



HAL
open science

Identification de nouveaux gènes d'ataxies cérébelleuses récessives et intérêt du séquençage haut débit dans le diagnostic des ataxies d'origine génétique

Martial Mallaret

► To cite this version:

Martial Mallaret. Identification de nouveaux gènes d'ataxies cérébelleuses récessives et intérêt du séquençage haut débit dans le diagnostic des ataxies d'origine génétique. Génétique humaine. Université de Strasbourg, 2015. Français. NNT : 2015STRAJ090 . tel-01372518

HAL Id: tel-01372518

<https://theses.hal.science/tel-01372518>

Submitted on 27 Sep 2016

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

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

ÉCOLE DOCTORALE DE STRASBOURG

IGBMC, UMR7104 CNRS Uds – U964 INSERM

THÈSE présentée par

Martial MALLARET

soutenue le : 23 septembre 2015

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

Discipline/ Spécialité : Sciences Médicales / Recherche Clinique

et Innovations Technologiques

**Identification de nouveaux gènes d'ataxies cérébelleuses récessives
et intérêt du séquençage haut débit dans le diagnostic des ataxies
d'origine génétique**

THÈSE dirigée par :

Monsieur KOENIG Michel

Professeur des Universités, université de Montpellier

RAPPORTEURS :

Monsieur GOIZET Cyrille

Professeur des Universités, université de Bordeaux

Monsieur JONVEAUX Philippe

Professeur des Universités, université de Nancy

Monsieur LAPORTE Jocelyn

Directeur de recherche, IGBMC

MEMBRES INVITES :

Madame TRANCHANT Christine

Professeur des Universités, université de Strasbourg

Monsieur ANHEIM Mathieu

Professeur des Universités, université de Strasbourg

A ma famille...

Remerciements

Je remercie les Professeurs Christine Tranchant, Mathieu Anheim, Cyril Goizet, Philippe Jonveaux et Monsieur Jocelyn Laporte qui m'ont fait l'honneur d'être membres du jury.

J'exprime toute ma reconnaissance à Michel Koenig qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a encadré avec bienveillance pendant mes travaux de thèse. Il m'a transmis son intérêt pour la génétique et son esprit critique.

Je remercie Christine Tranchant qui m'a judicieusement aiguillé vers l'IGBMC et m'a donnée les conditions nécessaires pour la réalisation des travaux de thèse durant mon internat et mon clinicat. Je remercie tout particulièrement Christine Tranchant et Mathieu Anheim pour leur formation patiente sur les pathologies neurologiques et en particulier les ataxies cérébelleuses.

Je remercie Nathalie Drouot de m'avoir initié aux techniques de séquençage, du Western Blot, de culture cellulaire et à l'analyse bio-informatique depuis mon arrivée dans le laboratoire. Je la remercie également pour son aide dans l'analyse des nombreuses données de séquençage haut débit.

Je remercie Mathilde Renaud pour sa participation importante dans l'analyse des données de séquençage haut débit.

Je remercie les membres de l'équipe d'Hélène Puccio et notamment Alain Martelli, pour leurs conseils techniques.

Je remercie mon épouse Julie pour sa patience et son soutien.

Table des matières

Remerciements.....	3
Table des matières.....	4
Liste des tableaux.....	11
Liste des figures.....	12
Liste des annexes.....	13
Liste des abréviations.....	14
1. Introduction.....	17
1.1. Définition de l'ataxie.....	18
1.2. Séméiologie des atteintes du cervelet	18
1.3. Etiologies des atteintes du cervelet.....	20
1.3.1. Les causes acquises.....	20
1.3.2. Les causes génétiques.....	20
1.4. Classification des ataxies cérébelleuses héréditaires.....	21
1.4.1. Classification des ataxies cérébelleuses autosomiques récessives.....	22
1.4.2. Difficultés diagnostiques dans les ataxies cérébelleuses.....	24
1.5. Algorithmes diagnostiques dans les pathologies cérébelleuses héréditaires.....	27

1.6. Intérêt du séquençage nouvelle génération dans la génétique des ataxies cérébelleuses.....	31
1.6.1. Méthodologie du séquençage haut débit.....	32
1.6.1.1. Généralités.....	32
1.6.1.2. Préparation des échantillons.....	34
1.6.1.3. Sonication de l'ADN.....	34
1.6.1.4. Préparation des bibliothèques.....	34
1.6.1.5. Multiplexage pour grouper les échantillons.....	34
1.6.1.6. Hybridation.....	35
1.6.1.7. Séquençage à l'aide de terminateurs réversibles (Illumina).....	36
1.6.1.8. Analyse des données.....	38
1.6.1.9. Technologies d'avenir (Buermans et al., 2014).....	38
1.6.2. Identification de nouveaux gènes d'ataxies cérébelleuses autosomiques récessives	39
1.6.3. Identification de nouveaux gènes d'ataxie cérébelleuses autosomiques dominantes.....	40
1.6.4. Apport du séquençage haut débit au diagnostic "au lit du malade".....	41
1.6.5. Validation d'une mutation en séquençage haut débit.....	41
1.7. Stratégies de séquençage haut débit.....	42
1.7.1. Capture ciblée d'un panel de gènes.....	42
1.7.2.L'exome.....	42

