas de chercher en priorité une mutation dans les gènes candidats par la fonction. Il faut cependant garder à l'esprit que le gène recherché peut avoir une nouvelle fonction qui n'a pas encore été rapportée dans ce type de pathologie ou que le gène muté soit de fonction inconnue au moment de sa découverte.

Nous avons dans ce travail de thèse opté pour une stratégie d'identification de gènes candidats qui utilise une combinaison d'informations positionnelles et non positionnelles. En effet, les approches indépendantes de la position aboutissent rarement et les approches uniquement dépendantes de la position sont souvent insuffisantes car les régions candidates contiennent souvent un très grand nombre de gènes. De ces deux stratégies découle notre approche « du gène candidat positionnel ». Cette approche a, conformément aux prévisions de Collins en 1995, fait ses preuves 15 ans après (Collins, 1995) (Figure 16).

a- Les critères de sélection de gène candidat

Dans le cadre des ataxies récessives, nous avons retenu pour définir les gènes candidats les caractéristiques fonctionnelles suivantes des protéines correspondantes, :

- Protéine impliquée dans la réparation de l'ADN et le métabolisme des polynucléotides
- Protéine mitochondriale
- Protéine fer-soufre
- Protéine impliquée dans le stress oxydant
- Protéine qui interagit avec le cytosquelette

Cette liste n'est en aucun cas exhaustive. (Tableau 6)

Cette sélection est basée sur la connaissance des gènes d'ataxie récessive précédemment identifiés.

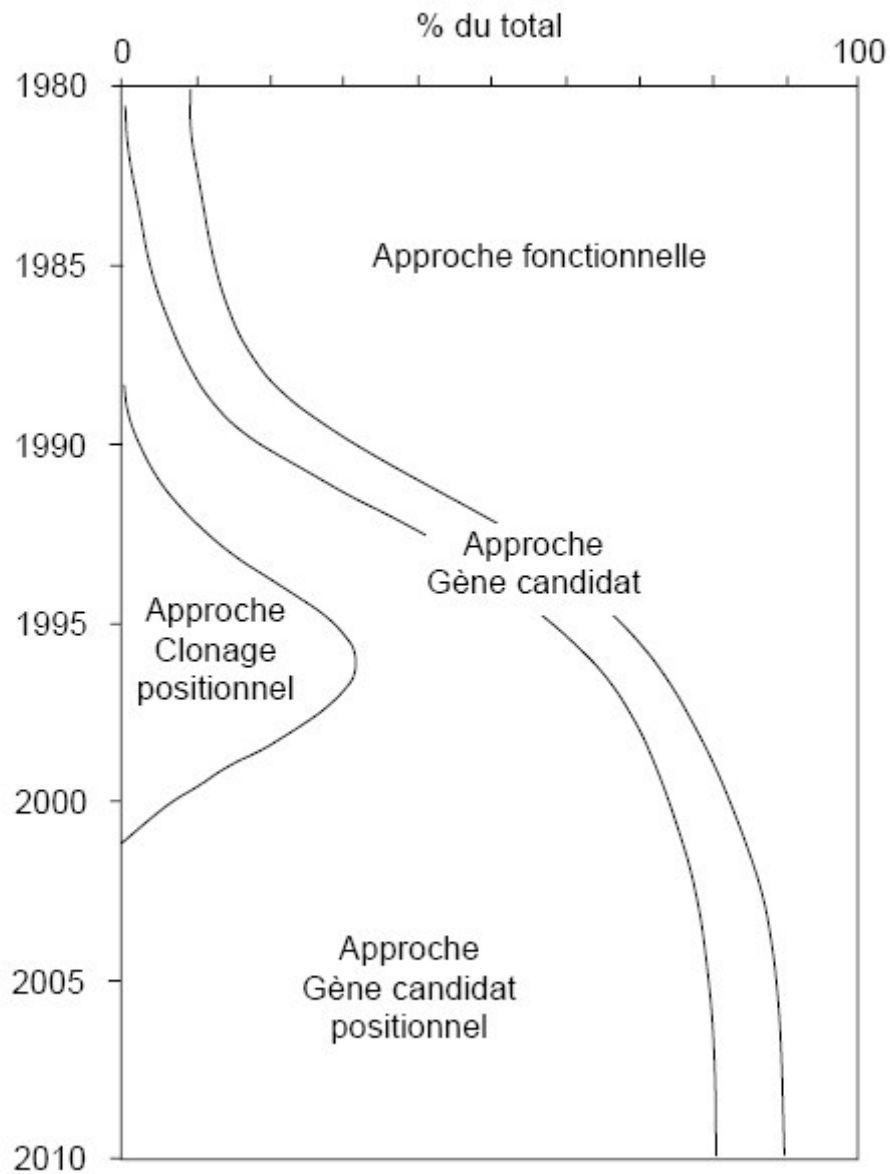


Figure 16: Succès comparés des différentes approches pour cloner un gène impliqué dans une maladie génétique chez l'Homme (D'après Collins et al. 1995).

Tableau 6 : Classification des gènes candidats selon la fonction de leur protéine

Mitochondrie Détoxification des radicaux	Réparation de l'ADN Métabolisme des polynucléotides	Autres mécanismes
Ataxie de Friedreich (FRDA, Campuzano et al. 1996)	Ataxie-télangectasie (AT)	Ataxie spastique du Charlevoix-Saguenay (ARSACS)
Ataxie liée à l'X avec anémie sidéroblastique (XLSA/A)	Ataxie-télangectasie-like (ATLD)	Ataxie cérébelleuse récessive type1 (ARCA1)
Ataxie spino-cérébelleuse à début infantile (IOSCA)	Ataxie avec apraxie oculomotrice 1 (AOA1, Moreira et al. 2001)	
mutations POLgamma (SANDO and MIRAS)	Ataxie avec apraxie oculomotrice 2 (AOA2, Moreira et al. 2004)	
Ataxie avec déficit en vit E (AVED, Ouahchi et al. 1995)	Ataxie spinocérébelleuse avec neuropathie axonale (SCAN1)	
Abêtalipoprotéïnémie (ABL)		
Ataxie cérébelleuse récessive type2 (ARCA2, Lagier-Tourenne et al. 2008)		

V- Séquençage :

Le séquençage s'est révélé être une étape incontournable au cours de ce travail. Il est utilisé en première intention à la recherche de mutation dans les gènes candidats d'un locus donné prédéfini par clonage positionnel. Le séquençage est aussi utilisé en seconde intention après analyse par la méthode HRM (high resolution melting) permettant de détecter des profils de dénaturation variants, indiquant la présence de variations nucléotidiques.

A- Séquençage direct :

Au cours de ce travail, la recherche de mutation a été faite par PCR et séquençage direct des exons et des séquences introniques flanquantes. Le produit PCR est purifié en utilisant le Montage PCR96 Cleanup Plates (Millipore, Bedford, MA). La PCR séquence est faite à l'aide du kit BigDye terminator kit (Applied Biosystems). Le produit de séquence est migré sur l'analyseur génétique ABI PRISM 3100. La lecture de séquence est faite à l'aide du logiciel Seqscape 2.5 software (Applied Biosystems). La ségrégation parentale des polymorphismes et mutations retrouvée est analysée chez tous les membres disponibles d'une même famille.

B- Analyse de profils anormaux détectés par HRM :

Les produits PCR des exons et des séquences introniques flanquantes sont d'abord analysés par la méthode HRM. Les profils anormaux détectés par HRM correspondent aux profils qui s'écartent du groupe témoin inclus dans la plaque PCR en nombre majoritaire. Les ADN correspondant à ces profils variants sont par la suite analysés par séquençage. Les profils variants peuvent correspondre ainsi soit :

- à un ou plusieurs polymorphismes connus inclus dans la séquence amplifiée,
- à une ou plusieurs variations non répertoriées dans les bases de données de polymorphismes
- à la mutation retrouvée chez le cas index.

VI- La fusion haute résolution (ou HRM pour High Resolution Melting) :

Il est souvent difficile d'identifier des mutations et surtout de les interpréter. L'effet pathogénique de certaines mutations est parfois difficile à mettre en évidence. Les changements dans la séquence ne sont pas forcément pathogéniques et peuvent être des polymorphismes. Les délétions d'un gène entier, les mutations non sens, les décalages du cadre de lecture sont des mutations pour lesquelles la fonction du gène est détruite. Les mutations qui affectent les sites d'épissage des ARNm abolissent également la fonction du gène. L'effet des mutations faux sens est souvent plus difficile à déterminer.

Dans les rares cas où il existe un test fonctionnel pour la protéine incriminée, l'effet de la mutation peut être directement testé par son effet sur l'activité de la protéine. Dans le cas contraire, il existe des critères qui permettent d'affirmer, plus ou moins, ou d'infirmer le rôle pathogénique d'une substitution d'acide aminé : les mutations faux sens sont pathogéniques (i) si elles sont localisées dans une partie fonctionnelle de la protéine ; (ii) si l'acide aminé modifié est conservé entre les espèces (orthologues) ou entre les membres de la famille de protéines à laquelle elle appartient ; (iii) si le changement est non conservatif, c'est-à-dire ne conserve pas les propriétés physicochimiques apportées par l'acide aminé d'origine. Ces critères ne sont pas toujours vérifiables. On a souvent recours à un quatrième critère qui est celui de l'absence de la mutation dans une population contrôle.

Cette approche (HRM) se situe donc en troisième position dans la stratégie de ce travail après le clonage positionnel et le séquençage du gène candidat, vient la confirmation de la mutation (variation rare) grâce à la HRM. Il s'agit d'une technique récemment mise sur le marché par plusieurs constructeurs (Roche, Bioké, Applied Biosystem) qui permet d'étudier les variations génétiques (mutations ponctuelles) le plus souvent connues. Nous avons utilisé le matériel Light Scanner de Bioké.

Cette approche nous a permis dans le cadre de ce travail d'analyser une mutation faux sens H470P identifiée dans le gène CDK5RAPL1 chez un groupe témoins. Cette mutation correspondait à un polymorphisme non connu dans les bases de données. J'ai testé cette mutation sur des contrôles des populations Algériennes et Européennes. Cette technique nous a ainsi permis de diriger les échantillons d'ADN à séquencer en évitant un séquençage

systematique des populations contrôles. Elle nous a permis d'éviter les techniques de dénaturation par chromatographie liquide, plus longues et plus coûteuses.

A- Principe :

Son principe repose sur la corrélation précise entre une température de dénaturation et une séquence. Chaque variation nucléotidique induit une conformation différente du double brin d'ADN qui la plupart du temps entraîne une instabilité au niveau de la séquence concernée et qui diminue sa température de fusion (Figure 17).

En effet, la HRM permet, après une PCR, de discriminer, sur une montée en température très progressive, les différents variants amplifiés, et ce avec une molécule capable de s'introduire entre les deux brins d'ADN et qui lorsqu'elle est intercalée émet une fluorescence. L'utilisation de cette nouvelle chimie (le LC Green) sature complètement les structures doubles brins et permet de distinguer des variations, même d'une seule base, selon le profil de dénaturation. La fusion du double brin engendre la libération du LC Green ce qui nous permet en comparant les courbes de fluorescence en fonction de la température de déterminer des divergences de T_m pour une même séquence parmi l'ensemble des patients. Pour cela l'appareil Light Scanner augmente lentement la température des produits PCR et pour chacune d'elle, il enregistre l'évolution de l'intensité de la fluorescence en continu. Les courbes obtenues sont alors analysées et la superposition de celles-ci permet de détecter les amplicons dont la température de dénaturation diffère de la population de référence et qui sont alors séquencés. Donc à une séquence d'ADN donnée correspond, pour une montée en température standard, une signature lumineuse spécifique représentée par une courbe de fusion. Si la séquence d'ADN analysée comporte des variants, des mutations, des délétions, la signature change révélant ainsi l'existence d'un autre profil, voire d'une anomalie identifiée ou non.

Pour un ADN hétérozygote, le produit final de la PCR sera composé de 4 types de molécules : 2 hétéroduplexes et 2 homoduplexes, alors que pour un ADN homozygote normal ou muté seulement deux types d'homoduplexes seront créés. Pour un ADN hémizygotique avec un seul allèle on aura un seul type d'homoduplexe. Une fois dénaturé chaque type de duplexe aura une courbe de dénaturation différente (Figure 18, 19).

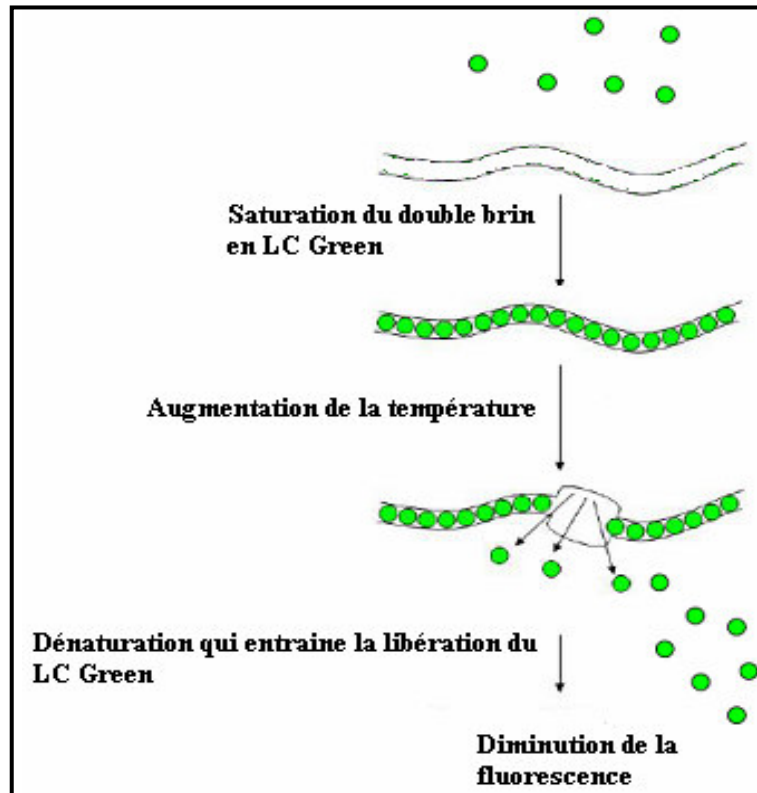


Figure 17 : Principe de l'émission de fluorescence du LC Green

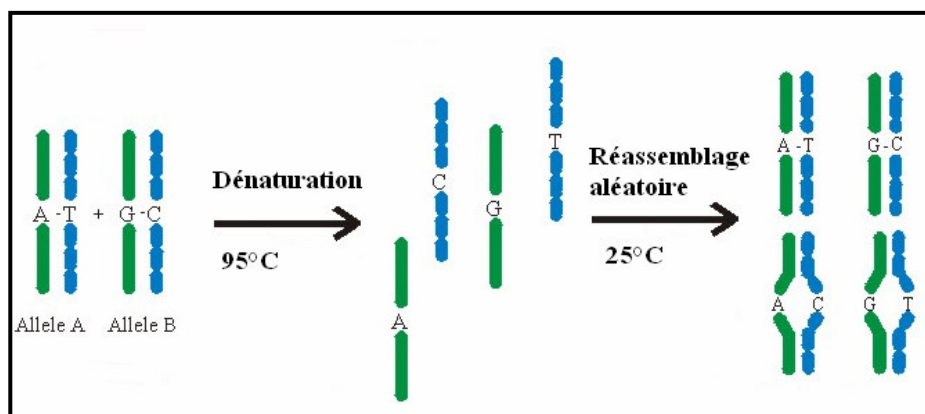


Figure 18 : Mécanisme de formation des homo et hétéroduplexes

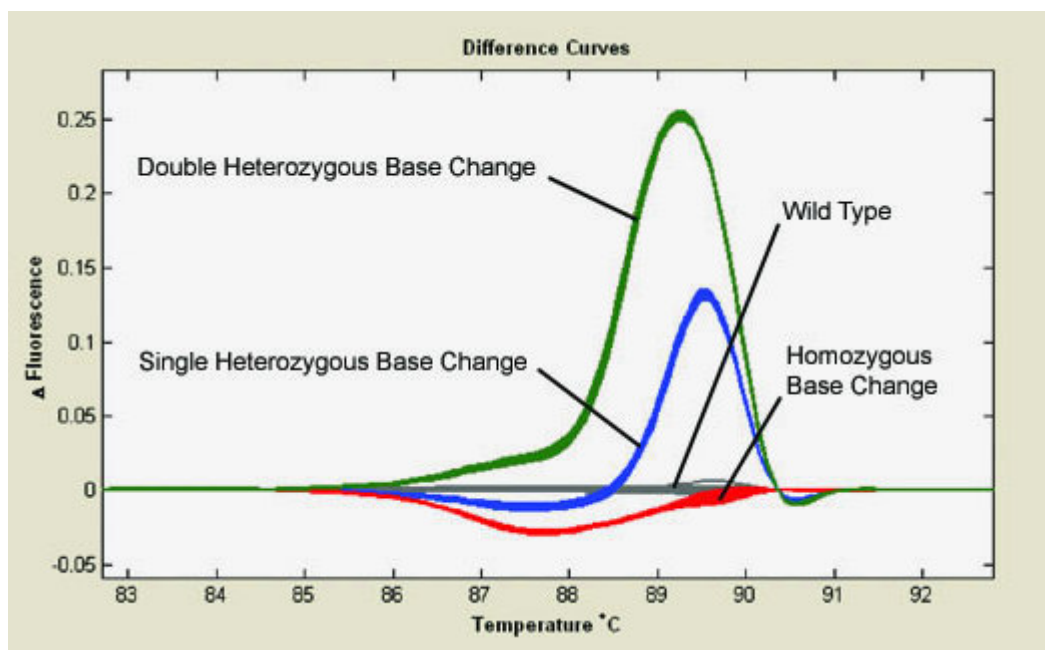


Figure 19 : Les différents types de profils HRM

Une différence dans l'aspect de la courbe de dénaturation peut résulter de la variation de la taille de l'amplicon tout en sachant qu'une délétion est plus facilement détectable qu'une insertion, elle peut aussi résulter d'une variation de séquence (mutation homozygote ou hétérozygote).

B- Protocole :

Pour mieux apprécier les variations, le programme d'amplification qui précède l'analyse sur le light scanner possède deux étapes supplémentaires à la fin des cycles de PCR. La première dénature l'ensemble des brins du produit PCR, la deuxième les réassemble de façon aléatoire en diminuant progressivement la température de 95°C à 25°C. Il s'agit d'une méthode qui permet de distinguer plus nettement les variations hétérozygotes. En effet, statistiquement 50% des simples brins possédant une séquence présentant une variation se désappariant avec des séquences non complémentaires. Cette divergence modifie la température et entraîne la formation de courbes de dénaturation différentes. Ce processus n'a pas d'impact sur les variations homozygotes, la distinction se fait alors seulement sur la différence de T_m entre G-C et A-T. Malgré ceci, on estime à 95% le nombre de mutations homozygotes détectables au light scanner.

C- Applications :

Longtemps utilisée en recherche fondamentale, la HRM a connu en 2008 une réelle montée en puissance pour commencer à trouver des applications pratiques en diagnostic clinique. Elle est d'ores et déjà appliquée pour la détection et la quantification de mutations classiques telles que K-ras, JAK2, BRCA1 et 2 ou MLH1-MSH2. Elle est également en pointe pour des caractérisations plus complexes telles que l'expression de gènes de sensibilité aux traitements anti-cancéreux (pour les glioblastomes notamment) ou soumis à empreinte parentale. Les trois principales applications sont :

1- Criblage à haut débit des mutations :

Nous avons dans ce travail utilisé le « Light scanner » commercialisé par Bioké, qui nous a permis de réaliser un criblage à haut débit des mutations. Cette méthode basée sur

l'analyse des courbes de dénaturation thermique (Dobrowolski, et al., 2009) permet d'analyser 96 échantillons en très peu de temps. Au sein de notre équipe nous avons choisi de n'utiliser pour l'instant cette technique que pour rechercher la présence d'un changement nucléotidique précis dans un grand nombre d'ADN contrôles. Cette technique nous a permis de tester rapidement de nombreux ADN afin d'évaluer si un changement non répertorié sur les banques de données de polymorphismes est un polymorphisme rare. La détection de nouvelles mutations est aussi 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.

2- Analyse de marqueurs microsatellites et de SNP :

Cette technique offre aussi la possibilité d'analyse des marqueurs microsatellite. En effet La technologie HRM est particulièrement intéressante pour la détection du polymorphisme lié aux marqueurs microsatellites. Le polymorphisme des microsatellites est basé sur des différences de longueur qui génèrent des courbes de fusion très facilement distinguables d'un génotype à l'autre. Ainsi, le résultat est obtenu juste après la PCR, alors que les méthodes actuelles nécessitent l'emploi d'un marqueur fluorescent durant la PCR, suivi d'une électrophorèse du produit PCR. Cette utilisation offrirait un gain de temps considérable dans la cartographie génétique, où le nombre de marqueurs à gérer est important. La technologie HRM peut aussi être appliquée à la détection en masse de SNP sans pour autant faire systématiquement appel au séquençage. En outre, il devient plus facile de faire une évaluation exhaustive du polymorphisme à un locus donné.

3- Analyse du degré de méthylation des gènes soumis à l'empreinte :

La détection du degré de méthylation repose sur un principe bien connu, celui du comportement du changement de la cytosine en uracile en présence de bisulfite de sodium, tout en sachant que les cytosines non méthylées ne sont pas affectées par ce changement. On peut ainsi après une PCR à partir d'un ADN traité au bisulfite de sodium différencier entre un amplicon où les cytosines sont méthylées et celui où elles ne le sont pas.

4- Analyse simultanée de 2 mutations :

Cette analyse se fait en présence d'un fluorochrome saturant le LC-Green et d'une sonde oligonucléotidique non marquée. Elle permet l'analyse simultanée d'un polymorphisme connu compris dans l'amplicon et d'une mutation pathogène.

D- Paramètres expérimentaux importants:

Pour un ADN hétérozygote, le produit final de la PCR sera composé de 4 types de molécules : 2 hétéroduplexes et 2 homoduplexes, alors que pour un ADN homozygote normal ou muté seulement deux types d'homoduplexes seront créés. Pour un ADN hémizyote avec un seul allèle on aura un seul type d'homoduplexe. Une fois dénaturé chaque type de duplexe aura une courbe de dénaturation différente.

Une différence dans l'aspect de la courbe de dénaturation peut résulter de la variation de la taille de l'amplicon tout en sachant qu'une délétion est plus facilement détectable qu'une insertion, elle peut aussi résulter d'une variation de séquence (mutation homozygote ou hétérozygote). Des variations dans la courbe de fusion du même ADN peuvent aussi résulter de la différence en concentration de sels du tampon et du volume de la réaction PCR.

1- Qualité de l'ADN et de l'amplicon:

La qualité de l'ADN de départ ainsi que celle du produit de PCR sont les principaux facteurs influençant la qualité des résultats générés par HRM.

Concentration en sels et en tampon : des ADN de mauvaise qualité ainsi que des ADN avec une forte concentration en sel ou des concentrations variables en tampon seront considérées comme faux positifs. Ce problème est fréquemment rencontré lors de l'utilisation d'ADN extraits par différentes techniques (différentes concentrations en sels et en tampon) ce qui aboutit à des profils de dénaturation variables augmentant le taux de faux positifs.

La richesse en GC de l'amplicon n'est pas un facteur influençant l'interprétation, une même mutation pourra être détectée dans des amplicons ayant une richesse en GC allant de 20% à 79%.

2-Température :

Au moment de l'analyse des courbes de dénaturation l'opérateur doit normaliser les courbes ce qui revient à normaliser l'intensité en fluorescence de départ. Pour cela, toutes les courbes doivent être superposées de part et d'autre de la pente de dénaturation. Ainsi le seul paramètre pris en compte pour discriminer les mutations sera l'aspect de la courbe ce qui va conduire à des faux négatifs qui sont les délétions et les mutations homozygotes.

3-Produits contaminants :

La présence de dimères d'amorces ou de produits contaminants va aussi altérer le profil de dénaturation en générant des faux positifs. Ce problème peut être résolu par un bon design des amorces et un respect des règles de bonne pratique du laboratoire.

4-Domains de dénaturation :

Un autre problème rencontré est celui de la présence de plus d'un domaine de dénaturation.

Un domaine de dénaturation est l'endroit où commence l'ouverture de la molécule d'ADN double brin pour donner deux molécules d'ADN simple brin. Une courbe de dénaturation sigmoïde reflète la présence dans l'amplicon d'un seul domaine de dénaturation (effet facilitateur du domaine de fusion). La présence de plus d'un domaine de dénaturation se traduit par un aspect en « double bosse » de la courbe de dénaturation, ce qui peut rendre l'interprétation et l'analyse des profils HRM complexe. Cet aspect en « double bosse » s'explique par la libération du LC green de deux domaines de dénaturation à deux températures différentes.

L'amplicon peut être lui-même formé de deux domaines de dénaturation, auquel cas tous les ADN testés devraient montrer le même profil. Dans le cas où seulement certains

ADN sont concernés par ce type de profil, ceci peut traduire la présence d'un ou plusieurs polymorphismes sur l'amplicon qui sont responsables à l'état hétérozygote (à cause du mésappariement) de la présence du ou des nouveau(x) domaines de dénaturation. On peut pallier à ce problème en utilisant un amplicon de petite taille (150 à 350 pb). En effet une même mutation est plus facilement détectable dans un amplicon de 200 pb que dans un amplicon de 400 pb.

Plusieurs logiciels qui détectent les domaines de dénaturation sont disponibles, ils sont surtout utilisés pour des amplicons de grande taille.

5- la mutation :

Le type de mutation, sa position et l'environnement nucléotidiques sont des facteurs influençant sa détection.

Type de mutation :

*une transition (A,G) en (T,C) est plus facilement détectable qu'une transversion (A,T) en (G,C) et ceci à cause de la présence dans le premier cas de figure de 50% d'hétéroduplexes et la présence de 100% d'homoduplexes dans le deuxième cas.

*les délétions et les mutations homozygotes affecteront beaucoup plus la température de dénaturation que le profil de dénaturation. Une fois que les alignements en température sont faits par l'opérateur et les courbes superposées, ces différences vont s'estomper créant ainsi des faux négatifs.

L'environnement nucléotidique : La richesse en GC de l'amplicon n'est pas un facteur influençant l'interprétation, une même mutation pourra être détectée dans des amplicon ayant une richesse en GC allant de 20% à 79% . .

La position de la mutation : Une même mutation présente à la fin au milieu ou au début d'une séquence sera détectée avec la même sensibilité.

VII- Le projet HapMap :

HapMap est un catalogue public des variations génétiques les plus fréquentes chez l'homme. Il s'agit d'un projet international qui a débuté en Octobre 2002 et qui a pour but de développer une carte d'haplotype qui décrit les patrons communs de variations génétiques du génome humain. Toutes les informations générées par HapMap sont gratuites. Il s'agit d'une description de la nature des variantes, leur emplacement dans la séquence d'ADN et leur distribution au sein d'une population et entre les populations dans différentes parties du monde.

La construction de HapMap s'est faite en trois étapes. (a) Les polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) sont identifiés dans les échantillons d'ADN provenant de nombreux individus. (b) Les SNP adjacents qui sont hérités simultanément sont regroupés en « haplotypes » dont la fréquence dans la population excède un pour cent. (c) Des SNP marqueurs, au sein d'un haplotype, sont choisis pour constituer un identificateur unique de cet haplotype. En génotypant les trois SNP marqueurs illustrés dans la figure 20, les chercheurs peuvent déterminer lequel des quatre haplotypes illustrés est porté par chaque individu (Figure 20).

- Les buts du projet HapMap :

A- Créer une base de données publique

Le principal but de Hapmap est de créer une base de données publique détaillée des variations et haplotypes pour chacune des 3 populations humaines : asiatique, européenne et africaine. Les échantillons d'ADN à l'étude dans le cadre du projet HapMap ont pour cela été recueillis auprès de 270 personnes. Les Yoruba d'Ibadan (Nigéria) ont fourni 30 ensembles d'échantillons de deux parents et d'un enfant d'âge adulte (chaque ensemble étant dénommé trio). Au Japon, 45 individus sans lien de parenté de la région de Tokyo ont été échantillonnés. En Chine, 45 individus sans lien de parenté de la région de Beijing ont été échantillonnés. Aux États-Unis, 30 trios ont fourni des échantillons, recueillis en 1980 auprès de résidents des États-Unis originaires de l'Europe du Nord et de l'Ouest par le Centre

d'Étude du Polymorphisme Humain (CEPH). Les haplotypes sont généralement partagés entre les populations, mais leurs fréquences peuvent être très différentes.

Même si les haplotypes révélés de ces populations devraient être utiles pour étudier les haplotypes de plusieurs autres populations, le consortium HapMap examine actuellement la possibilité d'inclure d'autres populations dans le projet.

B- Génotypage des SNP commun :

Un second but de HapMap est de génotyper les polymorphismes fréquents. En effet un SNP commun (avec une fréquence supérieure ou égale à 5% dans la population générale) est génotypé toutes les 5000 paires de base. Afin de faciliter le suivi des opérations et de conduire le projet à terme, le génome a été divisé en fenêtres de 5 Mb ; des SNP y ont été génotypés jusqu'à ce qu'un SNP passe tous les critères de qualité et comporte la fréquence requise (ou jusqu'à ce que 3 SNP ou plus y aient été génotypés sans succès). Pendant la phase II du projet, 3 millions de SNP supplémentaires ont été génotypés aléatoirement dans le génome humain afin d'augmenter la densité.

C- Détermination des « tag SNP »:

HapMap a permis la détermination d'un ensemble de SNP marqueurs (tagSNP) : Il s'agit de la retombée la plus attendue du projet qui a permis de diminuer grandement le nombre de tests à effectuer afin de couvrir une région chromosomique ou le génome entier lors d'une étude d'association.

D- Permettre le développement de technologies de génotypage, d'outils d'analyse, de conceptions d'études cliniques et de guide éthique

Le projet international HapMap n'utilise pas l'information recueillie pour établir des corrélations entre des variantes précises et des maladies. Le projet vise plutôt à fournir aux chercheurs l'information qui leur permettra d'établir des liens entre les variations génétiques et les risques de contracter certaines maladies. Ces recherches pourraient aboutir à de

nouvelles méthodes de prévention, de diagnostic et de traitement des maladies. Dans une partie de ce travail nous nous sommes basés sur les données du projet HapMap.

L'objectif du projet n'est pas de découvrir les liens entre les gènes et la maladie. Mais en caractérisant les haplotypes, HapMap constitue un outil précieux pour les études d'association. Dans ces études, les chercheurs comparent les haplotypes d'individus atteints de la maladie et les haplotypes d'individus sains similaires (les contrôles). Si un haplotype est plus fréquent chez les individus atteints que chez les contrôles, on pourra supposer qu'un gène associé à la maladie est situé au sein de l'haplotype en question ou dans son voisinage.

Nous nous sommes intéressés dans ce travail à la comparaison des haplotypes de patients Algériens à ceux d'une population contrôle de HapMap. Naturellement s'est posée la question de la capacité des 4 populations choisies par HapMap à décrire notre population à l'étude.

Plusieurs études ont montré que l'on peut utiliser des SNP marqueurs HapMap dans d'autres populations Caucasiennes ou Asiatiques (Montpetit, et al., 2006; Mueller, et al., 2005). Par exemple un SNP marqueur dérivé de la population américaine-européenne (CEU) pouvait décrire en moyenne plus de 90% des allèles ayant une fréquence supérieure à 5% dans un échantillon d'Estonie. Il a été par contre démontré que la taille des échantillons Hap Map n'est pas suffisante pour répertorier efficacement les allèles dont la fréquence est inférieure à 5% et ce peu importe la population (Montpetit, et al., 2006; Zeggini, et al., 2005). Jim Stankovich et al., en 2006 s'est intéressé à comparer 633 SNP choisis dans la population australienne aux tag SNP de la population CEU de HapMap. L'auteur a confirmé la similitude de ces 2 populations validant ainsi l'utilisation des Tag SNP de la population CEU de HapMap à la population Australienne. Etant donné la grande diversité de la population africaine, en l'occurrence Algérienne, plusieurs études seront nécessaires afin d'évaluer la validité des SNP marqueurs (Stankovich, et al., 2006). Sachant que la population Algérienne ne figure pas parmi les populations étudiées par HapMap, nous avons choisi de comparer nos patients aux contrôles caucasiens. Tout en gardant à l'esprit que les patients Algériens sont d'origine africaine, mais complètement différente de la population africaine choisie par HapMap représentée par les Yoruba d'Ibadan au Nigeria.

Haploview est un programme informatique conçu par l'équipe du Pr Mark Daly au MIT/Harvard Broad Institute, pour visualiser le déséquilibre de liaison des haplotypes générés par HapMap. Il propose par ailleurs plusieurs fonctionnalités pour des études d'association tels que les SNP marqueurs ou tagSNP et l'estimation de la fréquence des Haplotypes

Résultats

Résultats

L'ordre dans lequel seront présentés les résultats de ce travail est celui du déroulement des 4 années de thèse que j'ai passé au sein de l'équipe du Pr Michel Koenig. A mon arrivée au laboratoire en 2005 la technique de génotypage par puces SNP venait d'être instaurée. L'application en routine de cette technique était encore freinée par le manque de disponibilité de la personne qui l'avait en charge. Grâce à la motivation de tous les membres de l'équipe nous avons finis par acquérir les compétences nécessaires pour mener à bien et avec toutes les précautions nécessaires les 3 jours de manipulation. Notre tâche s'arrêtait à l'étape du marquage de l'ADN amplifié et fragmenté par un anticorps anti-streptavidine biotinilé. Les étapes de lavage sur la station fluïdique, hybridation de la puce et révélation étaient assurées par le Dr Christelle Thibaut chargée de la plateforme Affymetrix dans notre institut. A partir de ce moment, nous avons pu analyser un grand nombre de familles consanguines référées à notre laboratoire pour ataxie récessive. Notre stratégie était la suivante : les premières familles analysées sont les familles consanguines avec le plus grand nombre d'atteints, ensuite on s'est intéressé aux cas isolés. Vu le coût encore élevé d'une puce 10K nous analysions uniquement les individus atteints de chaque famille. Les plus grandes familles étaient en général analysées par la suite avec des marqueurs microsatellites pour confirmer ou infirmer la liaison génétique par l'étude des parents et des enfants sains. Nous avons pu au bout de 3 ans analyser par puces 10K et 50K plus de 100 familles. Les patients isolés ont été analysés dans un second temps.

L'analyse de ce grand nombre de familles consanguines nous a permis de valider notre stratégie de cartographie par homozygotie. Parmi 97 familles consanguines au premier degré, nous avons identifié grâce au programme HomoSNP, 10 mutations dans des gènes connus d'ataxie récessive (Manuscrit 1, soumis à publication). Dans un second temps nous nous sommes intéressés aux 87 familles où aucun diagnostic n'a encore été porté. Parmi ces 87 familles, 5 familles, toutes d'origine Algérienne, se sont révélées homozygotes au niveau d'un locus déjà connu sur le chromosome 20. Ces 5 familles Algériennes, avec une sixième originaire des Emirats Arabes Unis adressée récemment à notre laboratoire, nous ont permis d'identifier un nouveau gène d'ataxie récessive sur le bras court du chromosome 20.

I- Validation de la stratégie de cartographie par homozygotie utilisant les puces SNP

Manuscrit 1:

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

D. H'mida-Ben Brahim, A. M'zahem, M. Assoum, Y. Bouhlal, F. Fattori, M. Anheim, L. Ali-Pacha, F. Ferrat, M. Chaouch, C. Lagier-Tourenne, N. Drouot, C. Thibaut, T. Benhassine, Y. Sifi, D. Stoppa-Lyonnet, K. N'Guyen, J. Poujet, A. Hamri, F. Hentati, R. Amouri, F. M. Santorelli, M. Tazir and M. Koenig. Article soumis au journal European Journal of Human Genetics

A- Identification de 10 mutations chez 11 familles homozygotes dans des régions comprenant 1 gène d'ataxie récessive :

Au cours de cette partie de mon travail de thèse nous avons démontré l'utilité et les limites de la cartographie par homozygotie utilisant des puces SNP chez les familles consanguines, pour le diagnostic de l'ataxie du Charlevoix-Saguenay (ARSACS, saccin [NM_014363](#)), de l'ataxie avec apraxie oculomotrice de types 1 et 2 (AOA1 et AOA2, aprataxin([NM_017692](#)) et senataxin [NM_015046](#)), et de l'ataxie-telangiectasie (A-T, *ATM* ([NM_000051](#))).

Notre choix s'est porté sur ces 4 gènes parmi les 14 gènes d'ataxies récessives connues à cause de la grande capacité codante de 3 d'entre eux (*ATM*, *AOA2* et *ARSACS*) et de la possibilité de confirmer par séquençage direct une fois le diagnostic suspecté par cartographie par homozygotie.

Pour toutes les familles adressées dans notre laboratoire pour ataxie récessive; nous avons tout d'abord procédé à l'exclusion diagnostique des deux ataxies les plus fréquentes dans la population étudiée (plus de la moitié des familles proviennent d'Afrique du nord): l'ataxie de Friedreich et l'ataxie avec déficit en vitamine E. Le diagnostic d'ataxie de Friedreich a été éliminé par technique de TP-PCR à la recherche de l'expansion GAA homozygote au niveau du premier intron du gène. Dans un second temps et compte tenu de l'origine géographique de nos patients, nous avons exclu le diagnostic d'ataxie avec déficit en

vitamine E par séquençage à la recherche de la mutation fondatrice 744delA au niveau de l'exon 5 de ce gène. Nous avons par ailleurs effectué une recherche directe de mutation chez les familles dont la présentation clinique et ou biologique était d'emblée évocatrice de AOA1, AOA2 et ATM. Les familles pour lesquelles une mutation a été identifiée directement n'ont évidemment pas été analysées par puce de génotypage.

Notre population à l'étude était ainsi formée de 97 familles non FRDA et non AVED d'origines géographiques diverses, rapportées dans le Tableau 7, dont 92 consanguines (consanguinité documentée) et 5 avec une consanguinité éloignée.

Nous avons procédé à une analyse « pangénome » des ces 97 familles grâce aux puces GeneChip Mapping 10k Xba 142 2.0 ou 50K Xba 240. Les différentes étapes de l'analyse se sont déroulées selon le protocole préconisé par Affymetrix (voir manuscrit 1).

Devant la grande quantité d'information générée par les puces de génotypage, nous avons eu recours au programme HomoSNP. HomoSNP nous a permis de visualiser les régions de plus de 15 SNP homozygotes successifs sur une puce 10K, et de plus de 20 SNP homozygotes successifs sur une puce 50K. Cette interface graphique attribue une couleur différente pour chaque intervalle selon le nombre de SNP successifs homozygotes. Le code couleur utilisé est rapporté dans le tableau 8. L'analyse de tous les membres atteints d'une famille nous a permis de comparer les régions d'homozygotie pour ne retenir que les régions homozygotes partagées entre les atteints (pour lesquelles ; s'ils sont génotypés ; les sains sont hétérozygotes) et qui chevauchent avec l'un des 4 gènes suivants : *sacsine*, *aprataxine*, *senataxine* et *ATM*.

Nous avons constaté que le seuil de détection des régions homozygotes par HomoSNP génère un très grand nombre de petite régions homozygotes, nous avons donc décidé de fixer un nouveau seuil pour ne retenir que les régions homozygotes partagées supérieures à 20 SNP consécutifs sur les puces 10K et 35 SNP consécutifs pour les puces 50K. Les petites régions inférieures à 20 et 35 SNP ont été considérées homozygotes par manque d'informativité des SNP et probablement pas par descendance. Ces nouveaux seuils ont été définis par l'étude de la distribution de la taille des régions d'homozygotie (Figure 3 manuscrit 1)

Nous avons ainsi pu identifier 11 familles dont la région homozygote partagée par les atteints chevauchait l'un des 4 gènes d'intérêt. 6 familles sont homozygotes dans une région

qui comprend le gène de la saccine, 2 familles pour le gène ATM, 2 familles pour le gène AOA1 et une seule famille pour le gène AOA2. La taille, la localisation ainsi que le nombre de SNP des régions homozygotes identifiées sont rapportés dans le Tableau 1, Manuscrit 1. Les caractéristiques cliniques des atteints de chaque famille sont rapportées dans le Tableau 2, Manuscrit1.

Tableau 7 : Origine géographique des familles analysées par puce 10 et 50K

97 Familles consanguines non FRDA et non AVED						
Origine géographique	Algérie	France	Arabie Saoudite	USA	Tunisie	Autres
# de familles	63	16	6	3	2	7

Tableau 8 : Le code couleur attribué aux régions homozygotes sur les puces 1à et 50K selon le nombre de SNP homozygotes successifs.

Code couleur	Nombre de SNP homozygotes successifs	
	10K	50K
Bleu foncé	≥ 25	≥ 30
Bleu clair	≥ 20	≥ 25
Violet	≥ 15	≥ 20

1- Famille 10 :

Une mutation du gène compris dans la zone homozygote a été identifiée chez 10 familles parmi 11. La seule famille chez laquelle aucune mutation n'a été retrouvée est la famille 10. La seule région homozygote partagée par les 4 atteints de cette famille 10 se situe sur le bras long du chromosome 11 et comprend le gène ATM. Le séquençage des 62 exons du gène ATM ainsi que l'analyse du nombre de copie de chaque exon (à la recherche d'une éventuelle duplication), gracieusement faits par l'équipe du Pr Dominique Stoppa-Lyonnet n'a pas révélé de mutation dans ce gène. Comme illustré par la figure 1 Manuscrit 1, le gène MRE11 (NM_005591) muté dans le syndrome d'Ataxie Téléangectasies Like (ATLD; MIM 604391) se trouve exclu de la région homozygote partagée à cause d'une recombinaison méiotique survenue chez le patient P27. Ce gène a été préalablement exclu par l'analyse de marqueurs microsatellites dans la région, mais devant l'absence de mutation dans le gène ATM, nous avons tout de même décidé de séquencer le gène MRE11 et comme prédit par les données de liaison génétique, aucune mutation n'a été retrouvée dans ce gène.

2- Famille 1 :

Une deuxième famille sur laquelle nous nous sommes attardés est la famille 1. La famille 1 nous a été adressée par nos collègues Tunisiens en 2006. Il s'agit d'une famille consanguine au second degré composée de 4 atteints un oncle et une tante paternels et leurs 2 neveux (arbre généalogique, Figure 2, Manuscrit 1). Un tour du génome utilisant 400 marqueurs microsatellites effectué par l'équipe du Pr Hentati n'a pas retrouvé de zone homozygote commune aux 4 atteints. Cette famille a en effet fait l'objet en 2005 d'un article dans le journal *Acta Myologica* sous le titre de « Distinct phenotypes within autosomal recessive ataxias not linked to already known loci » (Bouhlal, et al., 2005). Devant l'absence d'orientation diagnostique clinique, nous avons procédé à un génotypage par puces 10K des 4 atteints.

Le gène de la saccine a été retrouvé compris dans une région homozygote commune à l'oncle P2 et à la tante P1 au dessus du seuil de 20 SNP successifs homozygotes (respectivement, 241 et 58 SNP consécutifs). Chez le neveu P3 une région chevauchant avec celle de P1 et P2 comportait 24 SNP consécutifs, alors qu'elle n'était que de 10 SNP chez le

neveu P4 et donc en dessous du seuil de détection par le programme HomoSNP (Figure 2, manuscrit 1). Six autres régions homozygotes sont partagées par P1 et P2, une de ces régions comprenant un gène d'ataxie connu : le gène MRE11. P3 et P4 partagent 4 autres régions homozygotes différentes des régions partagées par P1 et P2. Devant l'absence de région homozygote commune aux 4 atteints autre que celle sur le chromosome 13, et l'absence d'autres gènes dans les régions communes à P3 et P4 nous avons émis 2 hypothèses. La première hypothèse était que les 4 patients étaient atteints d'ataxie spastique du Charlevoix-Saguenay avec soit la même mutation, soit des mutations hétérozygotes composites chez les neveux. Cette hypothèse était d'autant plus probable que les 4 patients avaient la même symptomatologie clinique avec un début à l'âge de 1 an, une ataxie spastique, des reflexes vifs, un syndrome pyramidal, et une neuropathie axonale sensitive.

La seconde hypothèse était que malgré cette uniformité clinique, P1 et P2 étaient effectivement liés au chromosome 13 et P3 et P4 étaient mutés dans un gène non connu et avaient donc une pathologie différente. Nous avons commencé par faire analyser le gène de la saccine chez P1 et P2. Le séquençage a été gracieusement fait au sein du laboratoire du Pr Fillippo Santorelli à Rome. Une délétion de 4 pb avec décalage du cadre de lecture à effectivement été retrouvée. Nous avons alors fait procéder au séquençage chez P3 et P4 et la même mutation a été retrouvée. La présence de cette même mutation chez le neveu P4 dans une région de 3 Kb couverte par seulement 10 SNP successifs, indique qu'il y a eu une recombinaison chez P4 et que cette petite région homozygote n'est probablement pas due à la consanguinité au second degré des parents mais à une consanguinité très ancienne ou « inbreeding » qui relie la mère des neveux avec les parents de son mari (Figure 21).

3- Familles diagnostiquées ARSACS :

Les 6 premières familles (familles 1 à 6) sont mutées pour le gène de la saccine. Ces familles bien que de la même origine géographique, 5 Algériennes et 1 Tunisienne, portent 6 mutations différentes. L'une de ces mutations correspond à une mutation fondatrice en Algérie (Fillipo Santorelli, communication personnelle). Ces mutations sont dans 5 cas sur 6

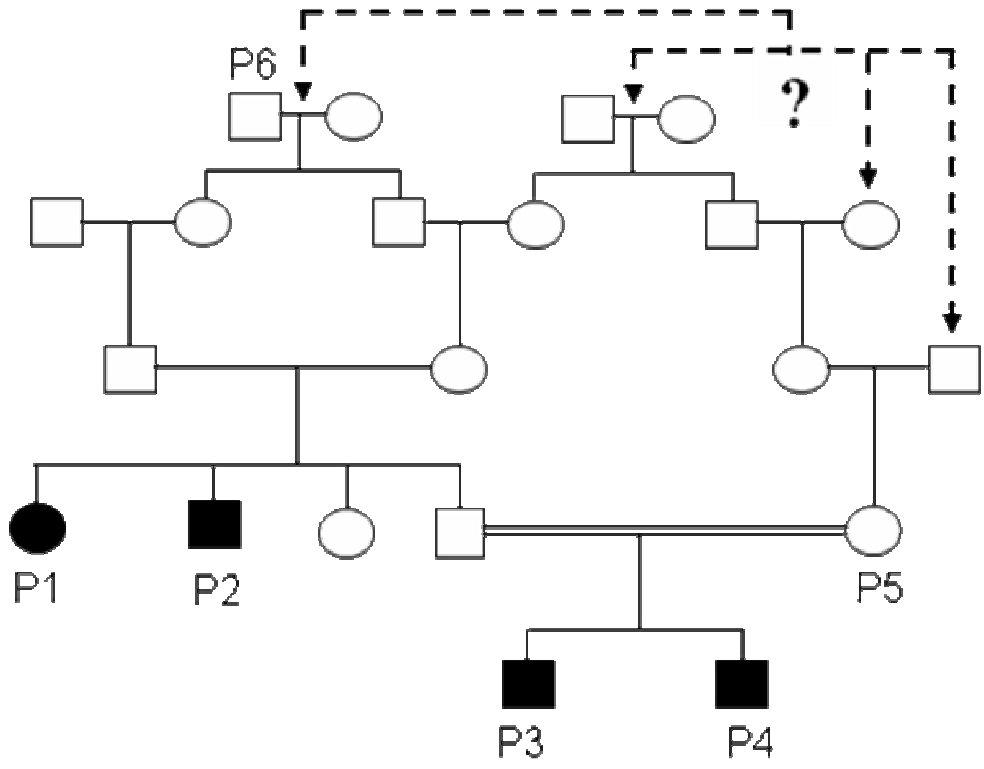


Figure 21: Arbre généalogique de la famille 1

tronquantes. La présentation clinique des patients atteints des 5 familles Algériennes était atypique avec essentiellement un début tardif (> 5 ans) alors que l'âge de début classique pour l'ARSACS correspond au début de la marche. Chez la famille 1, la présentation clinique était plutôt typique, mais l'absence d'homozygotie évidente chez les 4 atteints avait perturbé l'interprétation par nos collègues Tunisiens, sur la base de l'analyse avec les marqueurs microsatellites.

4- Familles 7 et 8 : AOA1

Les deux familles 7 et 8 originaires respectivement d'Algérie et du Liban sont toutes deux mutées pour le gène de l'aprataxine. Les 2 atteints de la famille 7 ont présenté un tableau clinique typique d'AOA1. La mutation retrouvée chez cette famille Algérienne correspond à la mutation fondatrice caucasienne W279X. L'analyse par puce de la famille 8 a été motivée par une présentation clinique atypique avec un âge de début tardif (16 et 32 ans) et une évolution très lentement progressive.

5- Famille 9 : AT

Le seul patient atteint de la famille 9 a été analysé par puce 10K à cause de la consanguinité au premier degré de ses parents, 10 régions homozygotes ont été retrouvées. Une seule de ces régions comprenait un gène d'ataxie connu : le gène ATM, pour lequel l'équipe du Pr S Lyonnet a trouvé une mutation homozygote.

6- Famille 11 : AOA2

Le diagnostic du patient de la famille 11 avait erré, dû à la description dans la même famille d'un petit frère atteint d'une ataxie atypique avec des taux normaux d'alpha-foetoprotéine sérique. Malgré la haute densité de la puce (50K), nous n'avons trouvé que 4 régions homozygotes chez le frère aîné, dont une seule contenait un gène connu d'ataxie : le gène SETX. Ces constatations sont probablement liées à la consanguinité ancienne rapportée dans cette famille. L'homozygotie de la région du gène SETX a permis de revoir le diagnostic du jeune frère et de faire le diagnostic moléculaire chez l'aîné.

B- Les gènes exclus de l'analyse :

Après avoir éliminé le diagnostic de FRDA, AVED, AOA1, AOA2, AT et ARSACS, nous étions devant 87 familles encore sans diagnostic. Parmi ces 87 familles, plusieurs sont homozygotes pour d'autres gènes d'ataxie plus rares tels que *SYNE1*, *MRE11*, *TDP*, *Twinkle* et *POLG*.

Le tableau 9 résume le nombre de familles par gène

Gène d'ataxie récessive rare	<i>SYNE1</i>	<i>TDP</i>	<i>Twinkle</i>	<i>POLG</i>	<i>MRE11</i>
Nombre de familles	6	3	4	5	4

Nous avons fait séquencer le gène PolG, au laboratoire du Pr Véronique Paquis, chez un atteint de chacune des 5 familles homozygotes pour ce locus et aucune mutation n'a été retrouvée. L'investigation clinique et génétique du reste des familles et la confirmation ou infirmation de ces diagnostics est en cours.

C- Seuil de détection des régions homozygotes :

Comme mentionné ci-dessus, nous avons fixé la limite de détection des régions homozygotes à 20 SNP successifs pour les puces 10K et 35 pour les 50K. Notre seuil a été fixé au-dessus du seuil du programme HomoSNP dans le but d'exclure de notre analyse un très grand nombre de petites régions d'homozygotie. En effet, ces petites régions de taille < à 20 et 35 SNP en 10 et 50K sont probablement plutôt homozygote par hasard ou par manque d'informativité des marqueurs SNP que par descendance (liée à la consanguinité des parents).

Pour évaluer l'efficacité de ce nouveau seuil de détection des régions homozygote dans la détection des gènes mutés, nous avons analysé le contenu en SNP de toutes les régions homozygotes identifiées chez les 28 atteints appartenant aux 11 familles. Nous avons menée cette analyse séparément pour les 10 et 50K.

Le nombre de régions homozygotes pour chaque type de puce en fonction du contenu en SNP sont présentés sous forme d'histogramme dans les figures 3(A) et 3(B) (manuscrit 1). La médiane du contenu en SNP est de 45 SNP pour les puces 10K et 68 pour les 50K. La distribution du contenu en SNP indique cependant que la majorité des régions homozygotes est contenue dans l'intervalle [20 , 30] SNP pour les 10K et [35-50] pour les 50K. Ces constatations suggèrent que la majorité des régions homozygotes de petite taille sont dues à une homozygotie par manque d'informativité des SNP ou à une consanguinité éloignée. Les régions homozygotes qui comprennent les mutations retrouvées chez les 10 familles, ont une taille supérieure à la médiane sauf pour la famille 6 et le patient P4 de la famille 1.

Le seuil d'analyse de l'homozygotie s'est révélé approprié dans les cas de consanguinité au premier degré. Pour des consanguinités plus anciennes tel que le cas du neveu P4 de la famille 1, les régions homozygotes sont plus petites et le seuil est inapproprié. La famille 6 consanguine au premier degré, a été analysée par puce 10K. L'unique région d'homozygotie partagée par les 3 atteints de cette famille est de 27 SNP. Cette région se situe au dessus du seuil mais en dessous de la médiane. Il s'agit d'une très grande région de 23 Mb couverte par seulement 27 SNP.

Manuscrit 1

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

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

Article soumis.

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

D. H'mida-Ben Brahim^{1,2}, A. M'zahem³, M. Assoum¹, Y. Bouhlal⁴, F. Fattori⁵, M. Anheim^{1,6}, L. Ali-Pacha⁷, F. Ferrat⁸, M. Chaouch⁸, C. Lagier-Tourenne¹, N. Drouot¹, C. Thibaut¹, T. Benhassine⁹, Y. Sifi³, D. Stoppa-Lyonnet¹⁰, K. N'Guyen¹¹, J. Poujet¹¹, A. Hamri³, F. Hentati⁴, R. Amouri⁴, F. M. Santorelli⁵, M. Tazir⁷ and M. Koenig¹.

¹ Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/Université de Strasbourg, 67404 Illkirch, France; Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, F-67000 France

² Laboratoire de Cytogénétique, Génétique Moléculaire et Biologie de la Reproduction Humaines. CHU Farhat HACHED , Sousse, 4011, Tunisia.

³ Centre Hospitalo-Universitaire Ben Badis, Constantine, Algeria

⁴ Institut de Neurologie, Tunisi, Tunisia

⁵ Molecular Medicine & Neurosciences IRCCS Bambino Gesù Hospital, Roma, Italy

⁶ Service de Neurologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67091 Strasbourg, France

⁷ Service de Neurologie, Centre Hospitalo-Universitaire Mustapha, Alger, Algeria

⁸ Service de Neurologie, Etablissement Hospitalier Spécialisé de Ben Aknoun, Alger, Algeria

⁹ Institut Pasteur, Alger, Algeria,

¹⁰ Institut Curie, Service de Génétique, INSERM U830, F-75248, Université Paris Descartes, F-75270

¹¹ Hôpitaux Universitaires de Marseille, Marseille, France.

Running title : Diagnosis of known recessive ataxias by SNP arrays

Abstract:

The diagnosis of rare inherited diseases is becoming more and more complex as an increasing number of clinical conditions appear to be genetically heterogeneous. Multigenic inheritance also applies to the autosomal recessive progressive cerebellar ataxias (ARCA), where 14 genes have been identified and more are expected to be discovered. We used homozygosity mapping as a guide for identification of the defective locus in patients with ARCA born from consanguineous parents. Patients from 97 families were analyzed with GeneChip Mapping 10K or 50K SNP Affymetrix microarrays. We identified six families homozygous for regions containing the ARSACS gene, two families homozygous for the ataxia-telangiectasia gene (ATM), two families homozygous for the AOA1 gene, and one family homozygous for the AOA2 gene. Upon direct gene testing, we were able to identify a disease-related mutation in all families but one of the two kindred homozygous at the ATM locus. Although linkage analyses pointed to a single locus on chromosome 11q22.1-q23.1 for this family, clinical features, normal levels of serum alpha-fetoprotein as well as absence of mutations in the *ATM* gene rather suggest the existence of an additional ARCA-related gene in that interval. While the use of homozygosity mapping was very effective at pointing to the correct gene, it also suggests that the majority of patients harbor mutations either in less common ARCA genes or in genes yet to be identified.

Introduction

The diagnosis of a wider number of rare inherited diseases is becoming increasingly difficult because of the frequent clinical overlap, non specificity of biomarkers and the expanding genetic heterogeneity, i.e. mutations in many different genes cause the same disease. In particular, multigenic inheritance applies for the autosomal recessive progressive cerebellar ataxias (ARCA), for which 14 genes have been identified in the past 15 years (Fogel and Perlman, 2007; Gros-Louis, et al., 2007; Lagier-Tourenne, et al., 2008), even after excluding the complex field of metabolic ataxias, for which biochemistry drives more precisely the correct molecular diagnosis. In addition, most conditions are associated with mutations in genes of remarkably large coding capacity (SYNE1 (NM_182961) 26 kb in 145 coding exons (Gros-Louis, et al., 2007), Sacsin (NM_014363) 14 kb in 9 exons (Engert, et al., 2000; Ouyang, et al., 2006), ATM (NM_000051) 9 kb in 62 exons (Savitsky, et al., 1995), Senataxin (NM_015046) 8 kb in 24 exons (Moreira, et al., 2004), PolG (X98093) 4 kb in 22 exons (Van Goethem, et al., 2003a)), further complicating the definition of an efficient strategy for seeking pathogenic mutations (Anheim, et al., 2009). On the other hand, consanguinity is a common observation in rare recessive diseases, with an increasing proportion of in populations where inbreeding is frequent. Homozygosity mapping of patients born from consanguineous parents can be used as a powerful guide for identification of the defective locus (Ben Hamida, et al., 1993b). We demonstrate here the usefulness and limits of homozygosity mapping with SNP arrays (Lagier-Tourenne, et al., 2008; Stoetzel, et al., 2006) in consanguineous cases for the molecular diagnosis of spastic ataxia of the Charlevoix-Saguenay (ARSACS, saccin gene), ataxias with oculomotor apraxia types 1 and 2 (AOA1 and AOA2, aprataxin (NM_017692) and senataxin genes), and ataxia-telangiectasia (A-T, ATM).

Material and methods

Patients and families: Affected patients were referred for ARCA after careful exclusion of Friedreich ataxia (FRDA) (Campuzano, et al., 1996) and ataxia with vitamin E deficiency (AVED) (Ouahchi, et al., 1995) using molecular or metabolic investigations, respectively. The study population consisted of 97 families, of different origins: 67 kindred were Algerian, 27 French, 8 Saudi Arabian, 2 Tunisian, 3 were from the USA and 11 from other origins.

SNP genotyping: genome wide homozygosity mapping of 97 families was undertaken using either the GeneChip Mapping 10k Xba 142 2.0 Array containing 10,204 SNP markers or the Mapping 50K Xba 240 Array containing 58,102 SNPs (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA). SNP genotypes were obtained by following the Affymetrix protocol for the GeneChip Mapping Array (Mapping 10K2.0 Assay Manual (701722 Rev.3), Mapping 100K Assay Manual (P/N 701684 Rev.3)). Briefly, 250 ng of genomic DNA isolated from peripheral blood were digested with the restriction endonuclease XbaI for 2.5 h. Digested DNA was mixed with Xba adapters and ligated using T4 DNA ligase for 2.5 h. Ligated DNA was added to 4 to 5 separate PCR reactions, amplified, pooled and purified to remove unincorporated dNTPs. The purified PCR product was then fragmented with DNase I, end-labeled with biotin and hybridized to an array for 16 h at 48°C in a standard Affymetrix 640 hybridization oven. After hybridization, the arrays were stained and washed using an Affymetrix Fluidics Station F450 and images were obtained using an Affymetrix GeneChip scanner 3000 7G. Single-nucleotide polymorphism (SNP) allele calls were generated by the GeneChip Genotyping analysis Software (Gtype v4.1). Homozygous regions were identified with the HomoSNP software developed to visualize shared regions of homozygosity in consanguineous families (software available on request from plewniak@igbmc.u-strasbg.fr) (Lagier-Tourenne, et al., 2008; Stoetzel, et al., 2006; Stoetzel, et al., 2007).

Microsatellite marker analysis: Microsatellite markers referenced to the UCSC Human genome database (<http://genome.ucsc.edu>, March 2006 release) were used. Analysis was undertaken on an ABI Prism 3100 genetic analyzer with allele sizes determined using the ABI PRISM1 Genotyper software package (Applied Biosystems, Foster City, CA) (Lagier-Tourenne, et al., 2003).

Mutational Analysis: Sequencing of the candidate genes for recessive ataxias, including all exons and intronic–exonic boundaries was undertaken using PCR primers as previously reported (Lagier-Tourenne, et al., 2008). Amplified PCR products were purified on Montage PCR96 Cleanup Plates (Millipore, Bedford, MA) and bi-directionally sequenced using BigDye Terminator chemistry implemented on an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer. Sequences were aligned and compared with consensus sequences obtained from the human genome databases (<http://genome.ucsc.edu>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the software package Seqscape. (Version 2.5; ABI). All PCR primers and conditions are available upon

request. Parental segregation of the identified mutations was investigated in all available family members.

Results

Families with a diagnosis of FRDA, AVED, metabolic ataxias, ataxia with leukodystrophy or congenital ataxia (De Michele, et al., 2004) were excluded from the study. Some families had a direct molecular testing for ATM, AOA1 or AOA2, based on canonical clinical and biochemical findings, and were therefore not analysed on SNP arrays. The remaining 92 consanguineous ataxia families and 5 families with suspected ancient consanguinity were analyzed with Affymetrix 10K or 50K SNP Genechip microarrays. Only affected individuals from each family were genotyped. Regions of homozygosity shared within each family and overlapping with the ARSACS, AOA1, AOA2 and A-T loci were identified with HomoSNP. In order to rapidly define homozygous regions, only the number of consecutive homozygous SNPs was taken into account, assuming that for large regions, the global informativeness of the markers would be roughly equal to the number of analyzed SNPs. The threshold for identification of homozygous regions was set to a minimum of 20 consecutive homozygous SNPs identified with the 10K SNP Genechip microarrays and 35 consecutive homozygous SNPs identified with the 50K SNP Genechip microarrays. Because regions smaller than the threshold likely represent homozygosity by state (i.e. by chance), they were not subsequently analyzed. Overall, we identified six families homozygous for the region flanking the *SACS* gene, two families each for the *ATM* and the *APTX* genes, and one for the *SETX* gene (Table 1). The clinical features of the patients of these families are shown in Table 2. A mutation was identified in all the cases with the exception of one of the two families homozygous for the *ATM* region (Table 1). This family, family #10, consisted of 4 patients and 1 healthy sibling. Analysis of the entire family with 11q21-23 microsatellite markers (Figure 1) confirmed linkage of the disease to this locus with a LOD score of 3.1 ($\theta=0$) and re-analysis of the SNP data set indicated that there were no other homozygous regions shared between the 4 affected. Since the *MRE11* (NM_005591) gene — whose mutations have been detected in families with ataxia-telangiectasia-like disorder (MRE11A; MIM 604391) lies just outside the region of shared homozygosity due to a recombination in one of the patients (Figure 1), we also analyzed the coding exons and the flanking intronic sequences of *MRE11* but did not detect any disease-related mutation.

ARSACS mutation in family #1 was initially searched only in the affected uncle and aunt of family #1 and not in the affected nephews since homozygosity for the ARSACS region was above the threshold in the uncle and aunt (241 and 58 consecutive SNPs, respectively) and was below the threshold in one of the two nephews (24 consecutive SNPs in one nephew and 10 in the other, Figure 2). Because no known ataxia gene was localized in the large homozygous regions shared by the nephews, the ARSACS mutation of the uncle and aunt was subsequently searched and found in homozygosity in the nephews, indicating that the small homozygous region around the ARSACS gene in the nephews is due to ancient inbreeding, rather than to the second degree consanguinity of their parents (Figure 2). In order to see whether the thresholds used to define regions of homozygosity allowed efficient identification of the regions of linkage, we analyzed the SNP content of all homozygous regions identified in the 11 families reported in this study. With a threshold of 20 consecutive homozygous SNPs for the 10K SNP arrays and 35 consecutive homozygous SNPs for the 50K SNP arrays, the median SNP content of the homozygous regions was 45 SNPs for the former and 68 SNPs for the latter. However the distribution of SNP content indicated that the largest fraction of homozygous regions was in the lower range (20-30 SNP fraction for the 10K arrays and 35-50 SNP fraction for the 50K arrays, Figure 3), suggesting that most small homozygous regions either represent homozygosity by state rather than by descent, or result from high inbreeding in the respective populations. The SNP content of the homozygous regions containing the mutation (Table 1) was above the median SNP content of all homozygous regions (Figure 3) with the exception of family #6 and of the nephews of family #1, indicating that the threshold for defining homozygous regions was set at safe lower value. However, while it appeared that the threshold is appropriate when the disease is the consequence of first degree consanguinity, it is probably unsuitable for ancient consanguinity.

Discussion

The use of homozygosity mapping as an orientation for identification of the defective gene pointed to the correct locus in 10 out of 11 families for which the linked homozygous region overlapped with one of the four investigated genes. This strategy turned out to be highly effective for ARSACS as all six linked families had mutation in *SACS*, while clinical presentation alone would have not permitted to easily distinguish ARSACS from other spastic ataxias. Conversely, the clinical and paraclinical presentation of one AOA1 family #7, of the AOA2 family and of the A-T family would have been sufficient to directly orient mutation

search in the correct gene without prior SNP analysis (Barbot, et al., 2001a; Taylor and Byrd, 2005). This was not the case for AOA1 family #8, where patients had a very late onset disease and no motor neuropathy even after a long disease duration (Criscuolo, et al., 2005), and for family #10. In the latter case, it is not possible to conclude at present whether this is a very atypical form of A-T with normal alpha-foetoprotein serum level (Stankovic, et al., 1998) due to a mutation in the regulatory or deep intronic sequences (which were not analyzed when mutation scanning was performed) or it corresponds to a novel form of ARCA lying on chromosome 11q21-23.

While the use of homozygosity mapping was very effective at pinpointing the correct gene in ARCA kindred, it also revealed that the majority of remaining recessive ataxia cases may be caused by mutations either in the less common, recently identified genes including *MRE11* (Stewart, et al., 1999), *TDP1* (Takashima, et al., 2002), *POLG1* (Van Goethem, et al., 2003a), *twinkle* (Nikali, et al., 2005), and *SYNE1* (Dupre, et al., 2007; Gros-Louis, et al., 2007), ...) or more likely in genes yet to be discovered. It is also possible that homozygosity mapping failed at identifying the correct gene either because the patients were compound heterozygous despite consanguinity or because our thresholds for identifying homozygous regions excluded small regions of homozygosity due to inbreeding. This caveat is well illustrated by cases 3 and 4 in family #1. Homozygosity for the mutation is presumably not explained by the second degree consanguinity of the parents but by inbreeding that relates the mother with her husband's grand-grand-parents (Figure 2B). This corresponds to the small region of homozygosity around the ARSACS gene in the nephews, not easily identified if those individuals had been studied singly (Figure 2A). It is predictable that the use of SNP arrays with higher density should circumvent this difficulty. Nevertheless, in most families, identification of novel homozygous regions in patients with recessively inherited forms of cerebellar ataxia paves the way for the discovery of novel related genes (Lagier-Tourenne, et al., 2008).

Acknowledgements

We wish to thank Catherine Dubois d'Enghien for ATM gene sequencing. This study was financially supported by funds from the Institut National de la Santé et de la Recherche Scientifique (INSERM), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), and the Agence Nationale pour la Recherche-Maladies Rares (ANR-MRAR) to M.K., and the E-Rare EUROSPA network (to F.M.S.). D.H-B.B. was supported by the French association

“Connaître les Syndromes Cérébelleux”; M.A. is supported by a BDI fellowship from CNRS; F.F. is a fellow of the Roma Tre University-IRCCS Bambino Gesù Hospital joint PhD programme.

Legend to Figure

Figure 1: Genotyping results of family #10. (A) Homozygous regions over chromosome 11 in the patients of family #10. Homozygous regions are displayed by the HomoSNP software as blue bars (more than 30 consecutive homozygous SNPs), purple bars (more than 25 consecutive homozygous SNPs) and pink bars (more than 20 consecutive homozygous SNPs). SNP results were obtained with 50K arrays. The 4 patients share a region of homozygosity by descent on 11q21-q23, which contains the *ATM* gene. Vertical green bars that interrupt the regions of homozygosity correspond to one or two heterozygous SNPs that are in fact calling errors. (B) Pedigree of family #10 with microsatellite markers and selected SNP genotypes that locate precisely the recombination breakpoints. The recombination in patient P27 excludes the *MRE11* gene. This was corroborated by direct gene testing (see text). Markers and physical positions are indicated on the left and are organized from top to bottom in the centromeric to telomeric order.

Figure 2: Genotyping results of family #1. (A) Homozygous regions over chromosome 13 in the patients of family #1. Homozygous regions are displayed by the HomoSNP software as blue bars (more than 25 consecutive homozygous SNPs), purple bars (more than 20 consecutive homozygous SNPs) and pink bars (more than 15 consecutive homozygous SNPs). SNP results were obtained with 10K arrays. The top horizontal line indicates the position of recessive-ataxia loci and genes. Subsequent lines indicate individual results of the patients represented on the left. Three of the 4 patients share a region of homozygosity by descent on 13q12, which contains the *SACS* gene. (B) Pedigree and SNP analysis of family #1 showing that homozygosity for the disease in the affected nephews is due to inbreeding (dotted arrows) rather than to consanguinity. The uncle and aunt, born from a first degree consanguineous marriage, share a large homozygous region overlapping the ARSACS locus while the nephews were homozygous over only 24 and 10 consecutive SNP, respectively, also overlapping the ARSACS locus.

Figure 3: Distribution of the size of the homozygous regions identified with the 10K (A) and 50K (B) SNP microarrays in the patients of the 11 recessive ataxia families described in this study. The size of homozygous segments is estimated by the number of consecutive

homozygous SNPs. It is likely that a significant fraction of the small homozygous regions represent homozygosity by state rather than by descent. The empty arrow indicates the median SNP content of all homozygous regions. The small arrows indicate the SNP content of the shared homozygous regions containing the mutation (the SNP content of the shared homozygous region between the uncle and the aunt for family #1 or of the unique linked region of family #10. Numbers at the top are family numbers.

References

1. Lagier-Tourenne C, Tazir M, Lopez LC, et al. ADCK3, an ancestral kinase, is mutated in a form of recessive ataxia associated with coenzyme Q10 deficiency. *Am J Hum Genet* 2008;82:661-672.
2. Fogel BL, Perlman S. Clinical features and molecular genetics of autosomal recessive cerebellar ataxias. *Lancet Neurol* 2007;6:245-257.
3. Gros-Louis F, Dupre N, Dion P, et al. Mutations in SYNE1 lead to a newly discovered form of autosomal recessive cerebellar ataxia. *Nat Genet* 2007;39:80-85.
4. Ouyang Y, Takiyama Y, Sakoe K, et al. Sacsin-related ataxia (ARSACS): expanding the genotype upstream from the gigantic exon. *Neurology* 2006;66:1103-1104.
5. Engert JC, Berube P, Mercier J, et al. ARSACS, a spastic ataxia common in northeastern Quebec, is caused by mutations in a new gene encoding an 11.5-kb ORF. *Nat Genet* 2000;24:120-125.
6. Savitsky K, Sfez S, Tagle DA, et al. The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum Mol Genet* 1995;4:2025-2032.
7. Moreira MC, Klur S, Watanabe M, et al. Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2. *Nat Genet* 2004;36:225-227.
8. Van Goethem G, Martin JJ, Dermaut B, et al. Recessive POLG mutations presenting with sensory and ataxic neuropathy in compound heterozygote patients with progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscul Disord* 2003;13:133-142.
9. Anheim M, Fleury M, Monga B, et al. Epidemiological, clinical, paraclinical and molecular study of a cohort of 102 patients affected with autosomal recessive progressive cerebellar ataxia from Alsace, Eastern France: implications for clinical management. *Neurogenetics* 2009.
10. Ben Hamida M, Belal S, Sirugo G, et al. Friedreich's ataxia phenotype not linked to chromosome 9 and associated with selective autosomal recessive vitamin E deficiency in two inbred Tunisian families. *Neurology* 1993;43:2179-2183.
11. Stoetzel C, Laurier V, Davis EE, et al. BBS10 encodes a vertebrate-specific chaperonin-like protein and is a major BBS locus. *Nat Genet* 2006;38:521-524.
12. Campuzano V, Montermini L, Molto MD, et al. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 1996;271:1423-1427.

13. Ouahchi K, Arita M, Kayden H, et al. Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the alpha-tocopherol transfer protein. *Nat Genet* 1995;9:141-145.
14. Stoetzel C, Muller J, Laurier V, et al. 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* 2007;80:1-11.
15. Lagier-Tourenne C, Tranebaerg L, Chaigne D, et al. Homozygosity mapping of Marinesco-Sjogren syndrome to 5q31. *Eur J Hum Genet* 2003;11:770-778.
16. De Michele G, Coppola G, Coccozza S, Filla A. A pathogenetic classification of hereditary ataxias: is the time ripe? *J Neurol* 2004;251:913-922.
17. Taylor AM, Byrd PJ. Molecular pathology of ataxia telangiectasia. *J Clin Pathol* 2005;58:1009-1015.
18. Barbot C, Coutinho P, Choro R, et al. Recessive ataxia with ocular apraxia: review of 22 Portuguese patients. *Arch Neurol* 2001;58:201-205.
19. Criscuolo C, Mancini P, Menchise V, et al. Very late onset in ataxia oculomotor apraxia type I. *Ann Neurol* 2005;57:777.
20. Stankovic T, Kidd AM, Sutcliffe A, et al. ATM mutations and phenotypes in ataxia-telangiectasia families in the British Isles: expression of mutant ATM and the risk of leukemia, lymphoma, and breast cancer. *Am J Hum Genet* 1998;62:334-345.
21. Stewart GS, Maser RS, Stankovic T, et al. The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* 1999;99:577-587.
22. Takashima H, Boerkoel CF, John J, et al. Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. *Nat Genet* 2002;32:267-272.
23. Nikali K, Suomalainen A, Saharinen J, et al. Infantile onset spinocerebellar ataxia is caused by recessive mutations in mitochondrial proteins Twinkle and Twinky. *Hum Mol Genet* 2005;14:2981-2990.
24. Dupre N, Bouchard JP, Gros-Louis F, Rouleau GA. [Mutations in SYNE-1 lead to a newly discovered form of autosomal recessive cerebellar ataxia]. *Med Sci (Paris)* 2007;23:261-262.

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

Family	# of patients	SNP density	Chromosomal localisation	Size (Kb)	# of consecutive homozygous SNP	Ataxia genes	Mutation	
1	Uncle and aunt	2	10K	1p31.1	7049	27	ARSACS c.12847-12850 delAGAG p.Arg4283ArgfsX24	
				2p25.1-p22.3	21567	94		
				6p25.1-p23	8693	40		
				7p14.3-12.2	17765	87		
				7q35	3861	20		
				11q14.2-q22.1	12827	67		<i>MRE11</i>
	13q12.11-q12.3	11351	58	<i>SACS</i>				
	Nephews	2	10K	6q23.2-q24.1	6936	15 ^a		
				13q12.12-12.13	2890	10 ^a		<i>SACS</i>
				13q21.2-q22.1	15219	72		
13q33.3-qter				8301	36			
2	2	50K	16p13.1-p13.2	8423	25			
			2q31.2-q32.3	19084	441			
			3q12.3-q13.1	1940	42			
			4p12-q13.1	18409	355			
			5q14.1-q21.2	24028	607			
			5q35.1-qter	11910	160			
			8q13.1-q13.2	2760	35			
			8q24.13-q24.21	4004	70			
			9q33.2-q34.11	4898	37			
			13q11-q12.3	5864	141	<i>SACS</i>		
			17p11.2-q12	7075	59			
			17p12-p11.2	10779	143			
			3	2	50K	1p22.1-p21.3	4091	80
1q23.3-q25.1	11436	359						
1q42.12-q43	12372	253						
4p16.2-p16.1	4827	33						
13q12.11-q12.12	2165	72				<i>SACS</i>		
13q14.11-q14.12	1679	34						
15q21.1	1462	36						
4	4	50K	15q21.2-q21.3	1959	43	ARSACS c.12220G>C p.Ala4074Pro		
			10p11.21-q11.21	6296	35			
5	2	50K	13q12.11-q12.2	9335	233	<i>SACS</i>		
			1p36.11-p35.2	4788	26	ARSACS c.6409C>T p.Gln2137X		
			3q26.31-q26.33	9460	168			
			4q13.3	2208	38			
13q11-q12.13	7478	189	<i>SACS</i>					
6	3	10K	13p13-q12.12	23584	27	<i>SACS</i> ARSACS c.4882-4886 delCAGTT/insAGAAGC p.Gln1628ThrfsX13		
7	2	50K	2p24.3	1669	36	AOA1 c.837G>A p.Trp279X		
			2p22.1	848	39			
			3p22.1	1584	35			
			4p15.33-p15.32	3940	114			
			5q14.3	1550	41			
			5q21.1	1630	43			
			9p21.1-q21.13	46488	349		<i>APTX</i>	
			14q23.1	1564	38			
8	2	10K	18p11.31	1725	34	AOA1 c.781C>T p.Leu261Phe		
			1p31.1	6107	50			
			2p23.3-p21	20134	96			
			2p13.2-q11.2	24591	44			
			4q21.22-q23	18877	67			
			7p13-q21.2	46233	116			
7q22.2-q31.2	11705	30						

			9p21.1-q33.1	49549	70	<i>APTX</i>	
			9q33.1-q34.11	10938	39		
9	1	10K	1p13.2-q23.3	43273	71		A-T c.IVS36+3del4 Skipping of exon 36
			5p14.3-p13.3	10420	32		
			5q13.2-q14.3	19480	72		
			6p22.3-p21.32	11100	40		
			6q24.2-q25.1	147666	29		
			9p23-p22.3	4319	36		
			11q22.3-q23.3	12473	46	<i>ATM</i>	
			14q23.1-q31.1	18577	65		
			17p12-q12	13704	20		
			20p12.3-q12	11362	30		
10	4	50K	11q21-q23.3	10017	302	<i>ATM</i>	A-T ?
11	1	50K	1q25.3-q31.3	11121	300		AOA2 c.6848-6851delCAGA p.Try2283LysfsX32
			5q31.3-q33.1	10217	272		
			6p12.1-q14.1	19729	403		
			9q33.2-q34.3	13598	89	<i>SETX</i>	

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

Table 2: Clinical features of the patients

Family and diagnosis	1 ARSACS				2 ARSACS			3 ARSACS	
Origin	Tunisia				Algeria			Algeria	
Degree of Consanguinity	First		Second		First			First	
Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sex	F	M	M	M	M	F	F	M	M
Age of onset (years)	1	1	1	1	NA	6	2	9	30
Disease duration (in years)	29	37	16	12	NA	25	25	16	(deceased)
Cerebellar ataxia	+	+	+	+	NA	+	+	+	+
Gait	ataxo spastic	ataxo spastic	ataxo spastic	ataxo spastic	NA	spastic>ataxic	spastic>ataxic	unstable	unstable
Dysarthria	+ (scanning speech)	+ (hyposcousia)	-	-	NA	+	+	-	+
Bilateral Babinski sign	+	+	+	+	NA	+	+	-	-
Knee DTR	brisk	brisk	brisk	brisk	NA	absent	brisk	brisk	present
Ankle DTR	absent	absent	brisk	brisk	NA	absent	absent	absent	absent
Mental retardation	-	-	-	-	NA	mild	mild	-	?
Ocular abnormalities	horizontal nystagmus	horizontal nystagmus	horizontal nystagmus	horizontal nystagmus	NA	nystagmus	nystagmus	nystagmus	nystagmus
Pes cavus	-	-	-	-	NA	+	+	+	-
MRI	NA	NA	cerebellar and total spinal cord atrophy	NA	NA	cerebellar atrophy	cerebellar atrophy (vermis> hemispheres) and temporal atrophy	NA	NA
EMG	axonal sensitive neuropathy	axonal sensitive neuropathy	axonal sensitive neuropathy	axonal sensitive neuropathy	NA	sensitivo-motor axonal neuropathy	sensitivo-motor axonal neuropathy	sensitivo motor neuropathy	NA
AFP (ng/ul)	NA	NA	NA	NA	NA	2.1	NA		
Miscellaneous		systolic mitral murmur			NA				

Table 2(continued): Clinical features of the patients

Family and diagnosis	4 ARSACS				5 ARSACS		6 ARSACS		
	Algeria				Algeria		Algeria		
Degree of consanguinity	first			remote consanguinity	first		first		
Patient	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Sex	F	F	M	F	M	F	F	F	M
Age of onset (years)	21	4	5	5	6	12	6	7	12
Disease duration (in years)	25	39	36	25	17	14	23	21	10
Cerebellar ataxia	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gait	unstable	unstable	unstable	unstable	unstable	unstable	unstable	unstable	unstable
Dysarthria	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Bilateral BABINSKI sign	+	+	+	+	+	+	+	-	neutral
Knee DTR	brisk	brisk	brisk	brisk	brisk	brisk	brisk	present	reduced
Ankle DTR	absent	brisk	brisk	absent	brisk k	absent	absent	absent	absent
Mental retardation	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Ocular abnormalities	demyelinating neuropathy	demyelinating neuropathy	demyelinating neuropathy	demyelinating neuropathy	nystagmus	strabismus Nystagmus	slow nystagmus	nystagmus	nystagmus
Pes cavus	+	+	+	+	+	+	+	-	+
MRI	NA	NA	cerebellar atrophy	cerebellar atrophy	cerebellar atrophy	NA	vermis atrophy	NA	NA
EMG	NA	NA	demyelinating neuropathy	demyelinating neuropathy	demyelinating neuropathy	NA	sensitivo motor neuropathy	demyelinating neuropathy	demyelinating neuropathy
AFP (ng/ul)	NA	NA	NA	NA	1,67	NA	NA	NA	NA
Miscellaneous	scoliosis	amblyopia	deafness	hyperlordosis anemia	cyphosis	scoliosis			

Table 2 (continued): Clinical features of the patients

Family and diagnosis	7 AOA1		8 AOA1		9 AOA2	10 ?				11 A-T
Origin	Algeria		Lebanon		Algeria	Algeria				Algeria
Degree of consanguinity	first		first		first	first				remote consanguinity
Patient	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Sex	M	M	M	F	F	M	M	F	M	M
Age of onset (years)	5	6	16	32	4	7	8	7	9	15
Disease duration (in years)	11	8	NA	NA	7	27	21	13	24	5
Cerebellar ataxia	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gait	unstable	unstable	in wheelchair	with aid	unstable	unstable	unstable	unstable	unstable	unstable
Dysarthria	+	+	+/-	-	+	+	+	+	+	+
Bilateral Babinski sign	-	-	equivocal	-	-	+	-	+	-	-
Knee DTR	absent	absent	absent	absent	reduced	absent	absent	absent	absent	reduced
Ankle DTR	absent	absent	absent	absent	reduced	absent	absent	absent	absent	reduced
Mental retardation	+	+	-	NA	-	-	-	-	-	-
Ocular abnormalities	oculomotor apraxia	oculomotor apraxia	abnormal ocular movements	-	oculomotor apraxia Telangiectasia Horizontal nystagmus Strabismus	oculomotor apraxia telangiectasia	oculomotor apraxia telangiectasia	oculomotor apraxia telangiectasia	oculomotor apraxia telangiectasia horizontal nystagmus	unilateral strabismus nystagmus
Pes cavus	+	-	-	NA	-	+	+	flat feet		+
MRI	Cerebellar atrophy	NA	vermis atrophy	NA	normal	NA	NA	cerebellar atrophy	cerebellar atrophy	cerebellar atrophy
EMG	Sensory neuropathy	Sensory neuropathy	sensory neuropathy	NA	axonal neuropathy	axonal neuropathy	NA	NA	axonal neuropathy	sensory neuropathy
AFP (ng/ul)	2.06	3	NA	NA	207	1.9	1.7	0.6	NA	21,5
Miscellaneous	scoliosis				dysphagia	upper-limb wasting	upper-limb wasting	scoliosis	upper-limb wasting	

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

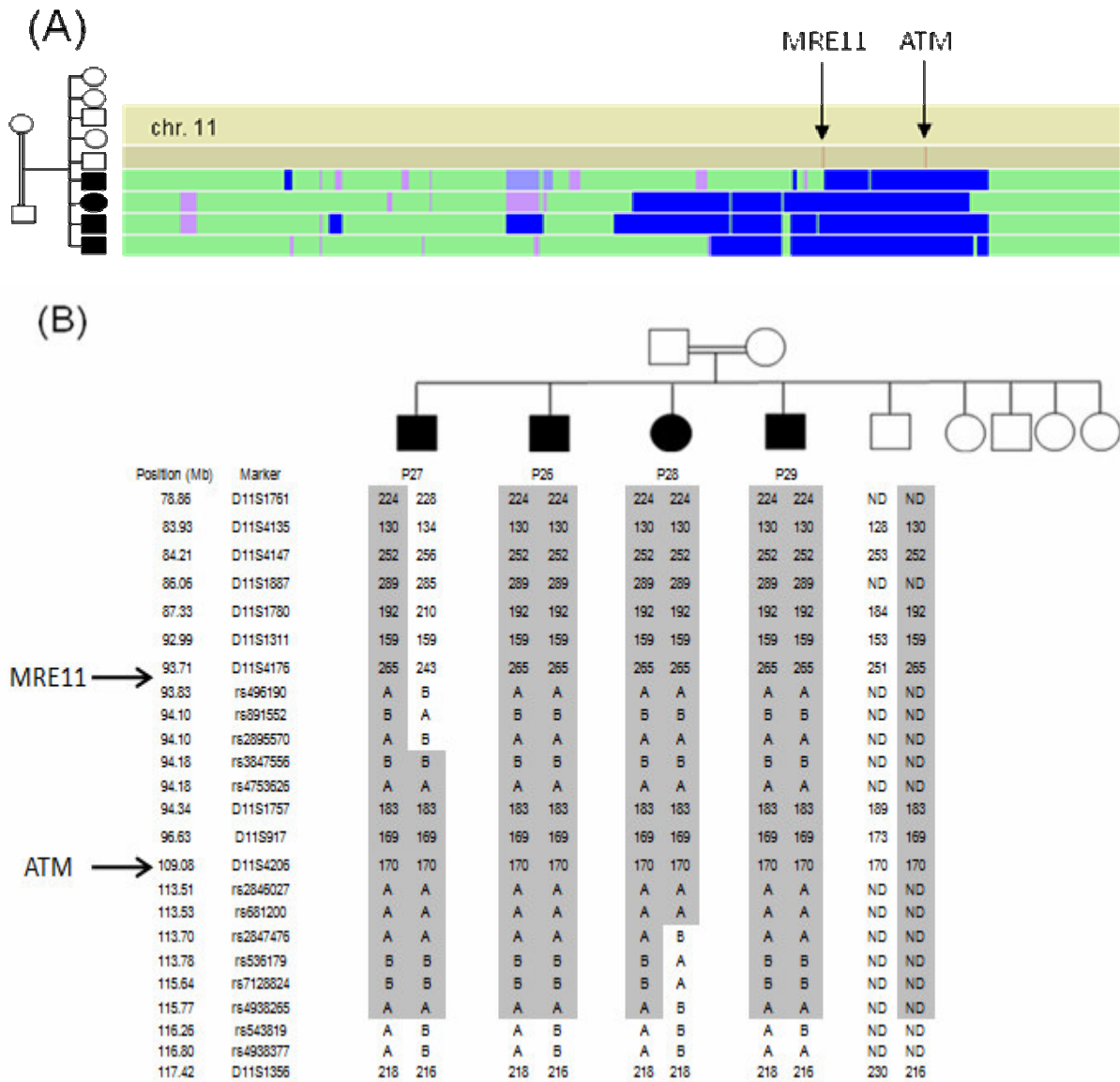


Figure 1: Genotyping results of family #10. (A) Homozygous regions over chromosome 11 in the patients of family #10

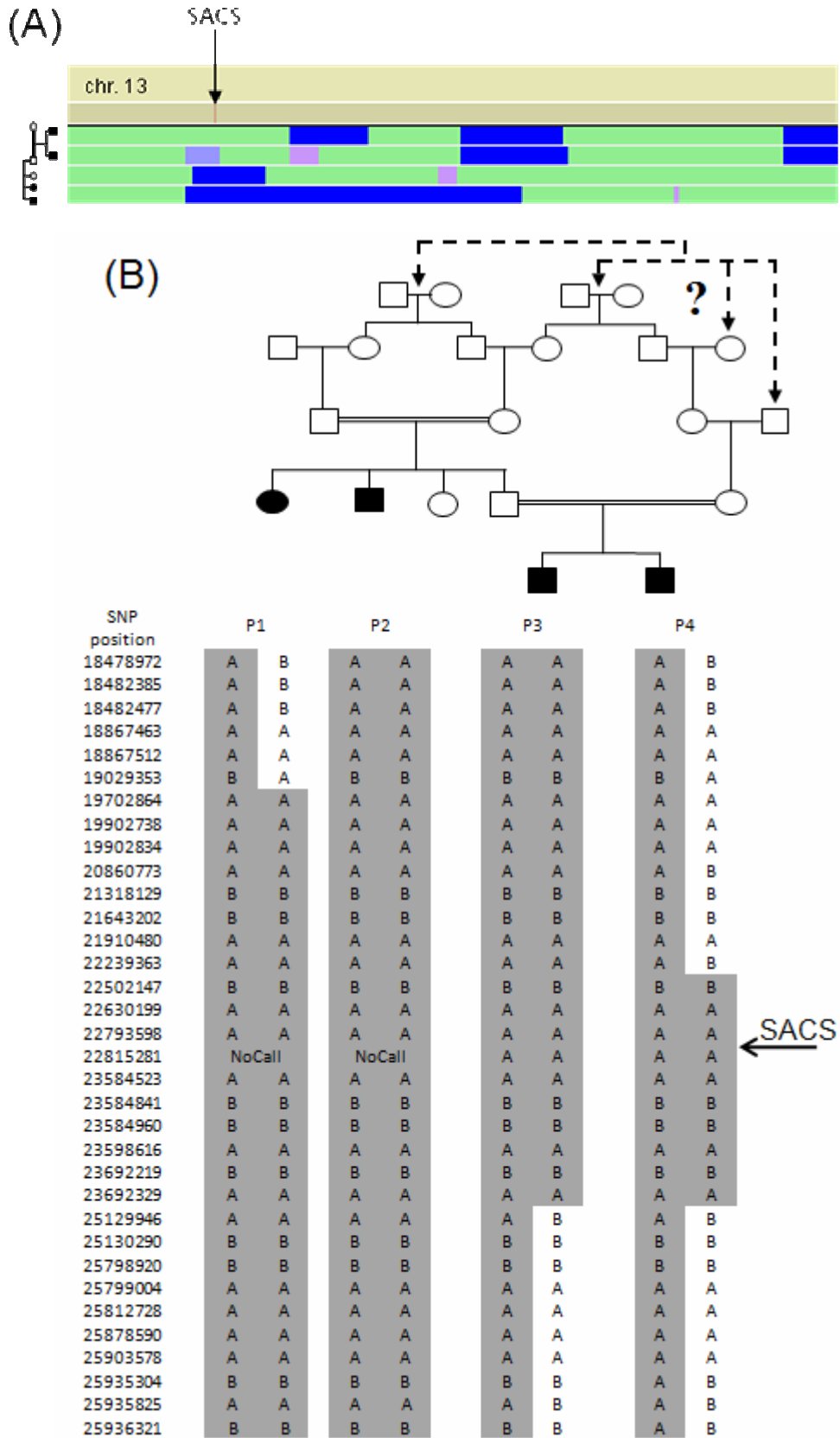


Figure 2: Genotyping results of family #1

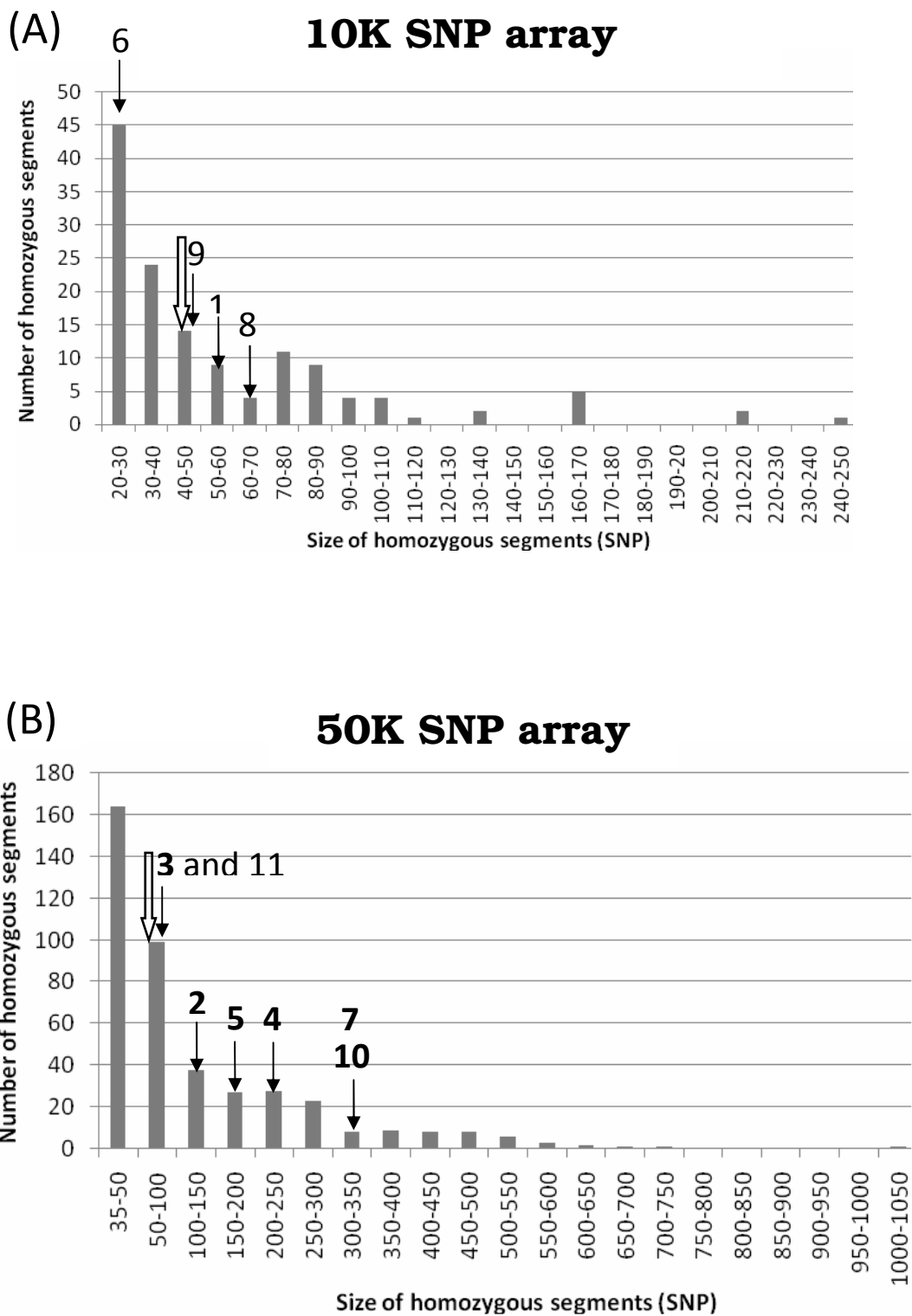


Figure 3: Distribution of the size of the homozygous regions identified with the 10K (A) and 50K (B) SNP microarrays in the patients of the 11 recessive ataxia families described in this study.

II- Le gène ABHD12 est muté dans une nouvelle forme d'ataxie récessive

Manuscrit 2: en cours de rédaction

ABHD12 a new recessive ataxia gene, mutated in Refsum Like disorder.

A- Identification de familles liées en 20p11.23-q13.12 :

1- Génotypage à l'aide de puces SNP :

Nous avons utilisé l'ensemble des 87 familles et patients analysés par cartographie par homozygotie et pour lesquels le diagnostic moléculaire n'a pas pu être établi (Chapitre I Résultats), pour chercher à identifier un nouveau locus d'ataxie récessive. La stratégie adoptée dans notre équipe a consisté à analyser en priorité les familles consanguines avec un nombre d'atteints supérieur ou égal à 2. Une fois un locus clairement identifié, nous avons alors analysé les familles consanguines avec un seul atteint pour tester si certains d'entre-eux présentaient une région d'homozygotie au niveau du même locus, ce qui permettait de tester l'hypothèse d'homogénéité génétique. En suivant cette ligne de conduite, nous avons dans un premier temps identifié 3 familles avec 2 ou 3 enfants atteints, Alg128, Alg139 et Alg96, homozygotes au niveau du chromosome 20 dans une région qui comprend le locus SCAR6 localisé en 20 p12-q12 (Figures 22 et 23). Ce locus avait précédemment été décrit par Tranebjaerg et al. 2003, chez une seule grande famille d'origine Norvégienne (Figure 2).

Le locus SCAR6 décrit dans le chapitre II s'étend de part et d'autre du centromère du chromosome 20. En 1985 Kavistad et al a rapporté la présentation clinique chez 7 patients consanguins norvégiens. L'atteinte débute à un âge précoce autour de la première année de vie par un retard de la marche. Plus tard une maladresse et une hypotonie musculaire s'installent. Aucune déficience mentale ni signes extra-neurologiques ne sont observés. A un âge adulte, la démarche devient ataxo-spastique, l'hypotonie encore plus marquée, et les patients présentent un retard statural avec des pieds plats. L'évolution de la maladie reste très peu progressive. L'IRM révèle une atrophie cérébelleuse essentiellement vermienne.

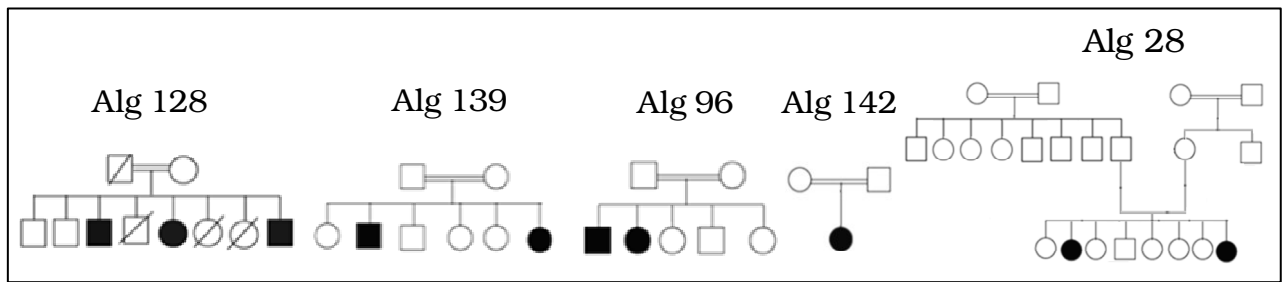


Figure 22: Arbres généalogiques des 5 familles liées au locus 20p12-q21

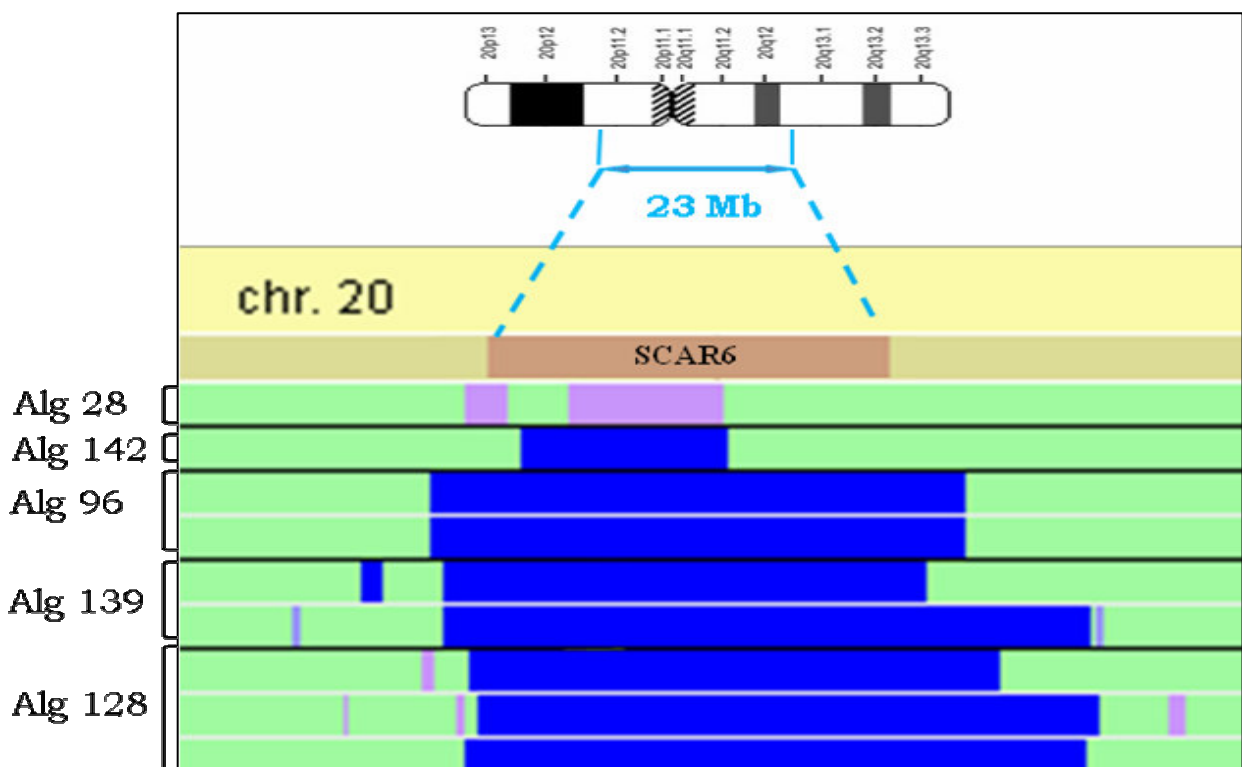


Figure 23: Diagramme HomoSNP des résultats de génotypage SNP des 5 familles Algériennes

2- Confirmation de la liaison par les marqueurs microsatellites

Nos avons procédé à la confirmation de l'homozygotie en SNP chez les atteints des 3 familles (Alg 128, 139 et 96) et avons testé l'hétérozygotie chez les parents et les enfants sains disponibles par une analyse d'un grand nombre de marqueurs microsatellites localisés dans cette région. L'homozygotie partagée dans chaque fratrie a été confirmée pour tous les microsatellites chez tous les patients (Figure 24, 24a,b,c,d,e). De plus, l'analyse d'un parent et de deux enfants sains pour les familles Alg128 et Alg96 a permis de déduire l'haplotype sain de l'autre parent et de vérifier que dans les deux familles, les deux parents étaient hétérozygotes pour la région analysée ainsi que les enfants sains analysés. L'analyse des enfants sains n'a pas mis en évidence de recombinaison permettant de réduire l'intervalle de liaison. Le LOD score en faveur de la liaison génétique au chromosome 20 pour chaque famille est de 2,6 ; 1,8 et 2,0, respectivement. Bien qu'aucune de ces 3 familles ne permette d'obtenir individuellement un LOD score de 3, la liaison à ce locus était fortement probable, car il s'agissait apparemment d'une confirmation d'un locus déjà connu. De plus, les familles Alg128 et Alg139, analysées avec les puces SNP 50K ne montraient pas d'autre région d'homozygotie partagée dans la fratrie, bien que la consanguinité des parents soit une consanguinité proche (premier degré), indiquant que le locus du chromosome 20 était le seul potentiellement lié dans ces familles.

La famille Alg96, analysée par puce SNP 10K, était par contre homozygote pour 5 autres régions (19q12-q13.2/ 8p23.2-p21.3 / 6q26-q27/ 3p14.1-p12.3/ 1p33-p32.3). Bien que ces trois familles soient toutes les 3 originaires de la région de Sétif dans le nord-est Algérien, aucun haplotype commun n'a été initialement mis en évidence, ce qui allait, contre toute attente, à l'encontre de l'hypothèse d'un effet fondateur entre les trois familles.

B- Recherche de mutations dans les gènes candidats positionnels :

Alors que de nouvelles familles consanguines avec un seul enfant atteint étaient en cours d'analyse par puces SNP, nous avons entrepris la recherche de mutations dans les gènes candidats de la zone homozygote délimitée par les 3 familles Algériennes Alg128, Alg139 et Alg96.

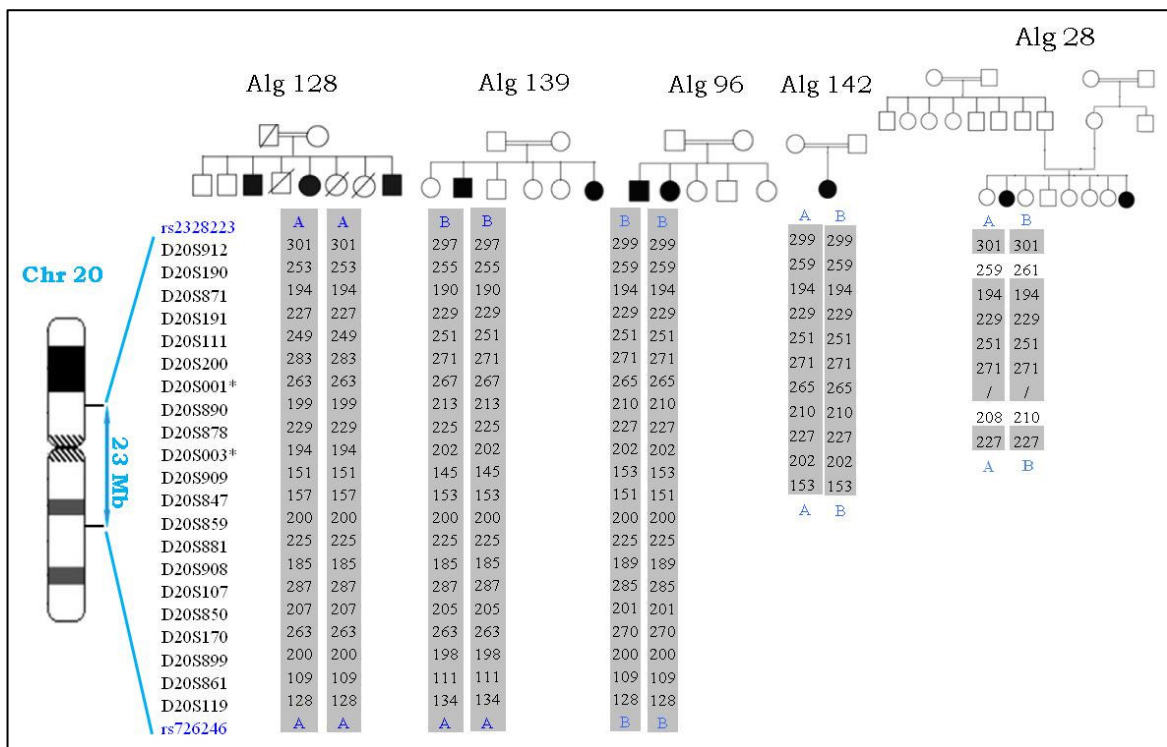
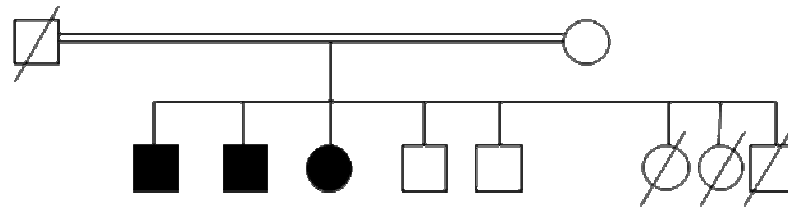
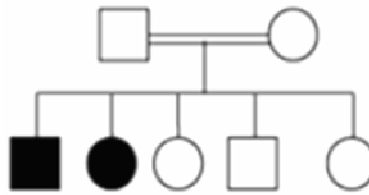


Figure 24 : Analyse par marqueurs microsatellites des 5 familles liées au locus SCAR6



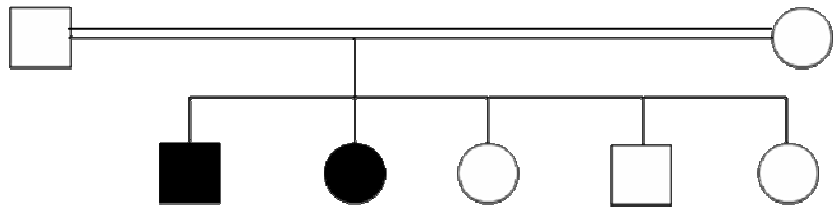
15,099,038	rs2123315		A	B		A	B
15,099,040	rs2026420		B	B		A	B
15,099,049	rs2123416		A	A		A	A
15,099,052	rs2123412	199	301	301	301	301	301
15,099,058	rs2123413		B	B		B	B
15,099,060	rs2123414	199	253	253	253	253	253
15,099,070	rs2123415		A	A		A	A
15,099,078	rs2123417	193	193	193	193	193	193
15,099,091	rs2123418	226	226	226	226	226	226
15,099,097	rs2123419	319	319	319	319	319	319
15,099,101	rs2123420	195	195	195	195	195	195
15,099,103	rs2123421	152	152	152	152	152	152
15,099,107	rs2123422	239	239	239	239	239	239
15,099,110	rs2123423	246	246	246	246	246	246
15,099,114	rs2123424	258	258	258	258	258	258
15,099,118	rs2123425	227	227	227	227	227	227
15,099,122	rs2123426	249	249	249	249	249	249
15,099,127	rs2123427		A	A		A	A
15,099,131	rs2123428	263	263	263	263	263	263
15,099,135	rs2123429	229	229	229	229	229	229
15,099,139	rs2123430	194	194	194	194	194	194
15,099,143	rs2123431		A	A		A	A
15,099,147	rs2123432	151	151	151	151	151	151
15,099,151	rs2123433	157	157	157	157	157	157
15,099,155	rs2123434		A	A		A	A
15,099,159	rs2123435	199	199	199	199	199	199
15,099,163	rs2123436	225	225	225	225	225	225
15,099,167	rs2123437	185	185	185	185	185	185
15,099,171	rs2123438	287	287	287	287	287	287
15,099,175	rs2123439	207	207	207	207	207	207
15,099,179	rs2123440	263	263	263	263	263	263
15,099,183	rs2123441	201	201	201	201	201	201
15,099,187	rs2123442	109	109	109	109	109	109
15,099,191	rs2123443	128	128	128	128	128	128
15,099,195	rs2123444		B	B		B	B
15,099,199	rs2123445		A	A		A	A
15,099,203	rs2123446		A	A		A	A

Figure 24a : Génotype des individus de la famille Alg128 (le génotype du père est prédit à partir des enfants sains et atteints)



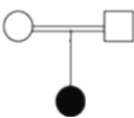
15,599,033	rs2023385	A	A	A	B
17,793,921	rs2328223	A	A	A	A
19,601,543	rs720436	A	A	A	A
20,808,812	D20S912	297	297	297	297
20,930,386	rs755963	B	B	B	B
21,258,407	D20S190	255	255	255	255
21,255,107	rs2296728	A	A	A	A
23,283,569	D20S871	190	190	190	190
25,279,450	D20SSTR1	228	228	228	228
25,370,957	D20SSTR6	319	319	319	319
25,402,150	D20SSTR2	195	195	195	195
25,703,981	D20SSTR7	152	152	152	152
25,786,350	D20SSTR3	239	239	239	239
25,788,150	D20SSTR4	246	246	246	246
25,789,800	D20SSTR5	258	258	258	258
26,114,910	D20S191	229	229	229	229
29,940,293	D20S111	251	251	251	251
30,429,539	D20S200	272	272	272	272
30,905,617	rs242528	A	A	A	A
31,134,000	D20S001*	267	267	267	267
31,599,059	D20S890	213	213	213	213
31,929,741	D20S878	225	225	225	225
32,000,000	D20S003*	202	202	202	202
32,309,697	rs2378132	A	A	A	A
33,915,657	D20S909	145	145	145	145
34,316,842	D20S847	153	153	153	153
35,738,578	rs10485478	B	B	B	B
35,876,721	D20S859	199	199	199	199
36,488,719	D20S881	225	225	225	225
37,247,368	D20S908	185	185	185	185
38,315,925	D20S107	287	287	287	287
38,844,551	D20S850	205	205	205	205
39,775,206	D20S170	263	263	263	263
41,150,267	D20S899	198	198	198	198
42,040,783	D20S861	111	111	111	111
43,082,264	D20S119	134	134	134	134
43,813,676	rs382558	B	B	B	A

Figure 24b : Génotype des individus disponibles de la famille Alg 139



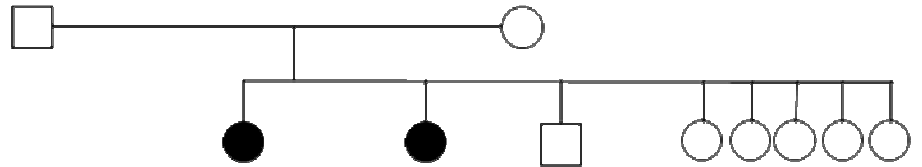
18,201,417	TC179601	A	A	A	B	A	B	A	A		
20,914,912	TC182912	299	299	299	299	299	299	299	299	299	299
21,204,417	TC181416	259	259	259	259	259	259	259	259	259	259
25,733,364	TC179712	194	194	194	194	194	194	194	194	194	194
26,274,461	TC182813	228	228	228	22	228	228	228	228	228	228
26,811,247	TC182814	/	/	319	319	319	319	319	319	319	319
29,400,110	TC182815	195	195	195	195	/	/	195	195	195	195
29,733,211	TC182817	152	146	152	152	152	152	152	152	/	/
29,798,817	TC182818	239	241	239	239	239	239	241	238	241	239
29,798,110	TC182814	246	232	246	246	246	246	231	231	232	246
29,798,260	TC182815	239	239	239	211	258	258	219	218	238	258
29,814,510	TC181191	229	227	229	229	229	229	229	229	229	229
29,841,298	TC181111	251	246	251	251	251	251	246	246	246	251
30,427,658	TC182011	271	269	271	271	271	271	269	268	269	271
30,834,117	TC182801*	265	241	265	265	265	265	241	248	/	/
30,959,129	TC182802	210	210	210	210	/	/	210	210	210	210
30,960,140	TC182803	227	227	227	227	227	227	229	229	229	227
32,017,117	TC182808*			202	202	202	202			/	/
33,915,217	TC182402	153	139	153	153	153	153	139	138	139	153
34,316,342	TC182407	151	167	151	151	151	151	167	161	167	151
36,431,179	TC182511	225	221	225	225	/	/	221	221	221	225
37,241,361	TC182401	189	191	189	189	189	189	191	191	191	189
37,311,321	TC181107	285	271	285	285	285	285	271	279	271	285
37,444,161	TC182805	201	218	201	201	201	201	218	211	218	201
39,715,214	TC181101	270	262	270	270	270	270	262	262	262	270
40,217,217	TC182804	200	191	200	200	200	200	191	210	191	200
42,141,198	TC182801	109	111	109	109	109	109	111	119	111	109
43,110,264	TC182816	128	134	128	128	128	128	134	138	134	128
43,444,321	TC182809	B	B	B	A	B	A	B	B		

Figure 24c : Génotype des individus disponibles de la famille Alg 96



20,808,812	D20S912	299	299
20,930,386	rs755963	A	B
21,258,407	D20S190	258	258
23,283,569	D20S871	193	193
25,279,450	D20SSTR1	228	228
25,370,957	D20SSTR6	319	319
25,402,150	D20SSTR2	195	195
25,703,981	D20SSTR7	152	152
25,786,350	D20SSTR3	239	239
25,788,150	D20SSTR4	246	246
25,789,800	D20SSTR5	258	258
26,114,910	D20S191	229	229
29,940,293	D20S111	251	251
31,599,059	D20S890	210	210
31,929,741	D20S878	227	227

Figure 24d : Génotype de l'individu atteint de la famille Alg 142



19,601,543	rs720436			A	B				
20,808,812	D20S912	302	296	302	302	302	302	302	296
21,258,407	D20S190	260	256	260	262	262	260	262	262
23,283,569	D20S871	194	200	194	194	194	194	194	200
25,279,450	D20SSTR1	228	226	228	228	228	228	228	226
25,370,957	D20SSTR6	/		319	319	319	319	319	315
25,402,150	D20SSTR2	195	195	195	195	195	195	195	195
25,703,981	D20SSTR7	152	148	152	152	152	152	152	146
25,786,350	D20SSTR3	239	254	239	239	239	239	239	254
25,788,150	D20SSTR4	246	248	246	246	246	246	246	248
25,789,800	D20SSTR5	258	243	258	258	258	258	239	243
26,114,910	D20S191	229	229	229	229	229	229	229	229
29,940,293	D20S111	251	251	251	251	251	251	251	251
30,429,539	D20S200	271	275	271	271	271	271	271	275
31,289,326	D20S195	278	266	278	278	278	278	/	
31,599,059	D20S890	208	206	208	210	210	208	210	206
31,929,741	D20S878	227	229	227	227	227	227	227	229
32,309,697	rs2378132			A	B				
33,915,657	D20S909	155	153	155	153	153	155	153	153

Figure 24e : Génotype des individus disponibles de la famille Alg 28

La région homozygote s'étalait sur plus de 23 Mb et comprenait plus de 200 séquences codantes. Devant ce grand nombre de gènes, un choix de gènes candidats s'est imposé. Nous avons décidé de choisir parmi les 220 gènes, ceux qui par perte de fonction pourraient être responsables d'ataxie récessive

Parmi les 220 gènes nous avons sélectionné 27 candidats par homologie fonctionnelle avec les protéines codées par des gènes connus impliqués dans des ataxies récessives (Tableau 10), nous avons ainsi sélectionné:

- 9 gènes qui codent pour des protéines mitochondriales ou prédites mitochondriales
- 3 gènes impliqués dans la réparation de l'ADN
- 3 gènes qui codent pour des protéines spécifiquement exprimées dans le cerveau
- 7 gènes qui codent pour des protéines nucléaires
- 5 gènes qui interagissent avec des protéines du Cytosquelette

1- Le gène CDK5RAP1 : polymorphisme rare ou mutation pathogène ?

Bien qu'il ne s'agisse pas de la mutation pathogène, j'ai choisi d'ouvrir une grande parenthèse autour du gène CDK5RAP1. Le travail autour de ce gène nous a pris plus d'une année : du mois de juillet 2007 au mois de Novembre 2008. Nous étions restés comme vous allez le constater dans ce paragraphe très hésitants quant à la pathogénicité de la mutation retrouvée.

Parmi les 9 gènes qui codent pour des protéines mitochondriales, nous avons choisi le gène CDK5RAP1 pour Cycline Dependant Kinase Related Associated Protein 1. CDK5RAP1 a tout d'abord été choisi car annoté dans les bases de données (UCSC) en tant que gène fortement exprimé dans le SNC et prédit mitochondrial. Des études d'homologies ont par la suite révélé qu'il s'agit d'un homologue du gène bactérien MiaB qui code pour une protéine Fer-Soufre mitochondriale. MiaB est une ARNt Methyl-thiol transferase. Elle est responsable comme son nom l'indique de l'incorporation d'un groupement méthyl au niveau du radical Thiol de l'adénine en position 37 des ARN de transfert phénylalanine et tryptophane mitochondriaux (mtARNtPhe et mtARNtTyr, Figure 25).

Tableau 10 : Critères de sélection des 27 gènes candidats positionnels séquencés

Critère de sélection des gènes candidats	Protéines mitochondriales	Réparation de l'ADN	Expression dans le cerveau	Protéine nucléaire	Intéraction avec le cytosquelette
Gène	NFS1 C20ORF118 ACSS1 C20ORF44 COX4i2 C20ORF52 TOMM34 CDK5RAP1 BCL2L1	TOP1 XRN2 CHD6	L3MBT EPB4IL PYGB	CRNKL1 C20ORF112 RALY RBM39 PLAGL2 PPP1R16B DUSP15	ACTR5 TPX2 MAPRE1 TTLL9 KIF3B

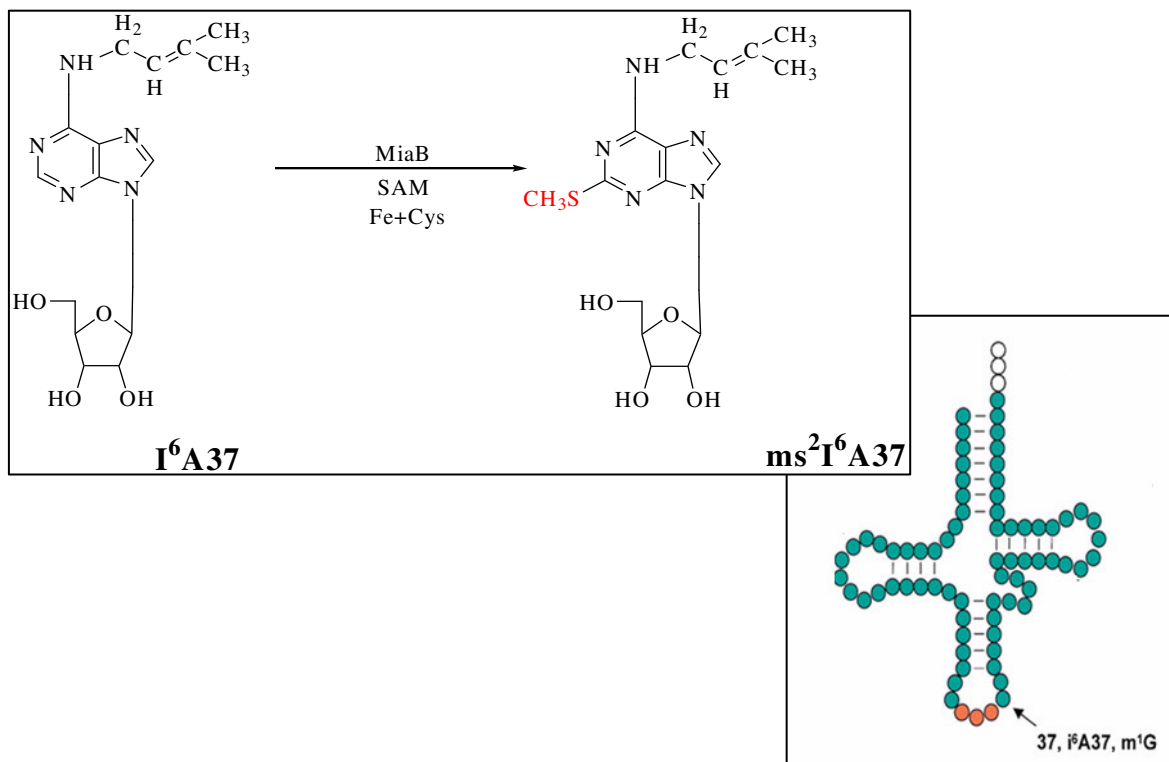


Figure 25 : Réaction de méthyl-thiolation catalysée par CDK5RAP1

En raison de la similitude fonctionnelle avec l'ataxie de Friedreich et l'ataxie/anémie sidéroblastique liée à l'X, où le déficit mitochondrial résulte en un déficit en protéines à centre Fer-Soufre, le gène CDK5RAP1 nous a semblé être un très bon candidat pour l'ataxie récessive que nous analysons.

Nous avons procédé au séquençage de CDK5RAP1 chez les atteints des 3 familles. Nous avons retrouvé une mutation homozygote faux-sens chez les deux atteints de la famille Alg96 : p.H470P. Aucune mutation n'a été retrouvée dans les deux autres familles, ce qui confortait à priori l'absence de déséquilibre de liaison et l'absence d'effet fondateur observable en première analyse entre les trois familles. Bien qu'il s'agisse d'une mutation faux sens, ce changement drastique d'une histidine conservée jusqu'au nématode *C. Elegans* en proline, qui est un acide aminé responsable de la formation de coude dans les structures protéiques, nous a incité à pousser les investigations pour ce gène. Nous avons tout d'abord testé cette mutation grâce à la technique de HRM utilisant le Light Scanner de Bioké, sur 470 chromosomes contrôles indépendants dont 312 Algériens et 158 français. La mutation H470P n'a jamais été retrouvée (Figure 26). Ce nouvel argument en faveur de la pathogénicité de la mutation H470P dans la seule famille Alg96, nous a amené à commencer une collaboration avec l'équipe du Pr Marc Fontecave spécialiste des protéines fer-soufre chez la bactérie et de MiaB en particulier, pour rechercher une éventuelle perte de fonction de la protéine. Une mutagenèse dirigée de MiaB chez la bactérie n'a pas montré d'altération de la fonction de méthyl-thiolation de l'ARN des transferts Phe et Tyr.

A ce stade de la thèse nous ne pouvons pas encore exclure complètement cette mutation puisque les analyses fonctionnelles ont été conduites chez la bactérie et que seule la fonction connue de MiaB a été testée.

2- Le gène XRN2 :

Un polymorphisme dans le gène XRN2 (5'-3' Exoribonuclease) impliqué dans la terminaison de la transcription a aussi été testé par HRM. XRN2 est un partenaire protéique de la sénataxine, mutée dans l'ataxie avec apraxie oculomotrice de type 2 (AOA2). Ce polymorphisme a été retrouvé chez 3 contrôles sains, confirmant qu'il s'agit bien d'un polymorphisme et non pas d'une mutation pathogène. (Figure 27)

3- Le séquençage des 25 autres gènes candidats :

Le séquençage des 25 autres gènes candidats n'a mis en évidence que des polymorphismes. Ces résultats ne seront pas détaillés dans le cadre de cette thèse.

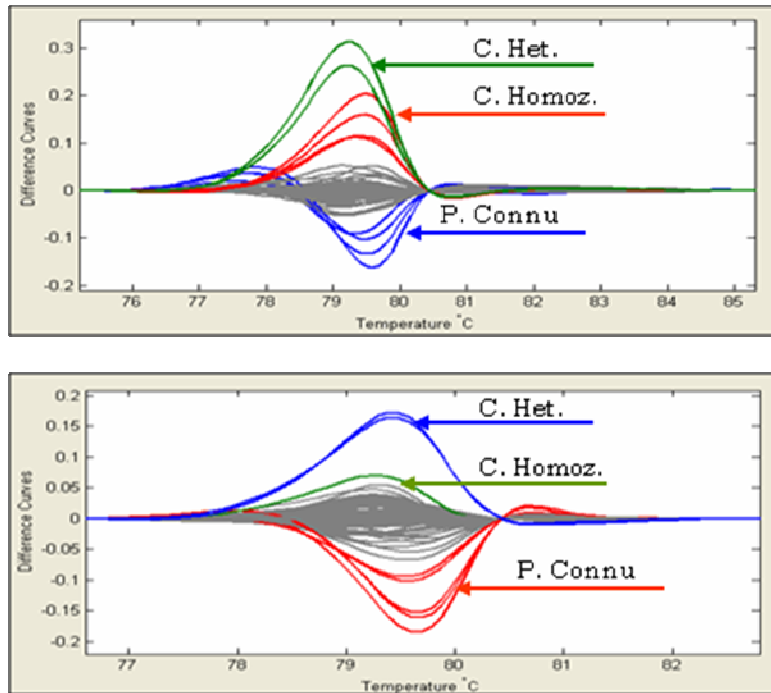


Figure26 : Résultats de l'analyse en HRM de 312 chromosomes contrôles pour la mutation H470P du gène CDK5RAPL1

C.Het : contrôles hétérozygotes H470P, C.homoz : contrôles homozygotes H470P, P.Connu : Polymorphisme connu. Les profils en couleur gris correspondent à des contrôles normaux.

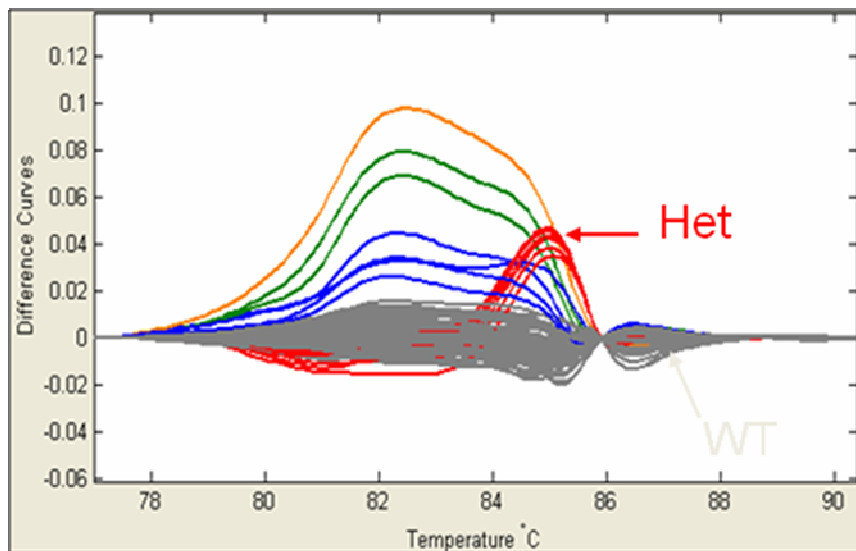


Figure 27 : Analyse du gène XRN2 par HRM

Het : contrôles hétérozygotes, WT : groupe contrôle

C- Recrutement de nouvelles familles consanguines :

A ce stade de mon travail de thèse, nous analysions en parallèle par puce SNP de nouvelles familles consanguines. Dans le but de recruter de nouvelles familles homozygotes sur le même locus du chromosome 20, nous avons également analysé les familles avec un seul enfant atteint disponible. Cette analyse nous a permis d'identifier plusieurs nouvelles familles homozygotes au niveau du locus péricentromérique sur le chromosome 20. Le séquençage du gène CDK5RAP1 dans ces familles a révélé deux familles Algériennes, également originaires de la région de Sétif du nord-ouest Algérien (Alg142 et Alg28, un deuxième atteint de la famille Alg28 a pu être étudié ultérieurement) portant la même mutation H470P que la famille Alg96, suggérant fortement un effet fondateur entre ces trois familles. Comme illustré par la figure 23, les deux familles Alg142 et Alg28 sont homozygotes dans une région comprise dans le locus SCAR6. De plus, les haplotypes homozygotes étaient identiques sur une région de 9 Mb commune avec la famille Alg96. Bien que le nombre de SNP et marqueurs microsatellites identiques dans cette région de 9 Mb soit assez faible (faible couverture en SNP de la région pericentromérique) ces données renforçaient l'idée d'un effet fondateur entre les trois familles Alg142, Alg28 et Alg96, ce qui est un argument fort pour établir la liaison des trois familles à ce locus. Le patient de la famille Alg142 était tout à fait concordant avec cette hypothèse parce qu'il était homozygote pour la mutation H470P du gène CDK5RAP1. Malheureusement, la patiente de la famille Alg28 posait un sérieux problème parce qu'elle était hétérozygote pour cette mutation, un résultat confirmé par l'analyse de la deuxième sœur atteinte, obtenue ultérieurement, alors que l'analyse de la ségrégation des marqueurs microsatellite confirmait qu'elle était haploidentique à la première sœur atteinte sur ce locus. Ce résultat indiquait que le gène CDK5RAP1 était juste en dehors de la petite région d'homozygotie de 9 Mb commune entre les 3 familles. Le séquençage de la totalité du gène CDK5RAP1 dans cette famille n'a pas mis en évidence de deuxième mutation hétérozygote, ce qui aurait pu être en rapport avec la consanguinité ancienne de cette famille.

D- Génotypage par puces SNP 6.0 :

Nous étions donc en présence de 5 familles Algériennes consanguines, toutes homozygotes sur des régions chevauchantes en 20 p12-q12 et toutes originaires de la même

région du nord-est de l'Algérie (Figure 28). L'analyse des 3 familles les plus informatives (Alg139, Alg128 et Alg96) n'a pas permis de réduire l'intervalle de liaison alors que l'analyse des deux petites familles Alg28 et Alg142 apportait une piste nouvelle. Nous avons alors décidé d'analyser par puces SNP haute densité « 6.0 », un atteint de chacune des 4 familles Alg139, Alg128, Alg96 et Alg28. Cette nouvelle génération de puce permet de génotyper plus de 900.000 SNP et 950.000 variations de nombre de copies (CNV).

Nous avons effectué cette analyse dans 3 buts :

- Confirmer ou exclure l'identité du petit haplotype homozygote de 9 Mb commun entre les familles Alg96 et Alg28 (la famille Alg142 n'a pas été analysée en puce 6.0 parce que l'effet fondateur avec la famille Alg96 était évident).
- Rechercher un éventuel très petit haplotype commun entre les familles Alg139 et Alg128, ce qui évoquerait un effet fondateur soit identique soit différent des familles Alg96, Alg142 et potentiellement Alg28.
- Rechercher à l'aide des sondes CNV la possibilité de variations du nombre copies au niveau des séquences codantes, qui indiqueraient la présence de mutations par délétion ou duplication. En particulier une délétion ou duplication hétérozygote du gène CDK5RAP1 dans la famille Alg28 expliquerait le résultat inattendu obtenu avec cette famille.

1- Effet fondateur ou haplotype ancestral fréquent ?

Les résultats de l'analyse par puce 6.0 sont résumés sur la figure 29. Cette analyse a révélé la présence d'un haplotype commun de 6 Mb entre les 3 familles Alg96, Alg28 et de façon inattendue également Alg139. De plus, un haplotype encore plus petit de 989 Kb a été retrouvé également partagé avec la famille Alg128. A cause de la très haute densité en SNP des puces 6.0, plusieurs autres régions partagées entre différentes combinaisons de familles ont été retrouvées. Ces régions sont visualisées par des barres noires sur la figure 29. Ces régions d'haploidentité correspondent certainement aux blocs de déséquilibre de liaison ancestraux tel que définit par HapMap.



Figure 28 : Origine géographique des 5 familles Alg 128, 142, 96, 139 et 28 du nord-est de l'Algérie et précisément de la région de Sétif.

L'haplotype de 989 Kb commun aux 5 familles Algériennes se trouve sur le bras court en région péri-centromérique. Il s'étend sur 989 Kb du SNP rs2274890 à la position 25,249,022 au SNP rs11906869 à la position 26,237,925 et comprend 6 gènes (figure 30) qui ne figurent pas parmi la liste des 27 gènes candidats du tableau 10.

Cet haplotype est couvert par 121 SNP. Nous avons reconstruit le génotype des 121 SNP (exprimés en allèles AA, BB ou AB sur les puces 6.0) en bases nucléotidiques (C,T,G,A) et nous avons confronté les génotypes SNP des 5 familles à ceux des populations HapMap les plus proches : Africaine et CEU. L'haplotype de 121 SNP a été trouvé identique en tout point à un haplotype représentant environ 5% des haplotypes présents à la fois dans la population Africaine du Nigéria et dans la population CEU (originaire d'Europe).

Les 6 gènes localisés sur le bras court en 20p12 sont, du plus proximal vers le plus distal : C20ORF191, ZNF337, NANP, NLP, GINS1 et ABHD12. La limite distale de cette région à la position 25,249,022 interrompt le gène ABHD12 au niveau de son quatrième intron. Nous avons séquencés toutes les séquences codantes comprises dans l'intervalle de 989 Kb chez les atteints et sains des 5 familles et aucune mutation n'a été retrouvée, suggérant (i) soit qu'une mutation se trouve en dehors de l'intervalle de 989 Kb, mais dans l'intervalle de 6 Mb commun entre Alg139, Alg96, Alg142 et Alg28 et qu'Alg128 porte une mutation différente, (ii) soit qu'une mutation commune aux cinq familles se trouve en dehors des séquences codantes.

2- Le gène CDK5RAP1 :

L'effet fondateur entre les familles Alg139, Alg96, Alg142 et Alg28 exclut le gène CDK5RAP1. Les 12 sondes CNV localisées près des exons de ce gène n'ont pas montré de gain (duplication) ni de perte d'allèle (hémizygotie) chez l'atteint de la famille Alg28, en accord avec l'effet fondateur en dehors de ce gène. De plus, aucune variation CNV n'a été identifiée sur les régions d'homozygotie du chromosome 20 de l'ensemble des familles.

E- Identification de 2 mutations dans le gène ABHD12 :

Au mois de Décembre 2008, nous avons reçu de la part de nos collaborateurs allemands de Bonn, une nouvelle famille d'ataxie récessive originaire des Emirats Arabes Unis. Nous avons analysé cette famille par puce SNP 10K, une homozygotie sur le chromosome 20 au même locus que les familles Algériennes a été retrouvée. Cette famille « G21 » consanguine au premier degré est composée de 10 membres : 3 atteints, 5 sains et les 2 parents. Les ADN de tous les membres de la famille étaient disponibles. L'analyse des marqueurs microsatellites sur l'ensemble des membres de la famille (Figure 31) montrait une ségrégation parfaite avec l'intervalle de 6 Mb identifié dans les familles Algériennes (LOD score de 3.02 en faveur de la liaison), confirmant ainsi les résultats de liaison obtenus sur les familles Algériennes.

Nous avons tout de suite entamé le séquençage des 6 gènes compris dans l'intervalle de 1 Mb dans cette famille. Ce travail a été réalisé par Nathalie Drouot. Une délétion de tout l'exon 1 du gène ABHD12 a été retrouvée chez les 3 atteints de la famille Emiratie (Figure 32). Cette délétion a été confirmée avec plusieurs jeux d'amorces PCR couvrant un minimum de 15 Kb. Une PCR longue de ce fragment de plus de 15 Kb sur le chromosome 20 utilisant une amorce sens à la position 25,312,162 (dans l'intron 0 du gène ABHD12) et une amorce antisens à la position 25,327,635 (dans l'intron 1 du gène ABHD12), montre une amplification d'un fragment de 2000 pb chez les 3 atteints et 3 sains hétérozygotes et l'absence d'amplification chez 2 contrôles sains (homozygotes sains)(Figure 33).

Nous sommes alors revenus vers nos 5 familles Algériennes chez lesquelles nous n'avions séquencé que les 4 premiers exons du gène ABHD12, pour séquencer les 7 exons restants. La même insertion de 7 pb, c.852_853insTAAGAGC, a été retrouvée dans l'exon 9 des 4 familles Alg139, Alg96, Alg142 et Alg28. Les trois premiers nucléotides insérés, TAA, sont en phase avec le cadre de lecture, entraînant ainsi l'apparition d'un codon STOP prématuré, p.His285Xfs1X (Figure 34). La présence de la délétion de l'exon 1 dans la famille émiratie et de la mutation tronquante dans 4 des familles Algériennes démontre qu'*ABHD12* est le gène défectueux dans cette nouvelle forme d'ataxie.

Aucune mutation n'a été retrouvée chez la famille Alg128, suggérant soit que la mutation se trouve dans les séquences non-codantes, soit que le gène muté chez Alg128 est différent.

Comme je l'ai décrit dans le chapitre Introduction.III.E , ABHD12 localisé en 20p12 code pour une hydrolase du 2AG. Ce gène est composé de 13 exons, il code pour une protéine de 404 acides aminés, qui comporte un site catalytique sérine-histidine-aspartate responsable de son activité catalytique.

Les 3 patients émiratis sont âgés (en 2009) de 24, 20 et 6 ans. Leur présentation clinique, résumée dans le tableau 11, rappelle celle du syndrome Refsum Like décrit dans le chapitre Introduction.E « les loci d'ataxies récessives ». Les 7 patients Algériens porteurs de la mutation c.852_853insTAAGAGC présentaient une clinique moins homogène. Les caractéristiques cliniques des 10 patients sont résumées dans le tableau 11.

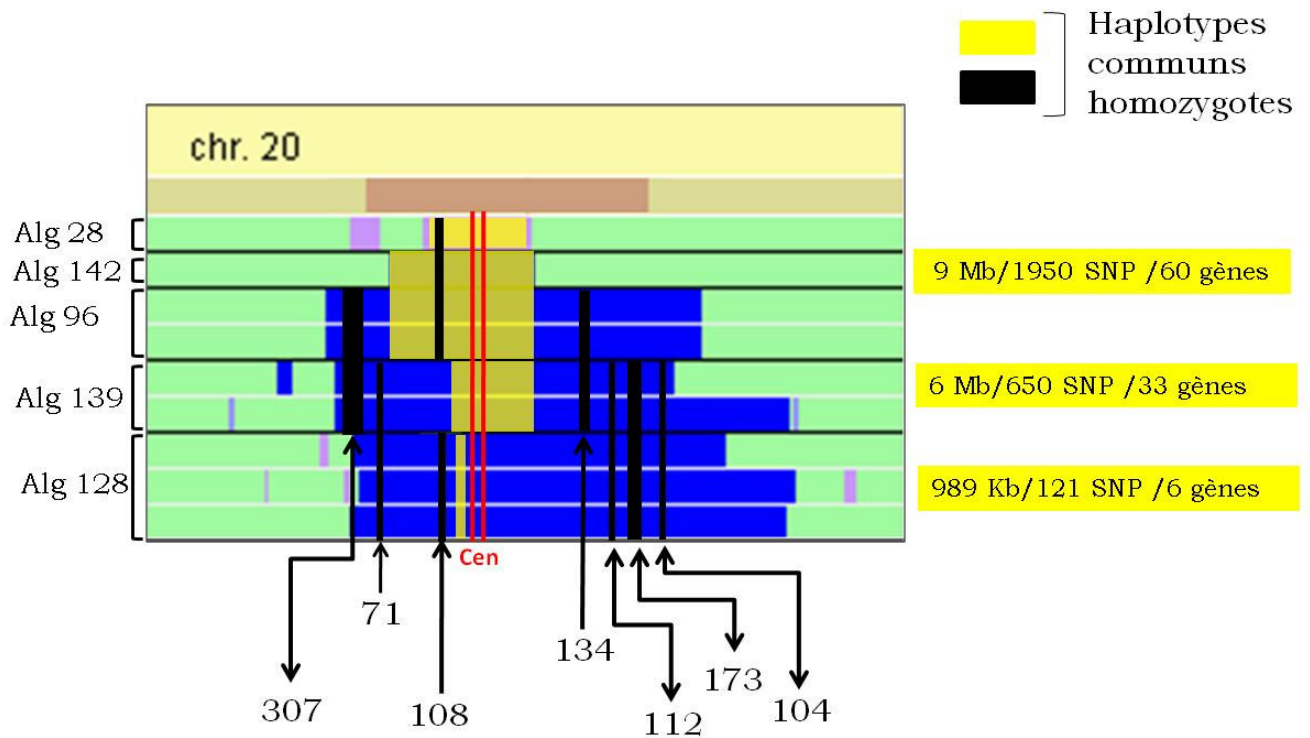


Figure 29 : Zones d'homozygotie détectées par les puces SNP 6.0.

En couleur noire et jaune sont représentés les haplotypes communs révélés par la puce 6.0. Ces haplotypes sont superposés aux résultats des puces 10 et 50K (représentés en bleu) générés par HomoSNP. Cen : localisation du centromère du chromosome 20. La famille 142 n'a pas été analysée par puce 6.0, les suppositions de résultats de puce 6.0 pour cette famille sont fondées sur un effet fondateur évident.

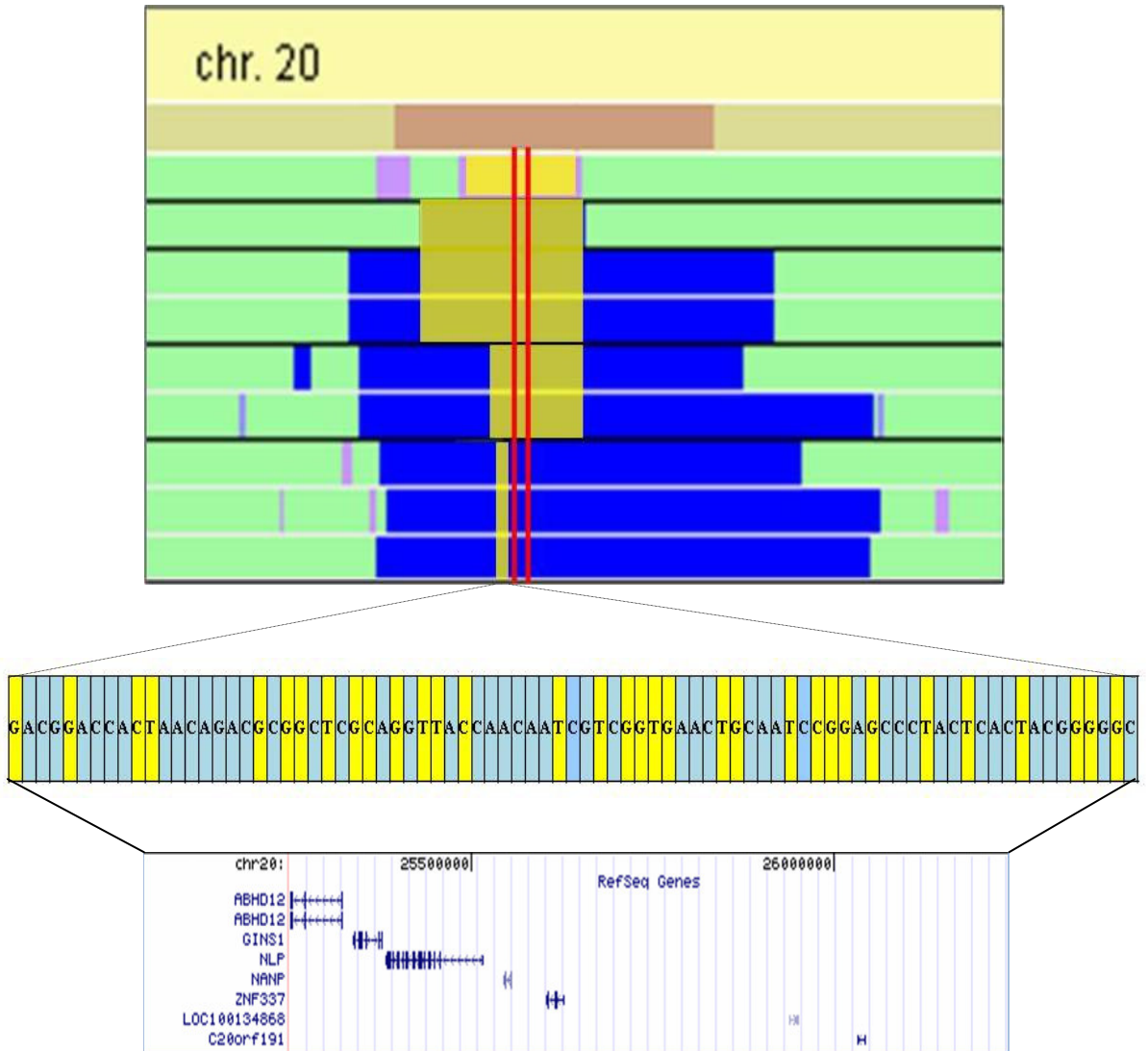


Figure 30 : La reconstruction de l'haplotype en bases nucléotidiques et les 6 gènes compris dans les 989 Kb

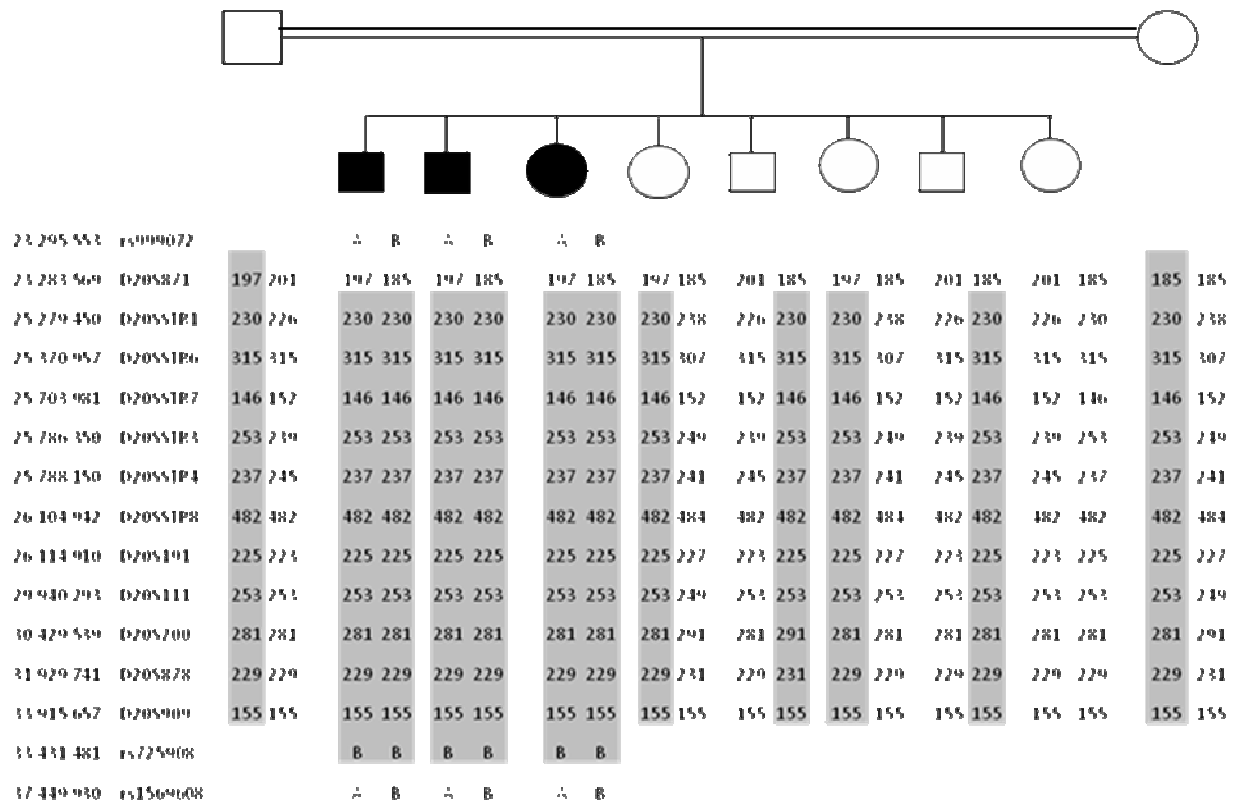


Figure 31: Confirmation de l'homozygotie chez la famille émiratie G21
par analyse des marqueurs microsatellites

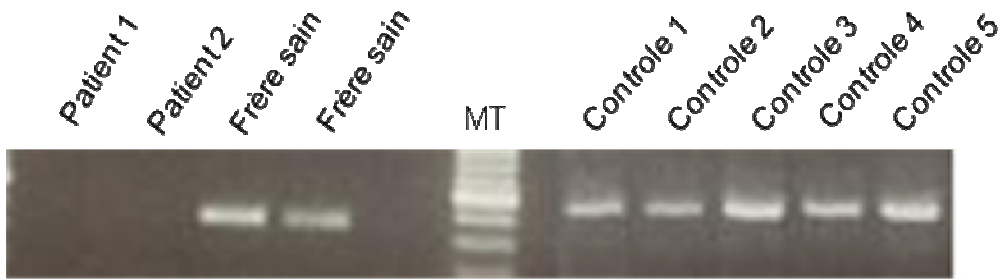


Figure 32 : Résultats de la réaction PCR de l'exon 1 du gène ABHD12

La Famille émiratie G21 : (Patient 1 et 2, deux frères sains) ; 5 contrôles sains non apparentés, MT : marqueurs de taille

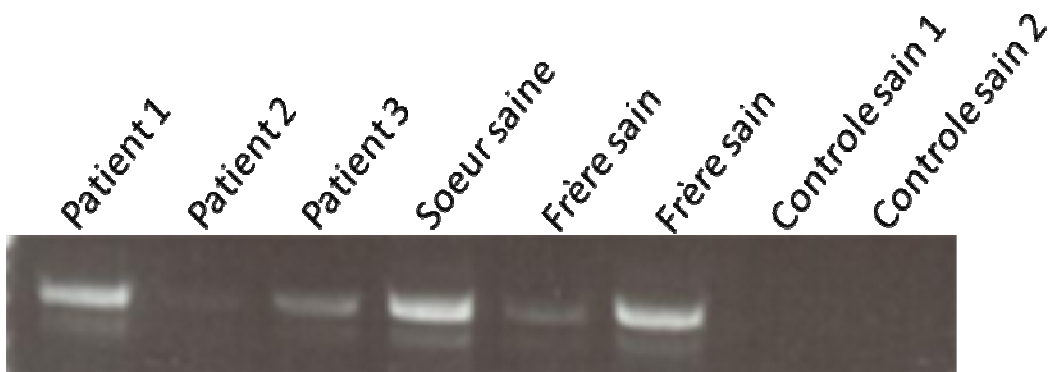
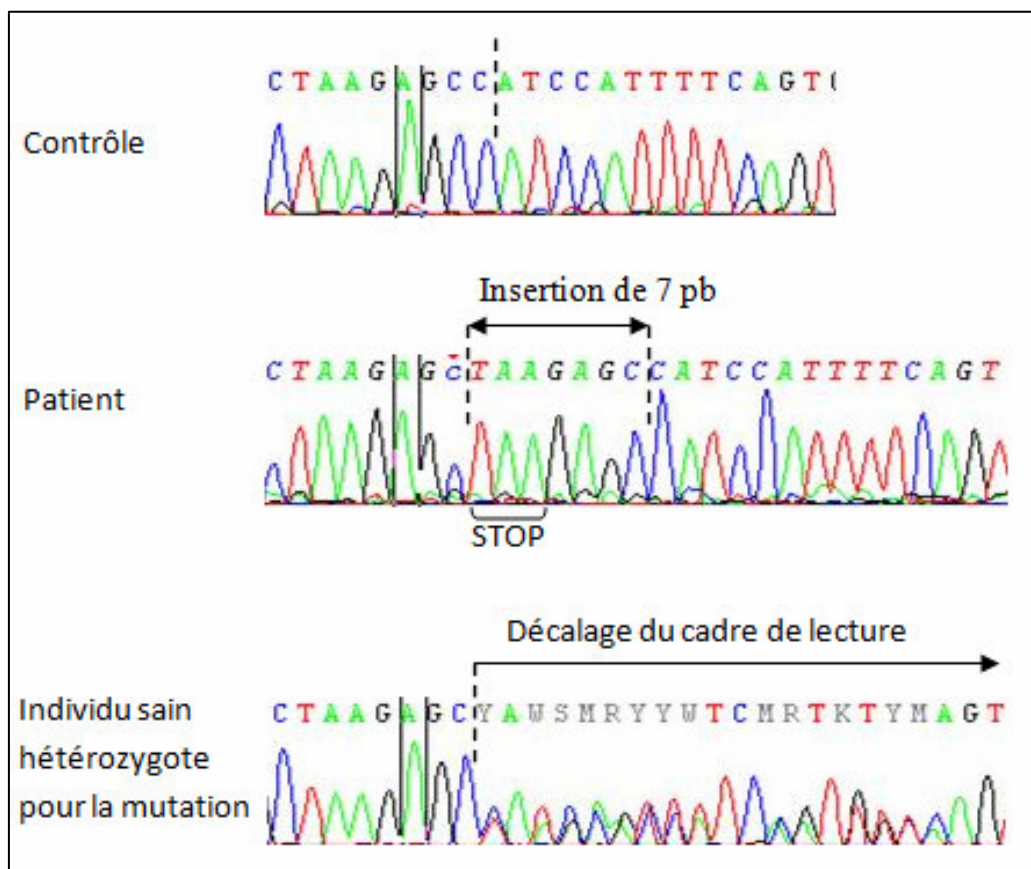


Figure 33 : Résultats de la réaction PCR longue de l'ADN génomique couvrant la délétion de plus de 15Kb qui englobe l'exon 1 du gène ABHD12

La Famille émiratie G21 : 3 atteints (Patients 1,2et 3 : porteurs de la délétion à l'état homozygote) et 3 sains hétérozygotes pour la délétion (une sœur et 2 frères sains) ; 2 contrôles sains (Contrôle 1 et 2) non apparentés.



**Figure 34 : Résultats du séquençage du gène ABHD12
chez les familles Algériennes 139, 142, 96 et 28.**

Tableau 11: Caractéristiques cliniques des patients porteurs de la mutation dans le gène ABHD12

	Famille 1 (ALG139)		Famille 2 (ALG96)		Famille 3 (ALG142)	Famille 4 (ALG28)		Famille 5 (G21)		
Patient	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
Âge du début (ans)	4	5	9	10	20	12	12	6	naissance	naissance
Sexe	M	F	F	M	F	F	F	M	M	F
Origine	Algérie "Constantine"	Algérie "Constantine"	Algérie "Mila"	Algérie "Mila"	Algérie "Sétif"	Algérie "Sétif"	Algérie "Sétif"	Emirat arabes unis	Emirat arabes unis	Emirat arabes unis
durée de la maladie (ans)	11	10	17	34	12	16	9	18	20	6
Ataxie cérébelleuse	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dysarthrie	-	-	+	+	+	+	+	muet	+	+
Atteinte sensitive	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Reflexes osteo-tendineux	abolis aux M.inf	abolis aux M.inf	-	-	-	-	-	-	-	-
Signe de Babinski	+	+	+	+	+	ND	ND	neutre	+	neutre
Fasciculation de la langue	ND	ND	+	macroglossie	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Anomalies oculomotrice / acuité visuelle	nystagmus horizontal	-	glaucome nystagmus horizontal	amblyopie	BAV amblyopie	ND	ND	dystrophie rétinienne nystagmus horizontal et vertical saccades hypométriques	dystrophie rétinienne saccades hypométriques	-
Cataracte	-	-	cataracte droite décollement rétinien	ND	ND	ND	ND	antérieure et postérieure	antérieure et postérieure	postérieure
Anomalie squelettique	dysmétrie des membres > et<	pieds plats dysmétrie M>.sup	pieds creux dysmétrie des membres < et >	ND	pieds creux dysmétrie des membres >	pieds creux	pieds creux	pieds creux	pieds creux	-
Amyotrophie	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	-	distale	distale M<
Surdité	-	-	surdité de perception	surdité de perception	bilatérale	hypoacousie gauche	ND	sensorielle bilatérale	sensorielle	sensorielle
Retard mental	-	-	ND	+	-	ND	ND	-	-	-
IRM/Scanner cérébral	atrophie cérébelleuse	atrophie vermienne	atrophie vermienne	atrophie vermienne	atrophie cérébelleuse	ND	ND	-	atrophie cérébelleuse	atrophie cérébelleuse
EMG	ND	ND	↓VCM, ↓VCS,	neuropathie démyélinisante	neuropathie axonale sensori-motrice	neuropathie démyélinisante sensori-motrice chronique	ND	↓VCN motrices et sensitives	↓VCN motrices et sensitives	ND
Mutation	c.852_853insTAAGAGC p.His258Xfs1X	c.852_853insTAAGAGC p.His258Xfs1X	c.852_853insTAAGAGC p.His258Xfs1X	c.852_853insTAAGAGC p.His258Xfs1X	c.852_853insTAAGAGC p.His258Xfs1X	c.852_853insTAAGAGC p.His258Xfs1X	c.852_853insTAAGAGC p.His258Xfs1X	C. p.Met1_Phe105del	C. p.Met1_Phe105del délétions de l'ADN mitochondrial	C. p.Met1_Phe105del

Discussion et perspectives

Discussion et perspectives

I- Pertinence de la Classification clinico-biologique :

Les ataxies autosomiques récessives représentent un groupe complexe et hétérogène de pathologies congénitales ou neurodégénératives. La première classification fut proposée en 1983 par Harding. Les ataxies bien caractérisées en 1983 étaient peu nombreuses, ce qui a permis une classification clinico-génétique des ataxies héréditaires selon leur mode de transmission et les signes cliniques les caractérisant (Harding, 1983). En 2003 Koenig a proposé une classification (Tableau 1) 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 spino-cérébelleuse 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. En 2008 Lagier-Tourenne a proposé une classification basée sur les mécanismes moléculaires impliqués. Cette classification intéressante sur le plan physiopathologique ne permet cependant pas de classer certaines ataxies telles que ARSACS et ARCA1 dont le mécanisme moléculaire n'est pas encore bien établi. Aucune classification ne fait à ce jour l'objet d'un consensus, probablement en raison de la complexité et de l'hétérogénéité phénotypique et génotypique des ataxies récessives, et de l'intérêt propre de chaque type de classification.

J'ai été amenée durant ce travail de thèse à décortiquer les renseignements cliniques adressés par les praticiens afin d'orienter la recherche de mutation dans des gènes ou loci d'ataxies connues. Devant le grand nombre d'ataxies récessives et le chevauchement clinique entre certaines formes, les neurologues référents se sont aidés des signes d'orientation clinique et/ou biologique pour orienter directement la recherche de mutations vers le séquençage du gène en cause. Cette stratégie reste cependant très imprécise du fait de l'absence de signes pathognomoniques pour une grande partie des ataxies. D'autant plus que chez des patients qui consultent à un âge très jeune, le tableau clinique est encore souvent incomplet.

J'ai donc choisi de présenter dans ce manuscrit les ataxies récessives selon une classification utilisée par les neurologues en pratique clinique. Cette classification ne reflète en aucune façon la complexité, ni l'hétérogénéité phénotypique et génotypique des ataxies.

II- Stratégie de clonage positionnel et diagnostic par cartographie par homozygotie :

Les familles de patients dont les parents sont consanguins permettent de développer de nouvelles stratégies d'analyse des maladies récessives rares, à la fois pour l'identification de nouveaux gènes et pour l'orientation diagnostique dans le cas de syndromes hétérogènes.

A- Limites de la stratégie de clonage positionnel :

En 1995, Francis Collins, donnait son sentiment sur le succès des identifications de gènes par approche fonctionnelle (candidate), positionnelle ou candidat positionnel (Figure 16). Quinze ans après, ses prévisions semblent assez réalistes, avec une importance croissante des découvertes par étude de candidat positionnel dans un intervalle plus ou moins fin, au fur et à mesure que le nombre de gènes connus et cartographiés augmente.

Cependant, il faut être très prudent avant d'entreprendre un travail fonctionnel ciblé sur un gène candidat unique, car cette analyse peut facilement dérouter du vrai gène en cause. La poursuite, en parallèle, des travaux de cartographie fine peut permettre de préciser la position du gène recherché et, éventuellement, de positionner le mauvais candidat à l'extérieur du segment. Ce cas de figure est bien illustré par le gène CDK5RAP1 qui constitue un excellent candidat en tant que protéine mitochondriale, à noyau fer-soufre et exprimée à des taux élevés dans le SNC, en raison de la similitude physiopathologique avec l'ataxie de Friedrich et l'ataxie/anémie sidéroblastique liée à l'X. Pourtant la confirmation d'un effet fondateur ancien dans nos familles Algériennes par l'analyse avec les puces SNP 6.0 a clairement démontré que ce gène se situe en dehors de l'haplotype commun, rendant par là même son étude inutile.

B- Nous avons également utilisé la stratégie de cartographie par homozygotie comme méthode d'aide au diagnostic d'ataxies récessives connues (manuscrit 1) :

Nous avons pu identifier 10 mutations chez 11 familles homozygotes dans une région qui chevauche avec un des 4 gènes d'ataxie connue choisis. Cette stratégie s'est avérée efficace pour le diagnostic de l'ataxie du Charlevoix-Saguenay. Nous avons pu retrouver 6 mutations dans le gène de la sarsine dans les 6 familles homozygotes dans le locus du ARSACS. La présentation clinique chez les patients des 6 familles bien que compatible, n'était pas suffisante pour orienter le diagnostic. La présentation clinique et paraclinique des familles #7, #9 et #11 (AOA1, AOA2, A-T) aurait par contre été à elle seule suffisante pour orienter le séquençage direct du gène en cause sans analyse préalable par puce SNP (Barbot, et al., 2001b; Taylor and Byrd, 2005). Chez les 2 patients de la famille 8, L'âge de début tardif à 16 et 32 ans et l'absence de neuropathie motrice malgré une longue évolution de la maladie, ont clairement justifié l'analyse par puce. Le diagnostic d'AOA1 dans cette famille n'avait pas du tout été suspecté préalablement. L'absence d'élévation du taux d'alpha foeto-protéine (AFP) chez les atteints de la famille #10 chez laquelle aucune mutation n'a été retrouvée dans le gène ATM, nous laisse penser qu'il peut s'agir soit d'une forme atypique de A-T avec AFP normale et mutation en dehors de séquences codantes ou d'un nouveau gène d'ataxie récessive localisé en 11q21-23.

Malgré l'efficacité constatée de notre stratégie pour la recherche de mutations dans les 4 gènes choisis, nous avons constaté que chez la majorité des familles étudiées (87 familles restantes) la mutation en cause n'est localisée dans aucun de ces 4 gènes. Ces mutations sont donc soit dans d'autres gènes d'ataxie plus rares, ou comme le montre ce travail dans des gènes non encore identifiés tels qu'ABHD12. D'autre part, l'efficacité de cette stratégie pourrait être due au choix des 4 gènes responsables d'ataxies « relativement » fréquentes, après l'ataxie de Friedreich et l'AVED, dans les populations concernées (Tazir, et al., 2009). Cette efficacité chute dramatiquement pour l'ataxie SANDO, qui semble être apparemment très rare parmi nos familles.

Il ne faut pas oublier que le seuil d'homozygotie fixé à 20 et 35 SNP, nous a probablement amené à exclure de notre étude de très petites régions homozygotes. Ces régions peuvent être

dues à une consanguinité éloignée comme le montre le patient 4 de la famille 1. D'autre part, les régions petites par le nombre de SNP ne correspondent pas forcément à des régions de petite taille, en effet la couverture en SNP est variable d'une région à une autre. Le cas de la famille 6 illustre cette discordance entre nombre de SNP et taille en Kb, une région de 23 Mb étant couverte par seulement 27 SNP. L'utilisation de puces plus denses en SNP (les puces 250K ou 6.0) nous permettrait d'éviter ces écueils. Il est aussi important de noter que cette stratégie de cartographie par homozygotie sera un piège diagnostique pour les très rares cas où le patient porte deux mutations hétérozygotes composites, malgré l'existence d'une consanguinité chez ses parents. En effet, la consanguinité étant fréquente dans les populations étudiées, elle pourrait coïncider par hasard avec une maladie récessive dans une famille donnée.

III- Les patients avec mutations du gène ABHD12 définissent une nouvelle entité clinique :

L'identification d'une mutation homozygote du gène ABHD12 dans 5 familles non apparentées permet de définir une nouvelle entité clinique de présentation cependant très hétérogène. En effet chez les 4 familles Algériennes pourtant porteuses de la même mutation, l'âge de début de la maladie varie entre 4 et 20 ans. La famille Alg 139 présente une clinique différente des autres familles; sans dysarthrie, ni cataracte, ni surdité. Il faut cependant noter que les patients atteints dans cette famille malgré un âge de début précoce (4 et 5 ans), sont ceux qui présentent la durée d'évolution de la maladie la plus courte ce qui pourrait expliquer un tableau clinique encore incomplet.

La traduction néonatale décrite chez les atteints de la famille G21, nous amène à penser qu'il s'agit d'une nouvelle forme d'ataxie congénitale, d'autant plus que la patiente P10 présentait une diminution des mouvements actifs fœtaux. Le tableau clinique chez cette famille est le plus sévère, les 3 atteints présentent une surdité sensorielle bilatérale, une cataracte et 2 patients parmi 3 ont une dystrophie rétinienne. Le reste du tableau clinique est homogène chez les 5 familles : une ataxie cérébelleuse, des reflexes abolis aux membres inférieurs, une atrophie cérébelleuse et une atteinte sensitive sont notés pratiquement chez tous les patients. L'EMG quand il est fait révèle chez tous les patients une atteinte sensitivo-motrice.

Il est important de noter l'évolution très lentement progressive de la maladie chez les patients d'origine Algérienne, le patient P4 après 34 ans d'évolution de la maladie n'a pas perdu son aptitude à marcher. Le SARA score a été évalué seulement chez les patients émiratis, il est noté du patient le plus âgé au plus jeune à 2/40 ; 27/40 ; 18.5/40.

Tel que mentionné dans le chapitre II-E : « Les Loci d'ataxie récessive », le locus PHARC publié au mois de Janvier 2009 par l'équipe du Professeur Laurence Bindoff localisé sur le chromosome 20 (Fiskerstrand, et al., 2009) chevauche non seulement avec le locus SCAR6 mais aussi avec la zone homozygote retrouvée dans les 5 familles Algériennes et la famille Emiratie. Fiskerstrand et collègues ont rapporté ce locus en le décrivant comme une maladie Refsum like chez une famille Norvégienne différente et non apparentée à celle liée au locus SCAR6 (Tranebjaerg, et al., 2003). La présentation clinique de cette famille est similaire en quelques points à celle de nos familles Algériennes. L'âge de début est très variable entre les 3 atteints (12, 37 et petite enfance), le tableau clinique associe une neuropathie périphérique sensitivo-motrice, une cataracte précoce et une surdité neurosensorielle. Une dégénérescence tapéto-rétinienne est aussi observée chez les 3 atteints, rappelant la maladie de Refsum et l'ataxie avec abétalipoprotéinémie (Singer, et al., 1952). Contrairement à la maladie de Refsum aucune anomalie dermatologique n'est observée. Un taux normal d'acide phytanique chez les 3 atteints a permis d'exclure le diagnostic de maladie de Refsum.

Nous avons contacté le Pr Bindoff, qui a trouvé indépendamment une mutation dans cette famille dans le même gène ABHD12. Un manuscrit en collaboration est en cours de rédaction.

La présence de plusieurs mutations dans ABHD12 chez des familles de différentes origines suggère qu'il s'agit d'une forme d'ataxie récessive plus fréquente qu'on ne le pensait, et qu'il serait intéressant de trouver un marqueur biologique évocateur de ce syndrome afin d'orienter le diagnostic étiologique chez les patients présentant un tableau clinique similaire à celui de nos patients. Nous pouvons suggérer que l'absence d'élévation du taux d'acide phytanique associé à un tableau clinique « Refsum Like » sans atteinte cutanée, est un marqueur d'orientation biologique vers une mutation du gène ABHD12.

IV- PHARC et SCAR6 : deux entités différentes

Il existe un chevauchement phénotypique entre les deux syndromes, PHARC et SCAR6, incluant un début précoce, une évolution peu progressive, une cataracte, une atrophie cérébelleuse et l'absence de dysmorphie faciale. Cependant les différences majeures entre ces deux affections sont la surdité neurosensorielle, la dystrophie rétinienne et l'atteinte périphérique sensitivo-motrice dans le PHARC, et la présence d'une petite taille, une spasticité, une atteinte pyramidale et une hypotonie dans le SCAR6. Ceci suggère que, bien qu'étant localisées dans la même région du chromosome 20, PHARC et SCAR6 sont deux entités cliniques distinctes. La réponse définitive dépendra du résultat du séquençage du gène *ABHD12* dans la famille SCAR6 (Tranebjaerg, et al., 2003).

Concernant les anomalies neurosensorielles, elles sont au premier plan dans le PHARC à type de cataracte, dystrophie rétinienne et surdité. Il serait aussi intéressant de tester la nociception chez ces patients. Il est intéressant de noter que tous nos patients présentent une hypoacousie.

V- La famille Alg 128 : *ABHD12* ou SCAR6

Comme mentionné dans le chapitre résultat, la famille Alg128 composée de 3 atteints est liée uniquement au locus du chromosome 20. L'évidence de la liaison de cette famille ; qui ne portait aucune mutation dans les séquences codantes du gène *ABHD12* au chromosome 20 nous laisse penser qu'il existerait un autre gène d'ataxie récessive que *ABHD12* et que cette famille pourrait effectivement être liée au locus SCAR6 tout comme la famille publiée en 2003 par Tranebjaerg (Tranebjaerg, et al., 2003). La présentation clinique chez cette famille est pourtant similaire à celle des familles mutées dans *ABHD12*. La symptomatologie débute vers l'âge de 3 ans et l'évolution est peu progressive. Les patients présentent en plus de l'ataxie cérébelleuse, la dysarthrie et l'atrophie vermiennes ; une dysphagie, une hypoacousie, une baisse de l'acuité visuelle avec amblyopie. En faveur cependant d'une similitude avec le tableau SCAR6, une petite taille et des pieds plats ont été notés dans cette famille.

L'absence de mutation dans le gène ABHD12 dans la famille Alg128 met en évidence les difficultés de la stratégie de clonage positionnel face à l'hétérogénéité clinique et génétique des maladies étudiées. En effet avant l'identification de la mutation dans ABHD12 et à cause de la présence d'une certaine similitude clinique et de la même origine géographique partagée par les 5 familles Algériennes, nous pensons que la famille Alg128 porterait la même mutation que les 4 autres familles liées au chromosome 20, ce qui nous a fait rechercher la présence d'un très petit haplotype commun entre les 5 familles. A la lumière du résultat des mutations, il apparaît que le petit haplotype commun de 121 SNP identifié avec les puces 6.0 et que l'on pensait fondateur sur 989 Kb est en fait un artéfact dû à la structuration du génome humain en blocs de déséquilibre de liaison. La comparaison des haplotypes avec ceux du projet HapMap permet de tester la significativité des effets fondateurs sur de petit haplotype. Cependant, en cas de mutation ABHD12 dans la famille SCAR6, il faudra alors rechercher une mutation dans la famille Alg128 en dehors des séquences codantes d'ABHD12.

VI-ABHD12/ ABHD5 :

Le spectre clinique des mutations retrouvées dans le gène ABHD12 rappelle en certains points celui des mutations dans le gène ABHD5. Comme je l'ai précisé dans le chapitre IV, ABHD5 est une α/β hydrolase qui ne possède aucune activité catalytique directe à cause de la présence d'une Asparagine (N153) à la place de la Sérine nucléophile (Simon and Cravatt, 2006). Elle est responsable de la stimulation de l'hydrolyse des Triglycérides par l'Adipose triglycéride lipase (ATGL). Une perte de fonction dans ABHD5 a été impliquée dans le syndrome de Chanarin-Dorfman, un trouble autosomique récessif du métabolisme inné des lipides neutres. Cette perte de fonction est responsable d'une accumulation multi-systémique des triglycérides, avec tout de même des concentrations de TG plasmatiques normales (Brown, et al., 2007; Doganci, et al., 2005; Lefevre, et al., 2001; Schweiger, et al., 2009). Le syndrome Chanarin-Dorfman a été décrit pour la première fois en 1974 par Dorfman et al (Dorfman, et al., 1974), une seconde observation de la même symptomatologie fût faite en 1975 par Chanarin et al (Chanarin, et al., 1975).

La symptomatologie est d'installation précoce vers l'âge de 5 ans, elle comprend une ataxie, une cataracte, un nystagmus, une surdité neurosensorielle, une aréflexie, une dégénérescence lipidique du foie avec hyper-proteinorrhachie. La mutation responsable a été

identifiée en 2001 par Lefèvre et al chez 9 familles du bassin méditerranéen. ABHD5 a par ailleurs été retrouvée sous-exprimée dans le cortex moteur chez des patients atteints de pathologies neurodégénératives (Saris, et al., 2009).

VII- Implication des endocannabinoïdes dans la neuro-dégénérescence et la neuro-inflammation :

L'identification de mutations dans le gène ABHD12 dont un substrat potentiel est l'acide 2 arachidonique-glycérol, l'un des deux endocannabinoïdes du système nerveux central, ouvre la voie vers la compréhension du mécanisme physiopathologique dans le PHARC

Pendant longtemps on a pensé que la relation entre neuro-dégénérescence et neuro-inflammation est une relation de cause à effet, aussi bien dans un sens que dans l'autre. Et que par exemple dans la sclérose multiple la perte neuronale était consécutive à la démyélinisation axonale, alors que dans les maladies neurodégénératives la réaction inflammatoire gliale (ou gliose réactive) est la conséquence de la mort neuronale (Centonze, et al., 2007).

Cette relation de cause à effet a été reconsidérée depuis quelques années, en effet il est apparu que les deux phénomènes : neuro-inflammation et neuro-dégénérescence, se produisent en parallèle et qu'ils sont régis par les mêmes mécanismes moléculaires (Aktas, et al., 2005; Allan, et al., 2005; Babcock, et al., 2005; Block and Hong, 2005; Linker, et al., 2005). Depuis l'établissement de cette nouvelle relation, une nouvelle approche thérapeutique associant neuro-protecteurs et anti-inflammatoires a pris toute sa place quelque soit la nature de la lésion primaire. Une telle approche est d'autant plus justifiée qu'une monothérapie anti-inflammatoire ou neuro-protectrice provoque réciproquement une aggravation de la neuro-dégénérescence ou de la neuro-inflammation (Chaudhuri, 2005).

A- Implication de la neuro-inflammation dans la neuro-dégénérescence

L'identification des cellules microgliales et des astrocytes en tant que composants actifs dans la réaction inflammatoire du SNC a permis la compréhension de cette relation (Maragakis and Rothstein, 2006). L'activation de l'astroglie est responsable aussi bien de la protection que de la neurotoxicité durant la neuro-dégénérescence. La microglie a un rôle protecteur contre les infections bactériennes et virales, une sur-activation due à une neuro-dégénérescence excessive est létale pour les neurones sains avoisinants. En effet plusieurs marqueurs de l'inflammation sont retrouvés à des taux élevés dans le liquide cérébro-spinal et dans les tissus nerveux chez des patients atteints de maladie d'Alzheimer, de Parkinson et de SLA (Block and Hong, 2005; Bonifati and Kishore, 2007).

B- Implication de la neuro-dégénérescence dans la neuro-inflammation

Le neurone est connu pour être une cible inhabituelle des maladies inflammatoires (Zipp and Aktas, 2006). En effet, dans les conditions physiologiques un neurone n'exprime pas de molécules CMH. Cependant, le compartiment neuronal du SNC est fréquemment sujet à des attaques durant la réponse inflammatoire contre les cellules gliales, cette réponse anti-inflammatoire auto-immune peut par contre freiner la neuro-dégénérescence, démontrant la complexité de cette relation (Schwartz, 2005).

C- Implication des EC dans la neuro-dégénérescence : une nouvelle voie de signalisation impliquée dans les ataxies récessives.

L'implication des deux principaux endocannabinoïdes (AEA et 2AG) dans les phénomènes de neuro-dégénérescence et de neuro-inflammation est maintenant bien établie. La découverte en 2006 (Bisogno, et al., 2006) d'inhibiteurs de la diacyl-glycérol lipase suggère qu'il est possible de disséquer la voie du 2AG et de l'AEA dans les pathologies neurologiques. De plus l'identification d'inhibiteurs de la MAGL, s'est avérée d'une grande aide pour instaurer une thérapie adaptée selon l'endocannabinoïde le plus incriminé. En effet le 2AG et AEA ont des profils d'interaction différents vis-à-vis des récepteurs CB1 et CB2. CB1 est plus exprimé dans le SNC, il a une grande affinité pour le 2AG (Pertwee, 2005a;

Pertwee, 2005b; Pertwee, 2005c). CB2 est retrouvé beaucoup plus dans les tissus périphériques il constitue aussi une cible privilégiée du 2AG. AEA apparaît par contre comme un agoniste des récepteurs TRPV1 (Di Marzo, et al., 2006). Des agonistes des récepteurs CB1 au même titre qu'une surexpression du 2AG sont responsables d'un effet anti-nociceptif périphérique et anxiolytique central (Calignano, et al., 1998; Jaggar, et al., 1998a; Jaggar, et al., 1998b; Jaggar, et al., 1998c). Ces constatations suggèrent fortement que des modulateurs du taux du 2AG dans le SNC sont plus adaptés dans le traitement des maladies neurodégénératives que dans les maladies neuro-inflammatoires (Centonze, et al., 2007). Centonze et al. a ainsi proposé un équilibre entre neuro-dégénérescence et neuro-inflammation et entre 2AG et AEA, illustré par la Figure 35.

La mutation ABHD12 retrouvée chez les familles Algériennes étudiées dans ce travail est à l'origine d'un codon STOP prématuré, qui comme le montre la figure 36, interrompt la triade catalytique 45 acides aminés avant l'acide aspartique. Cette mutation est donc probablement à l'origine d'une perte de la fonction d'hydrolyse du 2AG dans le SNC. Une première hypothèse postule que l'accumulation du 2AG va occasionner une sur-activation des récepteurs CB1 au niveau central et faire pencher la balance vers la neuro-dégénérescence. Une seconde hypothèse non contradictoire avec la première; suppose que le 2AG non hydrolysé par ABHD12, va être acheminé vers la voie d'oxydation par COX2. La Figure 11 illustre qu'une inactivation d'ABHD12, va dévier le 2AG vers la voie d'oxydation par la COX2, et provoquer ainsi une surproduction du PGE. La présence de PGE en quantités neurotoxiques est à l'origine du maintien de l'inflammation du SNC et de la neuro-dégénérescence (Centonze, et al., 2007; Maccarrone, et al., 2007; Yang and Chen, 2008; Yang, et al., 2008).

Le rôle du 2AG dans le système olfactif et au niveau de la rétine a été suggéré dans des modèles murins. Ce rôle est illustré par la présence de récepteurs CB1 au niveau des noyaux olfactifs antérieurs et du bulbe olfactif (Elphick and Egertova, 2001). La présence des récepteurs CB2 au niveau des cellules ganglionnaires de la rétine, indiquerait un rôle neuro-protecteur du 2AG contre le glaucome (Lu, et al., 2000). Ceci expliquerait la présence d'une atteinte rétinienne associée à l'ataxie chez nos patients. Elphick MR 2001 a démontré par ailleurs l'implication des endocannabinoïdes via les récepteurs CB1 au niveau des ganglions

de la base dans le contrôle du mouvement (Elphick and Egertova, 2001). Szabo et al a montré en 1998 que les cannabinoïdes sont à la fois excitateurs et inhibiteurs du mouvement, ces deux actions sont exercées via deux voies de signalisations distinctes (Szabo, et al., 2002). Parallèlement l'endocannabinoïde peut activer des récepteurs situés sur les corps cellulaires des neurones dopaminergiques ou sur les terminaisons de leurs afférences glutamatergiques (Mezey, et al., 2000; Szabo, et al., 2002). Dans le premier cas, l'activation de ces récepteurs réduit l'activité des neurones dopaminergiques, d'où une diminution de l'activité motrice. Dans le second cas, via les mêmes récepteurs elle augmente la libération du glutamate par les terminaisons des afférences du NST, d'où une augmentation de l'activité motrice (Li, et al., 2009; Martinello, et al., 1998).

Enfin, devant toutes ces constatations il serait très intéressant de doser chez nos patients mutés pour ABHD12, le taux du 2AG et de reproduire la perte de fonction d'ABHD12 dans un modèle cellulaire (neurones) ou murins. Reproduire de tels effets in vivo ou in vitro serait d'autant plus intéressant qu'il devient maintenant facile grâce aux antagonistes de CB1 et CB2 et aux inhibiteurs d'ABHD12 de mimer une mutagénèse dirigée. Un sauvetage du modèle ABHD12 cellulaire ou murin par inhibition spécifique des récepteurs CB1 ou CB2, ou des deux, grâce aux antagonistes spécifiques ferait la preuve de l'implication directe des endocannabinoïdes dans l'ataxie récessive liée au gène ABHD12. Une fois les mutations identifiées, plusieurs approches peuvent donc être poursuivies pour tester le statut d'ABHD12 : étude de l'expression du gène pour déterminer les tissus dans lesquels il s'exprime, étude de la fonction par inactivation de gène (knock-out) in vivo ou in vitro.

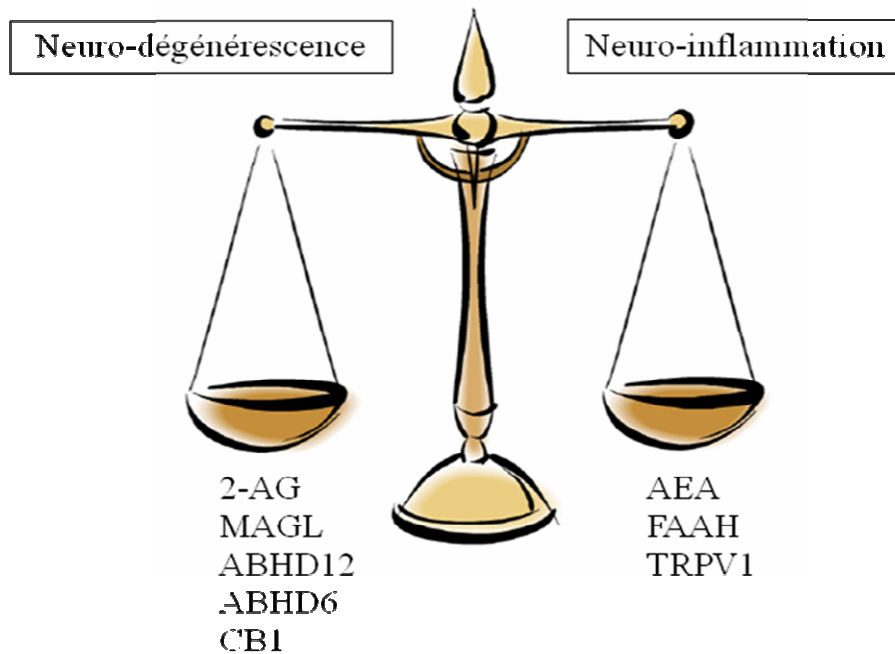


Figure 35 : Equilibre entre neuro-dégénérescence et neuro-inflammation

(D'après Centonze, et al., 2007)

```

MRKRTEPVALEHERCAAAGSSSSGSAAAALDADCRLKONLRLTGPAAAEPRCAADAGMKR
ALGRRKGVWLRRLRKILFCVLGLYIAIPFLIKLCPGIQAKLIFLNFVRVPYFIDLKQPQDQ
GLNHTCNYYLQPEEDVTIGVWHTVPAVWWKNAQGKQDMWYEDALASSHP I ILYLHGNAGT
RGGDHRVELYKVLSSLG YHVVFDFYRGWGDSVGTPSERGMTYDALHVFDWIKARSGDNPV
YIWGHSLGTGVATNLVRRLCERETPPDALILESPFTNIREEAKSHPF SVIYRYFPGFDWF
FLDPITSSGIKFANDENVKHISCP LLILHAE DDPVVPFQLGRKLYSIAAPARSFRDFKVO
FVPFHSDLGYRHKYIYKSPELPRILRPQQPGSSPDP SMWSELV

```

Figure 36: Prédiction des domaines d'ABHD12 :

Domaines transmembranaire d'ABHD12 soulignés en rouge, le corps alpha/beta hydrolase souligné en vert, la triade catalytique S(246)-D(332)-H(366) colorée en jaune

Références bibliographiques

Références

- Aktas O, Smorodchenko A, Brocke S, Infante-Duarte C, Schulze Topphoff U, Vogt J, Prozorovski T, Meier S, Osmanova V, Pohl E and others. 2005. Neuronal damage in autoimmune neuroinflammation mediated by the death ligand TRAIL. *Neuron* 46(3):421-32.
- Allan SM, Tyrrell PJ, Rothwell NJ. 2005. Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol* 5(8):629-40.
- Amouri R, Moreira MC, Zouari M, El Euch G, Barhoumi C, Kefi M, Belal S, Koenig M, Hentati F. 2004. Aprataxin gene mutations in Tunisian families. *Neurology* 63(5):928-9.
- Anheim M, Fleury M, Monga B, Laugel V, Chaigne D, Rodier G, Ginglinger E, Boulay C, Courtois S, Drouot N and others. 2009. Epidemiological, clinical, paraclinical and molecular study of a cohort of 102 patients affected with autosomal recessive progressive cerebellar ataxia from Alsace, Eastern France: implications for clinical management. *Neurogenetics*.
- Asaka T, Yokoji H, Ito J, Yamaguchi K, Matsushima A. 2006. Autosomal recessive ataxia with peripheral neuropathy and elevated AFP: novel mutations in SETX. *Neurology* 66(10):1580-1.
- Ashton JC. 2007. Cannabinoids for the treatment of inflammation. *Curr Opin Investig Drugs* 8(5):373-84.
- Ashton JC, Glass M. 2007. The Cannabinoid CB2 Receptor as a Target for Inflammation-Dependent Neurodegeneration. *Curr Neuropharmacol* 5(2):73-80.
- Azizi E, Zaidman JL, Eshchar J, Szeinberg A. 1978. Abetalipoproteinemia treated with parenteral and oral vitamins A and E, and with medium chain triglycerides. *Acta Paediatr Scand* 67(6):796-801.
- Babcock AM, Standing D, Bullshields K, Schwartz E, Paden CM, Poulsen DJ. 2005. In vivo inhibition of hippocampal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II by RNA interference. *Mol Ther* 11(6):899-905.
- Barbot C, Coutinho P, Choroa R, Ferreira C, Barros J, Fineza I, Dias K, Monteiro J, Guimaraes A, Mendonca P and others. 2001a. Recessive ataxia with ocular apraxia: review of 22 Portuguese patients. *Arch Neurol* 58(2):201-5.
- Barbot J, Costa E, Guerra M, Barreirinho MS, Isvarlal P, Robles R, Gerritsen HE, Lammler B, Furlan M. 2001b. Ten years of prophylactic treatment with fresh-frozen plasma in a child with chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura as a result of a congenital deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease. *Br J Haematol* 113(3):649-51.
- Bassen FA, Kornzweig AL. 1950. Malformation of the erythrocytes in a case of atypical retinitis pigmentosa. *Blood* 5(4):381-87.
- Ben Hamida C, Doerflinger N, Belal S, Linder C, Reutenauer L, Dib C, Gyapay G, Vignal A, Le Paslier D, Cohen D and others. 1993a. Localization of Friedreich ataxia phenotype with selective vitamin E deficiency to chromosome 8q by homozygosity mapping. *Nat Genet* 5(2):195-200.
- Ben Hamida M, Belal S, Sirugo G, Ben Hamida C, Panayides K, Ionannou P, Beckmann J, Mandel JL, Hentati F, Koenig M and others. 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(11):2179-83.
- Benayoun L, Granot E, Rizel L, Allon-Shalev S, Behar DM, 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(4):453-7.
- Benomar A, Yahyaoui M, Meggouh F, Bouhouche A, Boutchich M, Bouslam N, Zaim A, Schmitt M, Belaidi H, Ouazzani R and others. 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(1-2):25-9.
- Berginer VM, Berginer J, Salen G, Shefer S, Zimmerman RD. 1981. Computed tomography in cerebrotendinous xanthomatosis. *Neurology* 31(11):1463-5.

- Bisogno T, Cascio MG, Saha B, Mahadevan A, Urbani P, Minassi A, Appendino G, Saturnino C, Martin B, Razdan R and others. 2006. Development of the first potent and specific inhibitors of endocannabinoid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1761(2):205-12.
- Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF. 2007. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biol* 14(12):1347-56.
- Block ML, Hong JS. 2005. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol* 76(2):77-98.
- Bonifati DM, Kishore U. 2007. Role of complement in neurodegeneration and neuroinflammation. *Mol Immunol* 44(5):999-1010.
- Bouchard JP, Barbeau A, Bouchard R, Bouchard RW. 1978. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Can J Neurol Sci* 5(1):61-9.
- Bouchard JP, Richter A, Mathieu J, Brunet D, Hudson TJ, Morgan K, Melancon SB. 1998. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Neuromuscul Disord* 8(7):474-9.
- Bouhlal Y, El-Euch-Fayeche G, Amouri R, Hentati F. 2005. Distinct phenotypes within autosomal recessive ataxias not linked to already known loci. *Acta Myol* 24(2):155-61.
- Braverman N, Chen L, Lin P, Obie C, Steel G, Douglas P, Chakraborty PK, Clarke JT, Boneh A, Moser A and others. 2002. Mutation analysis of PEX7 in 60 probands with rhizomelic chondrodysplasia punctata and functional correlations of genotype with phenotype. *Hum Mutat* 20(4):284-97.
- Brown JM, Chung S, Das A, Shelness GS, Rudel LL, Yu L. 2007. CGI-58 facilitates the mobilization of cytoplasmic triglyceride for lipoprotein secretion in hepatoma cells. *J Lipid Res* 48(10):2295-305.
- Burck U, Goebel HH, Kuhlendahl HD, Meier C, Goebel KM. 1981. Neuromyopathy and vitamin E deficiency in man. *Neuropediatrics* 12(3):267-78.
- Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D. 1998. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* 394(6690):277-81.
- Campuzano V, Montermini L, Molto MD, Pianese L, Cossee M, Cavalcanti F, Monros E, Rodius F, Duclos F, Monticelli A and others. 1996. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 271(5254):1423-7.
- Cavalier L, Ouahchi K, Kayden HJ, Di Donato S, Reutenauer L, Mandel JL, 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(2):301-10.
- Centonze D, Finazzi-Agro A, Bernardi G, Maccarrone M. 2007. The endocannabinoid system in targeting inflammatory neurodegenerative diseases. *Trends Pharmacol Sci* 28(4):180-7.
- Chanarin I, Patel A, Slavin G, Wills EJ, Andrews TM, Stewart G. 1975. Neutral-lipid storage disease: a new disorder of lipid metabolism. *Br Med J* 1(5957):553-5.
- Chaudhuri A. 2005. Interferon beta, progressive MS, and brain atrophy. *Lancet Neurol* 4(4):208-9.
- Chen OS, Hemenway S, 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(19):12321-6.
- Collins FS. 1992. Positional cloning: let's not call it reverse anymore. *Nat Genet* 1(1):3-6.
- Collins FS. 1995. Positional cloning moves from perdditional to traditional. *Nat Genet* 9(4):347-50.
- Copenhaver GP, Browne WE, Preuss D. 1998. Assaying genome-wide recombination and centromere functions with Arabidopsis tetrads. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(1):247-52.
- Cossee M, Campuzano V, Koutnikova H, Fischbeck K, Mandel JL, Koenig M, Bidichandani SI, Patel PI, Molte MD, Canizares J and others. 1997. Frataxin fracas. *Nat Genet* 15(4):337-8.
- Cossee M, Durr A, Schmitt M, Dahl N, Trouillas P, Allinson P, Kostrzewa M, Nivelon-Chevallier A, Gustavson KH, Kohlschutter A and others. 1999. Friedreich's ataxia: point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes. *Ann Neurol* 45(2):200-6.

- Cottrell S, Jung K, Kristiansen G, Eltze E, Semjonow A, Ittmann M, Hartmann A, Stamey T, Haefliger C, Weiss G. 2007. Discovery and validation of 3 novel DNA methylation markers of prostate cancer prognosis. *J Urol* 177(5):1753-8.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. 1996. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384(6604):83-7.
- Criscuolo C, Banfi S, Orio M, Gasparini P, Monticelli A, Scarano V, Santorelli FM, Perretti A, Santoro L, De Michele G and others. 2004. A novel mutation in SACS gene in a family from southern Italy. *Neurology* 62(1):100-2.
- Criscuolo C, Mancini P, Menchise V, Sacca F, De Michele G, Banfi S, Filla A. 2005. Very late onset in ataxia oculomotor apraxia type I. *Ann Neurol* 57(5):777.
- Cummins I, Landrum M, Steel PG, Edwards R. 2007. Structure activity studies with xenobiotic substrates using carboxylesterases isolated from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 68(6):811-8.
- Date H, Onodera O, Tanaka H, Iwabuchi K, Uekawa K, Igarashi S, Koike R, Hiroi T, Yuasa T, Awaya Y and others. 2001. Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene. *Nat Genet* 29(2):184-8.
- de Fonseca FR, Schneider M. 2008. The endogenous cannabinoid system and drug addiction: 20 years after the discovery of the CB1 receptor. *Addict Biol* 13(2):143-6.
- De Michele G, Coppola G, Coccozza S, Filla A. 2004. A pathogenetic classification of hereditary ataxias: is the time ripe? *J Neurol* 251(8):913-22.
- Delia D, Piane M, Buscemi G, Savio C, Palmeri S, Lulli P, Carlessi L, Fontanella E, Chessa L. 2004. MRE11 mutations and impaired ATM-dependent responses in an Italian family with ataxia-telangiectasia-like disorder. *Hum Mol Genet* 13(18):2155-63.
- Di Marzo M, Casapullo A, Bifulco G, Cimino P, Ligresti A, Di Marzo V, Riccio R, Gomez-Paloma L. 2006. Synthesis, conformational analysis and CB1 binding affinity of hairpin-like anandamide pseudopeptide mimetics. *J Pept Sci* 12(9):575-91.
- Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E and others. 1996. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 380(6570):152-4.
- Dinh TP, Freund TF, Piomelli D. 2002. A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chem Phys Lipids* 121(1-2):149-58.
- Dobrowolski SF, Gray J, Miller T, Sears M. 2009. Identifying sequence variants in the human mitochondrial genome using high-resolution melt (HRM) profiling. *Hum Mutat* 30(6):891-8.
- Doganci T, Gurakar F, Karaduman A, Orhan D, Caglar M. 2005. Images of interest. Hepatobiliary and pancreatic: Dorfman-Chanarin syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 20(1):156.
- Dorfman ML, Hershko C, Eisenberg S, Sagher F. 1974. Ichthyosiform dermatosis with systemic lipidosis. *Arch Dermatol* 110(2):261-6.
- Dupre N, Bouchard JP, Gros-Louis F, Rouleau GA. 2007. [Mutations in SYNE-1 lead to a newly discovered form of autosomal recessive cerebellar ataxia]. *Med Sci (Paris)* 23(3):261-2.
- Duquette A, Roddier K, McNabb-Baltar J, Gosselin I, St-Denis A, Dicaire MJ, Loisel L, Labuda D, Marchand L, Mathieu J and others. 2005. Mutations in senataxin responsible for Quebec cluster of ataxia with neuropathy. *Ann Neurol* 57(3):408-14.
- Durr A, Cossee M, Agid Y, Campuzano V, Mignard C, Penet C, Mandel JL, Brice A, Koenig M. 1996. Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. *N Engl J Med* 335(16):1169-75.
- Edgar AJ. 2003. The gene structure and expression of human ABHD1: overlapping polyadenylation signal sequence with Sec12. *BMC Genomics* 4(1):18.
- Ejima Y, Sasaki MS. 1998. Mutations of the ATM gene detected in Japanese ataxia-telangiectasia patients: possible preponderance of the two founder mutations 4612del165 and 7883del5. *Hum Genet* 102(4):403-8.

- El Euch-Fayache G, Lalani I, Amouri R, Turki I, Ouahchi K, Hung WY, Belal S, Siddique T, Hentati F. 2003. Phenotypic features and genetic findings in saccin-related autosomal recessive ataxia in Tunisia. *Arch Neurol* 60(7):982-8.
- Elphick MR, Egertova M. 2001. The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356(1407):381-408.
- Enayetallah AE, French RA, Barber M, Grant DF. 2006. Cell-specific subcellular localization of soluble epoxide hydrolase in human tissues. *J Histochem Cytochem* 54(3):329-35.
- Engert JC, Berube P, Mercier J, Dore C, Lepage P, Ge B, Bouchard JP, Mathieu J, Melancon SB, Schalling M and others. 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(2):120-5.
- Fadic R, Russell JA, Vedanarayanan VV, Lehar M, Kuncl RW, Johns DR. 1997. Sensory ataxic neuropathy as the presenting feature of a novel mitochondrial disease. *Neurology* 49(1):239-45.
- Fernandez-Espejo E, Caraballo I, de Fonseca FR, El Banoua F, Ferrer B, Flores JA, Galan-Rodriguez B. 2005. Cannabinoid CB1 antagonists possess antiparkinsonian efficacy only in rats with very severe nigral lesion in experimental parkinsonism. *Neurobiol Dis* 18(3):591-601.
- Fernet M, Gribaa M, Salih MA, Seidahmed MZ, Hall J, 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(2):307-18.
- Filla A, De Michele G, Cavalcanti F, Pianese L, Monticelli A, Campanella G, Cocozza S. 1996. The relationship between trinucleotide (GAA) repeat length and clinical features in Friedreich ataxia. *Am J Hum Genet* 59(3):554-60.
- Fiskerstrand T, Knappskog P, Majewski J, Wanders RJ, Boman H, Bindoff LA. 2009. A novel Refsum-like disorder that maps to chromosome 20. *Neurology* 72(1):20-7.
- Fogel BL, Perlman S. 2007. Clinical features and molecular genetics of autosomal recessive cerebellar ataxias. *Lancet Neurol* 6(3):245-57.
- Fukuhara N, Nakajima T, Sakajiri K, Matsubara N, Fujita M. 1995. Hereditary motor and sensory neuropathy associated with cerebellar atrophy (HMSNCA): a new disease. *J Neurol Sci* 133(1-2):140-51.
- Gabsi S, Gouider-Khouja N, Belal S, Fki M, Kefi M, Turki I, Ben Hamida M, Kayden H, Mebazaa R, Hentati F. 2001. Effect of vitamin E supplementation in patients with ataxia with vitamin E deficiency. *Eur J Neurol* 8(5):477-81.
- Gellera C, Pareyson D, Castellotti B, Mazzucchelli F, Zappacosta B, Pandolfo M, Di Donato S. 1997. Very late onset Friedreich's ataxia without cardiomyopathy is associated with limited GAA expansion in the X25 gene. *Neurology* 49(4):1153-5.
- Gilad S, Bar-Shira A, Harnik R, Shkedy D, Ziv Y, Khosravi R, Brown K, Vanagaite L, Xu G, Frydman M and others. 1996. Ataxia-telangiectasia: founder effect among north African Jews. *Hum Mol Genet* 5(12):2033-7.
- Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM. 1984. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 312(5992):326-30.
- Grieco GS, Malandrini A, Comanducci G, Leuzzi V, Valoppi M, Tessa A, Palmeri S, Benedetti L, Pierallini A, Gambelli S and others. 2004. Novel SACS mutations in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay type. *Neurology* 62(1):103-6.
- 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(1):80-5.
- Guindon J, Hohmann AG. 2008. A physiological role for endocannabinoid-derived products of cyclooxygenase-2-mediated oxidative metabolism. *Br J Pharmacol* 153(7):1341-3.
- Hakonen AH, Heiskanen S, Juvonen V, Lappalainen I, Luoma PT, Rantamaki M, Goethem GV, Lofgren A, Hackman P, Paetau A and others. 2005. Mitochondrial DNA polymerase W748S mutation:

- a common cause of autosomal recessive ataxia with ancient European origin. *Am J Hum Genet* 77(3):430-41.
- Hara K, Onodera O, Endo M, Kondo H, Shiota H, Miki K, Tanimoto N, Kimura T, Nishizawa M. 2005. Sacsin-related autosomal recessive ataxia without prominent retinal myelinated fibers in Japan. *Mov Disord* 20(3):380-2.
- Harding AE. 1983. Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet* 1(8334):1151-5.
- Hermann A, Kaczocha M, Deutsch DG. 2006. 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) membrane transport: history and outlook. *Aaps J* 8(2):E409-12.
- Hohmann AG, Suplita RL, 2nd. 2006. Endocannabinoid mechanisms of pain modulation. *Aaps J* 8(4):E693-708.
- Hoshino J, Aruga J, Ishiguro A, Mikoshiba K. 2003. Dorz1, a novel gene expressed in differentiating cerebellar granule neurons, is down-regulated in Zic1-deficient mouse. *Brain Res Mol Brain Res* 120(1):57-64.
- Ingall TJ, McLeod JG. 1991. Autonomic function in Friedreich's ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 54(2):162-4.
- Isnard R, Kalotka H, Durr A, Cossee M, Schmitt M, Pousset F, Thomas D, Brice A, Koenig M, Komajda M. 1997. Correlation between left ventricular hypertrophy and GAA trinucleotide repeat length in Friedreich's ataxia. *Circulation* 95(9):2247-9.
- Jaggar SI, Habib S, Rice AS. 1998a. The modulatory effects of bradykinin B1 and B2 receptor antagonists upon viscerovisceral hyper-reflexia in a rat model of visceral hyperalgesia. *Pain* 75(2-3):169-76.
- Jaggar SI, Hasnie FS, Sellaturay S, Rice AS. 1998b. The anti-hyperalgesic actions of the cannabinoid anandamide and the putative CB2 receptor agonist palmitoylethanolamide in visceral and somatic inflammatory pain. *Pain* 76(1-2):189-99.
- Jaggar SI, Sellaturay S, Rice AS. 1998c. The endogenous cannabinoid anandamide, but not the CB2 ligand palmitoylethanolamide, prevents the viscerovisceral hyper-reflexia associated with inflammation of the rat urinary bladder. *Neurosci Lett* 253(2):123-6.
- Jansen GA, Hogenhout EM, Ferdinandusse S, Waterham HR, Ofman R, Jakobs C, Skjeldal OH, Wanders RJ. 2000. Human phytanoyl-CoA hydroxylase: resolution of the gene structure and the molecular basis of Refsum's disease. *Hum Mol Genet* 9(8):1195-200.
- Jansen GA, Wanders RJ, Watkins PA, Mihalik SJ. 1997. Phytanoyl-coenzyme A hydroxylase deficiency - the enzyme defect in Refsum's disease. *N Engl J Med* 337(2):133-4.
- Jansen GA, Waterham HR, Wanders RJ. 2004. Molecular basis of Refsum disease: sequence variations in phytanoyl-CoA hydroxylase (PHYH) and the PTS2 receptor (PEX7). *Hum Mutat* 23(3):209-18.
- Jin S, Zhao G, Li Z, Nishimoto Y, Isohama Y, Shen J, Ito T, Takeya M, Araki K, He P and others. 2009. Age-related pulmonary emphysema in mice lacking alpha/beta hydrolase domain containing 2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 380(2):419-24.
- Jonsson KO, Holt S, Fowler CJ. 2006. The endocannabinoid system: current pharmacological research and therapeutic possibilities. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 98(2):124-34.
- Kaguni LS. 2004. DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase. *Annu Rev Biochem* 73:293-320.
- Katyal S, el-Khamisy SF, Russell HR, Li Y, Ju L, Caldecott KW, McKinnon PJ. 2007. TDP1 facilitates chromosomal single-strand break repair in neurons and is neuroprotective in vivo. *Embo J* 26(22):4720-31.
- Kennedy GC, Matsuzaki H, Dong S, Liu WM, Huang J, Liu G, Su X, Cao M, Chen W, Zhang J and others. 2003. Large-scale genotyping of complex DNA. *Nat Biotechnol* 21(10):1233-7.
- Kirkham TC, Tucci SA. 2006. Endocannabinoids in appetite control and the treatment of obesity. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5(3):272-92.

- Koenig M. 2003. Rare forms of autosomal recessive neurodegenerative ataxia. *Semin Pediatr Neurol* 10(3):183-92.
- Koskinen T, Sainio K, Rapola J, Pihko H, Paetau A. 1994. Sensory neuropathy in infantile onset spinocerebellar ataxia (IOSCA). *Muscle Nerve* 17(5):509-15.
- Kvistad PH, Dahl A, Skre H. 1985. Autosomal recessive non-progressive ataxia with an early childhood debut. *Acta Neurol Scand* 71(4):295-302.
- Lagier-Tourenne C, Tazir M, Lopez LC, Quinzii CM, Assoum M, Drouot N, Busso C, Makri S, Ali-Pacha L, Benhassine T and others. 2008. ADCK3, an ancestral kinase, is mutated in a form of recessive ataxia associated with coenzyme Q10 deficiency. *Am J Hum Genet* 82(3):661-72.
- 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(10):770-8.
- Lander ES, Botstein D. 1987. Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science* 236(4808):1567-70.
- Le Ber I, Bouslam N, Rivaud-Pechoux S, Guimaraes J, Benomar A, Chamayou C, Goizet C, Moreira MC, Klur S, Yahyaoui M and others. 2004. Frequency and phenotypic spectrum of ataxia with oculomotor apraxia 2: a clinical and genetic study in 18 patients
Parkinsonism & related disorders. *Ataxias. Brain* 127(Pt 4):759-67.
- Le Ber I, Moreira MC, Rivaud-Pechoux S, Chamayou C, Ochsner F, Kuntzer T, Tardieu M, Said G, Habert MO, Demarquay G and others. 2003. Cerebellar ataxia with oculomotor apraxia type 1: clinical and genetic studies. *Brain* 126(Pt 12):2761-72.
- Lefevre C, Jobard F, Caux F, Bouadjar B, Karaduman A, Heilig R, Lakhdar H, Wollenberg A, Verret JL, Weissenbach J and others. 2001. Mutations in CGI-58, the gene encoding a new protein of the esterase/lipase/thioesterase subfamily, in Chanarin-Dorfman syndrome. *Am J Hum Genet* 69(5):1002-12.
- Li F, Fei X, Xu J, Ji C. 2009. An unannotated alpha/beta hydrolase superfamily member, ABHD6 differentially expressed among cancer cell lines. *Mol Biol Rep* 36(4):691-6.
- Linker RA, Rott E, Hofstetter HH, Hanke T, Toyka KV, Gold R. 2005. EAE in beta-2 microglobulin-deficient mice: axonal damage is not dependent on MHC-I restricted immune responses. *Neurobiol Dis* 19(1-2):218-28.
- Lonnqvist T, Paetau A, Nikali K, von Boguslawski K, Pihko H. 1998. Infantile onset spinocerebellar ataxia with sensory neuropathy (IOSCA): neuropathological features. *J Neurol Sci* 161(1):57-65.
- Lopez-Arlandis JM, Vilchez JJ, Palau F, Sevilla T. 1995. Friedreich's ataxia: an epidemiological study in Valencia, Spain, based on consanguinity analysis. *Neuroepidemiology* 14(1):14-9.
- Lorincz MT, Rainier S, Thomas D, Fink JK. 2005. Cerebrotendinous xanthomatosis: possible higher prevalence than previously recognized. *Arch Neurol* 62(9):1459-63.
- Lu Q, Straiker A, Lu Q, Maguire G. 2000. Expression of CB2 cannabinoid receptor mRNA in adult rat retina. *Vis Neurosci* 17(1):91-5.
- Maccarrone M, Battista N, Centonze D. 2007. The endocannabinoid pathway in Huntington's disease: a comparison with other neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol* 81(5-6):349-79.
- Maier S, Staffler G, Hartmann A, Hock J, Henning K, Grabusic K, Mailhammer R, Hoffmann R, Wilmanns M, Lang R and others. 2006. Cellular target genes of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol* 80(19):9761-71.
- Maragakis NJ, Rothstein JD. 2006. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* 2(12):679-89.
- Martin MH, Bouchard JP, Sylvain M, St-Onge O, Truchon S. 2007. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay: a report of MR imaging in 5 patients. *AJNR Am J Neuroradiol* 28(8):1606-8.

- Martinello F, Fardin P, Ottina M, Ricchieri GL, Koenig M, Cavalier L, Trevisan CP. 1998. Supplemental therapy in isolated vitamin E deficiency improves the peripheral neuropathy and prevents the progression of ataxia. *J Neurol Sci* 156(2):177-9.
- Marzouki N, Benomar A, Yahyaoui M, Birouk N, Elouazzani M, Chkili T, Benlemlih M. 2005. Vitamin E deficiency ataxia with (744 del A) mutation on alpha-TTP gene: genetic and clinical peculiarities in Moroccan patients. *Eur J Med Genet* 48(1):21-8.
- Meiner SE. 2000. Wandering problems need ongoing nursing planning. A case study. *Geriatr Nurs* 21(2):101, 106.
- Mezey E, Toth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A, Blumberg PM, Szallasi A. 2000. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7):3655-60.
- Miyata K, Nakayama M, Mizuta S, Hokimoto S, Sugamura K, Oshima S, Oike Y, Sugiyama S, Ogawa H, Yamamura K. 2008. Elevated mature macrophage expression of human ABHD2 gene in vulnerable plaque. *Biochem Biophys Res Commun* 365(2):207-13.
- Miyata K, Oike Y, Hoshii T, Maekawa H, Ogawa H, Suda T, Araki K, Yamamura K. 2005. Increase of smooth muscle cell migration and of intimal hyperplasia in mice lacking the alpha/beta hydrolase domain containing 2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 329(1):296-304.
- Moghadasian MH. 2004. Cerebrotendinous xanthomatosis: clinical course, genotypes and metabolic backgrounds. *Clin Invest Med* 27(1):42-50.
- Moghadasian MH, Salen G, Frohlich JJ, Scudamore CH. 2002. Cerebrotendinous xanthomatosis: a rare disease with diverse manifestations. *Arch Neurol* 59(4):527-9.
- 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(3):765-72.
- Monros E, Canizares J, Molto MD, Rodius F, Montermini L, Cossee M, Martinez F, Prieto F, de Frutos R, Koenig M and others. 1996. Evidence for a common origin of most Friedreich ataxia chromosomes in the Spanish population. *Eur J Hum Genet* 4(4):191-8.
- Montermini L, Andermann E, Labuda M, Richter A, Pandolfo M, Cavalcanti F, Pianese L, Iodice L, Farina G, Monticelli A and others. 1997. The Friedreich ataxia GAA triplet repeat: premutation and normal alleles. *Hum Mol Genet* 6(8):1261-6.
- Montpetit A, Nelis M, Laflamme P, Magi R, Ke X, Remm M, Cardon L, Hudson TJ, Metspalu A. 2006. An evaluation of the performance of tag SNPs derived from HapMap in a Caucasian population. *PLoS Genet* 2(3):e27.
- Moreira MC, Barbot C, Tachi N, Kozuka N, Mendonca P, Barros J, Coutinho P, Sequeiros J, 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(2):501-8.
- Moreira MC, Barbot C, Tachi N, Kozuka N, Uchida E, Gibson T, Mendonca P, Costa M, Barros J, Yanagisawa T and others. 2001b. The gene mutated in ataxia-ocular apraxia 1 encodes the new HIT/Zn-finger protein aprataxin. *Nat Genet* 29(2):189-93.
- Moreira MC, Klur S, Watanabe M, Nemeth AH, Le Ber I, Moniz JC, Tranchant C, Aubourg P, Tazir M, Schols L and others. 2004. Senataxin, the ortholog of a yeast RNA helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2. *Nat Genet* 36(3):225-7.
- Mrisa N, Belal S, Hamida CB, Amouri R, Turki I, Mrissa R, Hamida MB, Hentati F. 2000. Linkage to chromosome 13q11-12 of an autosomal recessive cerebellar ataxia in a Tunisian family. *Neurology* 54(7):1408-14.
- Muccioli GG, Xu C, Odah E, Cudaback E, Cisneros JA, Lambert DM, Lopez Rodriguez ML, Bajjalieh S, Stella N. 2007. Identification of a novel endocannabinoid-hydrolyzing enzyme expressed by microglial cells. *J Neurosci* 27(11):2883-9.

- Mueller JC, Lohmussaar E, Magi R, Remm M, Bettecken T, Lichtner P, Biskup S, Illig T, Pfeufer A, Luedemann J and others. 2005. Linkage disequilibrium patterns and tagSNP transferability among European populations. *Am J Hum Genet* 76(3):387-98.
- Muller DP, Lloyd JK. 1982. Effect of large oral doses of vitamin E on the neurological sequelae of patients with abetalipoproteinemia. *Ann N Y Acad Sci* 393:133-44.
- Muller DP, Lloyd JK, Bird AC. 1977. Long-term management of abetalipoproteinaemia. Possible role for vitamin E. *Arch Dis Child* 52(3):209-14.
- Narcisi TM, Shoulders CC, Chester SA, Read J, Brett DJ, Harrison GB, Grantham TT, Fox MF, Povey S, de Bruin TW and others. 1995. Mutations of the microsomal triglyceride-transfer-protein gene in abetalipoproteinemia. *Am J Hum Genet* 57(6):1298-310.
- Nardini M, Dijkstra BW. 1999. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr Opin Struct Biol* 9(6):732-7.
- Navarro M, Chowen J, Rocio ACM, del Arco I, Villanua MA, Martin Y, Roberts AJ, Koob GF, de Fonseca FR. 1998. CB1 cannabinoid receptor antagonist-induced opiate withdrawal in morphine-dependent rats. *Neuroreport* 9(15):3397-402.
- Nikali K, Isosomppi J, Lonnqvist T, Mao JI, Suomalainen A, Peltonen L. 1997. Toward cloning of a novel ataxia gene: refined assignment and physical map of the IOSCA locus (SCA8) on 10q24. *Genomics* 39(2):185-91.
- 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(20):2981-90.
- Ogawa T, Takiyama Y, Sakoe K, Mori K, Namekawa M, Shimazaki H, Nakano I, Nishizawa M. 2004. Identification of a SACS gene missense mutation in ARSACS. *Neurology* 62(1):107-9.
- Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken SM, Harel M, Remington SJ, Silman I, Schrag J and others. 1992. The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng* 5(3):197-211.
- Ouahchi K, Arita M, Kayden H, Hentati F, Ben Hamida M, Sokol R, Arai H, Inoue K, Mandel JL, Koenig M. 1995. Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the alpha-tocopherol transfer protein. *Nat Genet* 9(2):141-5.
- Ouyang Y, Segers K, Bouquiaux O, Wang FC, Janin N, Andris C, Shimazaki H, Sakoe K, Nakano I, Takiyama Y. 2008. Novel SACS mutation in a Belgian family with saccin-related ataxia. *J Neurol Sci* 264(1-2):73-6.
- Ouyang Y, Takiyama Y, Sakoe K, Shimazaki H, Ogawa T, Nagano S, Yamamoto Y, Nakano I. 2006. Saccin-related ataxia (ARSACS): expanding the genotype upstream from the gigantic exon. *Neurology* 66(7):1103-4.
- Parfitt DA, Michael GJ, Vermeulen EG, Prodromou NV, Webb TR, Gallo JM, Cheetham ME, Nicoll WS, Blatch GL, Chapple JP. 2009. The ataxia protein saccin is a functional co-chaperone that protects against polyglutamine-expanded ataxin-1. *Hum Mol Genet* 18(9):1556-65.
- Pertwee RG. 2005a. Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci* 76(12):1307-24.
- Pertwee RG. 2005b. Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol*(168):1-51.
- Pertwee RG. 2005c. The therapeutic potential of drugs that target cannabinoid receptors or modulate the tissue levels or actions of endocannabinoids. *Aaps J* 7(3):E625-54.
- Pitts SA, Kullar HS, Stankovic T, Stewart GS, Last JI, Bedenham T, Armstrong SJ, Piane M, Chessa L, Taylor AM and others. 2001. hMRE11: genomic structure and a null mutation identified in a transcript protected from nonsense-mediated mRNA decay. *Hum Mol Genet* 10(11):1155-62.
- Rawal S, Morisseau C, Hammock BD, Shivachar AC. 2009. Differential subcellular distribution and colocalization of the microsomal and soluble epoxide hydrolases in cultured neonatal rat brain cortical astrocytes. *J Neurosci Res* 87(1):218-27.
- Refsum S, Salomonsen L, Skatvedt M. 1949. Heredopathia atactica polyneuritiformis in children. *J Pediatr* 35(3):335-43.

- Richter A, Rioux JD, Bouchard JP, Mercier J, Mathieu J, Ge B, Poirier J, Julien D, Gyapay G, Weissenbach J and others. 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(3):768-75.
- Richter AM, Ozgul RK, Poisson VC, Topaloglu H. 2004. Private SACS mutations in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS) families from Turkey. *Neurogenetics* 5(3):165-70.
- Robson KJ, Chandra T, MacGillivray RT, Woo SL. 1982. Polysome immunoprecipitation of phenylalanine hydroxylase mRNA from rat liver and cloning of its cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(15):4701-5.
- Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, Goff SC, Newburger PE, Baehner RL, Cole FS, Curnutte JT, Orkin SH. 1986. Cloning the gene for the inherited disorder chronic granulomatous disease on the basis of its chromosomal location. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:177-83.
- Rueda D, Navarro B, Martinez-Serrano A, Guzman M, Galve-Roperh I. 2002. The endocannabinoid anandamide inhibits neuronal progenitor cell differentiation through attenuation of the Rap1/B-Raf/ERK pathway. *J Biol Chem* 277(48):46645-50.
- Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL and others. 2001. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 409(6822):928-33.
- Said G, Marion MH, Selva J, Jamet C. 1986. Hypotrophic and dying-back nerve fibers in Friedreich's ataxia. *Neurology* 36(10):1292-9.
- Sang N, Zhang J, Marcheselli V, Bazan NG, Chen C. 2005. Postsynaptically synthesized prostaglandin E2 (PGE2) modulates hippocampal synaptic transmission via a presynaptic PGE2 EP2 receptor. *J Neurosci* 25(43):9858-70.
- Saris CG, Horvath S, van Vught PW, van Es MA, Blauw HM, Fuller TF, Langfelder P, Deyoung J, Wokke JH, Veldink JH and others. 2009. Weighted gene co-expression network analysis of the peripheral blood from Amyotrophic Lateral Sclerosis patients. *BMC Genomics* 10(1):405.
- Savitsky K, Sfez S, Tagle DA, Ziv Y, Sartiell A, Collins FS, Shiloh Y, Rotman G. 1995. The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum Mol Genet* 4(11):2025-32.
- Schlotterer C. 2000a. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109(6):365-71.
- Schlotterer C. 2000b. Microsatellite analysis indicates genetic differentiation of the neo-sex chromosomes in *Drosophila americana americana*. *Heredity* 85(Pt 6):610-6.
- Schwartz M. 2005. T-cell-based vaccination against neurodegeneration: a new therapeutic approach. *Retina* 25(8 Suppl):S33-S35.
- Schweiger M, Lass A, Zimmermann R, Eichmann TO, Zechner R. 2009. Neutral lipid storage disease: genetic disorders caused by mutations in adipose triglyceride lipase/PNPLA2 or CGI-58/ABHD5. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297(2):E289-96.
- Sharp D, Blinderman L, Combs KA, Kienzle B, Ricci B, Wager-Smith K, Gil CM, Turck CW, Bouma ME, Rader DJ and others. 1993. Cloning and gene defects in microsomal triglyceride transfer protein associated with abetalipoproteinaemia. *Nature* 365(6441):65-9.
- Shimazaki H, Takiyama Y, Sakoe K, Ando Y, Nakano I. 2005. A phenotype without spasticity in sacin-related ataxia. *Neurology* 64(12):2129-31.
- Shimazaki H, Takiyama Y, Sakoe K, Ikeguchi K, Niijima K, Kaneko J, Namekawa M, Ogawa T, Date H, Tsuji S and others. 2002. Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia: the aprataxin gene mutations. *Neurology* 59(4):590-5.
- Simon GM, Cravatt BF. 2006. Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway. *J Biol Chem* 281(36):26465-72.

- Singer K, Fisher B, Perlstein MA. 1952. Acanthocytosis; a genetic erythrocytic malformation. *Blood* 7(6):577-91.
- Stankovic T, Kidd AM, Sutcliffe A, McGuire GM, Robinson P, Weber P, Bedenham T, Bradwell AR, Easton DF, Lennox GG and others. 1998. ATM mutations and phenotypes in ataxia-telangiectasia families in the British Isles: expression of mutant ATM and the risk of leukemia, lymphoma, and breast cancer. *Am J Hum Genet* 62(2):334-45.
- Stankovich J, Cox CJ, Tan RB, Montgomery DS, Huxtable SJ, Rubio JP, Ehm MG, Johnson L, Butzkueven H, Kilpatrick TJ and others. 2006. On the utility of data from the International HapMap Project for Australian association studies. *Hum Genet* 119(1-2):220-2.
- Stern N, Hochman A, Zemach N, Weizman N, Hammel I, Shiloh Y, Rotman G, 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(1):602-8.
- Stewart GS, Maser RS, Stankovic T, Bressan DA, Kaplan MI, Jaspers NG, Raams A, Byrd PJ, Petrini JH, Taylor AM. 1999. The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* 99(6):577-87.
- Stoelting M, Geyer M, Reuter S, Reichelt R, Bek MJ, Pavenstadt H. 2009. Alpha/beta hydrolase 1 is upregulated in D5 dopamine receptor knockout mice and reduces O₂⁻ production of NADPH oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 379(1):81-5.
- Stoetzel C, Laurier V, Davis EE, Muller J, Rix S, Badano JL, Leitch CC, Salem N, Chouery E, Corbani S and others. 2006. BBS10 encodes a vertebrate-specific chaperonin-like protein and is a major BBS locus. *Nat Genet* 38(5):521-4.
- Stoetzel C, Muller J, Laurier V, Davis EE, Zaghoul NA, Vicaire S, Jacquelin C, Plewniak F, Leitch CC, Sarda P and others. 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):1-11.
- Szabo T, Biro T, Gonzalez AF, Palkovits M, Blumberg PM. 2002. Pharmacological characterization of vanilloid receptor located in the brain. *Brain Res Mol Brain Res* 98(1-2):51-7.
- Takashima H, Boerkoel CF, John J, Saifi GM, Salih MA, Armstrong D, Mao Y, Quijcho FA, Roa BB, Nakagawa M and others. 2002. Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. *Nat Genet* 32(2):267-72.
- Takiyama Y. 2007. Sacsinopathies: saccin-related ataxia. *Cerebellum*:1-7.
- Tavani F, Zimmerman RA, Berry GT, Sullivan K, Gatti R, Bingham P. 2003. Ataxia-telangiectasia: the pattern of cerebellar atrophy on MRI. *Neuroradiology* 45(5):315-9.
- Taylor AM, Byrd PJ. 2005. Molecular pathology of ataxia telangiectasia. *J Clin Pathol* 58(10):1009-15.
- Tazir M, Ali-Pacha L, M'Zahem A, Delaunoy JP, Fritsch M, Nouioua S, Benhassine T, Assami S, Grid D, Vallat JM and others. 2009. Ataxia with oculomotor apraxia type 2: A clinical and genetic study of 19 patients. *J Neurol Sci* 278(1-2):77-81.
- Telatar M, Teraoka S, Wang Z, Chun HH, Liang T, Castellvi-Bel S, Udar N, Borresen-Dale AL, Chessa L, Bernatowska-Matuszkiewicz E and others. 1998a. Ataxia-telangiectasia: identification and detection of founder-effect mutations in the ATM gene in ethnic populations. *Am J Hum Genet* 62(1):86-97.
- Telatar M, Wang S, Castellvi-Bel S, Tai LQ, Sheikhavandi S, Regueiro JR, Porras O, Gatti RA. 1998b. A model for ATM heterozygote identification in a large population: four founder-effect ATM mutations identify most of Costa Rican patients with ataxia telangiectasia. *Mol Genet Metab* 64(1):36-43.
- Thornberry NA, Weber AE. 2007. Discovery of JANUVIA (Sitagliptin), a selective dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *Curr Top Med Chem* 7(6):557-68.

- Toscano CD, Ueda Y, Tomita YA, Vicini S, Bosetti F. 2008. Altered GABAergic neurotransmission is associated with increased kainate-induced seizure in prostaglandin-endoperoxide synthase-2 deficient mice. *Brain Res Bull* 75(5):598-609.
- Traber MG, Sokol RJ, Burton GW, Ingold KU, Papas AM, Huffaker JE, Kayden HJ. 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(2):397-407.
- Tranchant C, Fleury M, Moreira MC, Koenig M, Warter JM. 2003. Phenotypic variability of aprataxin gene mutations. *Neurology* 60(5):868-70.
- Tranebjaerg L, Teslovich TM, Jones M, Barmada MM, Fagerheim T, Dahl A, Escolar DM, Trent JM, Gillanders EM, Stephan DA. 2003. Genome-wide homozygosity mapping localizes a gene for autosomal recessive non-progressive infantile ataxia to 20q11-q13. *Hum Genet* 113(3):293-5.
- Ursic D, Chinchilla K, Finkel JS, Culbertson MR. 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(8):2441-52.
- Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y. 2003. Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *Embo J* 22(20):5612-21.
- van den Brink DM, Brites P, Haasjes J, Wierzbicki AS, Mitchell J, Lambert-Hamill M, de Belleruche J, Jansen GA, Waterham HR, Wanders RJ. 2003. Identification of PEX7 as the second gene involved in Refsum disease. *Am J Hum Genet* 72(2):471-7.
- Van Goethem G, Martin JJ, Dermaut B, Lofgren A, Wibail A, Ververken D, Tack P, Dehaene I, Van Zandijcke M, Moonen M and others. 2003a. Recessive POLG mutations presenting with sensory and ataxic neuropathy in compound heterozygote patients with progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscul Disord* 13(2):133-42.
- Van Goethem M, Schelfout K, Jacobs W, Verslegers I, Biltjes I, De Raeve H, De Schepper A. 2003b. MR mammography of a primary squamous cell carcinoma of the breast: a case report. *Breast* 12(3):212-4.
- Verrips A, Hoefsloot LH, Steenbergen GC, Theelen JP, Wevers RA, Gabreels FJ, van Engelen BG, van den Heuvel LP. 2000. Clinical and molecular genetic characteristics of patients with cerebrotendinous xanthomatosis. *Brain* 123 (Pt 5):908-19.
- Wang H, Dey SK, Maccarrone M. 2006. Jekyll and hyde: two faces of cannabinoid signaling in male and female fertility. *Endocr Rev* 27(5):427-48.
- Warner JP, Barron LH, Goudie D, Kelly K, Dow D, Fitzpatrick DR, Brock DJ. 1996. A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR. *J Med Genet* 33(12):1022-6.
- Watanabe M, Sugai Y, Concannon P, Koenig M, Schmitt M, Sato M, Shizuka M, Mizushima K, Ikeda Y, Tomidokoro Y and others. 1998. Familial spinocerebellar ataxia with cerebellar atrophy, peripheral neuropathy, and elevated level of serum creatine kinase, gamma-globulin, and alpha-fetoprotein. *Ann Neurol* 44(2):265-9.
- Weinstein R. 1999. Phytanic acid storage disease (Refsum's disease): clinical characteristics, pathophysiology and the role of therapeutic apheresis in its management. *J Clin Apher* 14(4):181-4.
- Weiss G, Cottrell S, Distler J, Schatz P, Kristiansen G, Ittmann M, Haefliger C, Lesche R, Hartmann A, Corman J and others. 2009. DNA methylation of the PITX2 gene promoter region is a strong independent prognostic marker of biochemical recurrence in patients with prostate cancer after radical prostatectomy. *J Urol* 181(4):1678-85.
- Wills AJ, Manning NJ, Reilly MM. 2001. Refsum's disease. *Qjm* 94(8):403-6.
- 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(7):1204-8.

- Witkin JM, Tzavara ET, Nomikos GG. 2005. A role for cannabinoid CB1 receptors in mood and anxiety disorders. *Behav Pharmacol* 16(5-6):315-31.
- Yamamoto Y, Hiraoka K, Araki M, Nagano S, Shimazaki H, Takiyama Y, Sakoda S. 2005. Novel compound heterozygous mutations in sarsin-related ataxia. *J Neurol Sci* 239(1):101-4.
- Yang H, Chen C. 2008. Cyclooxygenase-2 in synaptic signaling. *Curr Pharm Des* 14(14):1443-51.
- Yang H, Zhang J, Andreasson K, Chen C. 2008. COX-2 oxidative metabolism of endocannabinoids augments hippocampal synaptic plasticity. *Mol Cell Neurosci* 37(4):682-95.
- Zeggini E, Rayner W, Morris AP, Hattersley AT, Walker M, Hitman GA, Deloukas P, Cardon LR, McCarthy MI. 2005. An evaluation of HapMap sample size and tagging SNP performance in large-scale empirical and simulated data sets. *Nat Genet* 37(12):1320-2.
- Zipp F, Aktas O. 2006. The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 29(9):518-27.
- Zouari M, Feki M, Ben Hamida C, Larnaout A, Turki I, Belal S, Mebazaa A, Ben Hamida M, 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(6):416-25.
- Zuhlke C, Laccone F, Cossee M, Kohlschutter A, Koenig M, Schwinger E. 1998. Mutation of the start codon in the FRDA1 gene: linkage analysis of three pedigrees with the ATG to ATT transversion points to a unique common ancestor. *Hum Genet* 103(1):102-5.

Résumé

Le diagnostic des pathologies héréditaires rares devient de plus en plus difficile à cause de leur origine multigénique. Cette multigénicité est très bien illustrée par les ataxies autosomiques récessives. A ce jour 14 gènes responsables d'ataxies autosomiques récessives ainsi que plusieurs loci ont été identifiés. Cependant plusieurs gènes restent à découvrir. J'ai dans ce travail adopté une stratégie de clonage positionnel, et plus précisément de cartographie par homozygotie utilisant les puces de génotypage SNP à la recherche de nouveaux gènes impliqués dans les ataxies récessives.

J'ai dans un premier temps procédé à la validation de la stratégie de cartographie par homozygotie en utilisant les puces SNP Affymetrix pour identifier les patients consanguins porteurs de mutation dans l'un des gènes d'ataxie récemment identifié. Pour cela, j'ai analysé 97 familles consanguines. J'ai choisi de m'intéresser aux 4 gènes codant pour l'aprataxine (AOA1), la senataxine (AOA2), la sachsine (ARSACS) et la protéine ATM (AT), pour lesquels le séquençage exhaustif était disponible. Parmi les 97 familles analysées par puce, 11 familles présentaient des régions homozygotes partagées par les atteints d'une même famille et chevauchantes avec un des 4 gènes étudiés. Notre stratégie s'est révélée efficace, en effet une mutation a été retrouvée par séquençage du gène inclu dans la région homozygote partagée par les atteints d'une même famille dans 10 familles parmi les 11.

Dans un deuxième temps, cette stratégie m'a permis d'identifier un nouveau gène impliqué dans une nouvelle forme d'ataxie autosomique récessive non progressive. En effet, parmi les familles consanguines chez lesquelles aucun diagnostic moléculaire n'a été porté, j'ai identifié plusieurs familles Algériennes dont les atteints sont homozygotes dans une région péricentromérique du chromosome 20. L'analyse détaillée des haplotypes avec des puces SNP à très haute densité m'a permis d'identifier un petit haplotype fondateur partagé par 4 familles originaires de la région de Sétif dans le nord-est Algérien. Ces 4 familles nous ont permis de définir une nouvelle forme d'ataxie qui s'est avérée correspondre à l'entité PHARC (pour Polyneuropathy, Hearing loss, Ataxia, Retinitis pigmentosa and Cataract) publiée en janvier 2009. Nous avons par la suite identifié une grande famille des Emirats Arabes Unis liée au même interval. Le séquençage des gènes de la région critique a révélé deux mutations tronquantes dans le gène *ABHD12* qui code pour une α/β hydrolase. *ABHD12* est impliqué dans l'hydrolyse de l'acide 2-arachidonique-glycérol, un endocannabinoïde du SNC. L'identification de 2 mutations dans *ABHD12* ouvre la voie vers la compréhension du mécanisme physiopathologique dans le PHARC.

Mots clefs : ataxies autosomiques récessives, clonage positionnel, cartographie par homozygotie, puces de génotypage SNP, gène *ABHD12*, 2AG.