1.7.3. Le génome entier.....	43
1.8. Interprétation des résultats.....	44
1.8.1. Les mutations insertions-délétions (ou "ins/del") touchant la séquence codante.....	44
1.8.2. Les mutations d'épissage.....	44
1.8.3. Les mutations non sens stop-del et touchant le codon initiateur.....	45
1.8.4. Les mutations faux sens.....	46
1.8.4.1. La conservation inter espèces.....	46
1.8.4.2. Le changement d'acide aminé.....	47
1.8.4.3. Etude de populations témoins.....	47
1.8.5. Mutations du promoteur ou de sites régulateurs de la transcription.....	48
1.8.6. Mutations dans des gènes redondants et dans des pseudogènes.....	49
1.8.7. Recherche de polymorphismes rares privés.....	49
1.8.8. Etude de ségrégations des variants.....	50
1.8.9. Synthèse après exclusion des variants présumés non pathogènes.....	50
2. Résultats.....	52
2.1. Identification d'un nouveau gène d'ataxie cérébelleuse avec retard mental et épilepsie.....	54

2.1.1. Manuscrit 1: The tumor suppressor <i>WWOX</i> is mutated in autosomal recessive cerebellar ataxia with epilepsy and mental retardation.....	55
2.1.2. Fonctions du gène <i>WWOX</i>	82
2.1.3. Mutations dans le gène <i>WWOX</i>	83
2.2. Identification de nouvelles mutations dans le gène <i>FA2H</i> responsable d'ataxie spastique.	85
2.2.1 Manuscrit 2: Cerebral iron accumulation is not a major feature of <i>FA2H/SPG35</i>	86
2.2.2. Fonctions du gène <i>FA2H</i>	102
2.2.3. Identification de nouvelles mutations dans <i>FA2H</i>	103
2.2.4. Corrélations génotype-phénotype dans les mutations récessives de <i>FA2H</i>	104
2.2.5. Atteintes cérébelleuses dans la FAHN (Fatty acid hydroxylase associated neurodegeneration).	105
2.2.6. Dépôts de fer intra cérébraux et neurodégénérescence.....	105
2.3. Capture ciblée de 57 gènes d'ataxies cérébelleuses et séquençage haut débit d'une série de 155 patients.....	107
2.3.1. Manuscrit 3: Validation of a clinical practice-based algorithm for the diagnosis of autosomal recessive cerebellar ataxias.....	108
2.3.2. Manuscrit 4: Autosomal recessive cerebellar ataxia type 3 due to <i>ANO10</i> mutations: delineation and genotype-phenotype correlation study.....	132

2.3.3. Manuscrit 5: SYNE1 ataxia is a common recessive ataxia with major non-cerebellar features: a large scale multi-centre study.....	151
2.3.4. Séquençage haut débit avec capture ciblée.....	190
2.3.4.1. Sélection des patients.....	190
2.3.4.2. Sélection des gènes.....	192
2.3.4.3. Résultats de l'analyse des cent cinquante-cinq patients.....	195
2.3.5. Mutations dans le gène ANO10.....	198
2.3.6. Mutations dans le gène SYNE1.....	200
3. Discussion et Perspectives.....	204
3.1. Fréquence des mutations hypomorphes dans les ataxies cérébelleuses récessives...	205
3.2. Elargissement du spectre phénotypique des mutations récessives de WWOX.....	206
3.3. Nouvelles mutations dans <i>ANO10</i> et <i>SYNE 1</i>	209
3.3.1. Nouveaux cas d'ARCA 3.....	209
3.3.2 Nouveaux cas d'ARCA 1.....	210
3.4. Ataxies spastiques autosomiques récessives.....	212
3.5. Rentabilité diagnostique de la stratégie par capture ciblée dans notre série.....	214
3.6. Susceptibilité du cervelet dans les pathologies génétiques.....	217

3.6.1. Perturbation de l'homéostasie des protéines.....	218
3.6.2. Spécificités morphologiques des cellules de Purkinje.....	219
3.6.3. Sensibilité à des stress externes et excitotoxicité.....	219
3.7. Qu'est-ce qu'un "gène d'ataxie cérébelleuse"?	220
3.8. Traitement des ataxies cérébelleuses d'origine génétique.....	223
3.8.1. Prise en charge symptomatique.....	224
3.8.1.1. Kinésithérapie.....	224
3.8.1.1.1. Kinésithérapie associée à une thérapie occupationnelle.	225
3.8.1.1.2. Kinésithérapie de coordination.....	225
3.8.1.1.3. Exercices basées sur l'utilisation de jeux vidéo.....	226
3.8.1.2. Orthophonie.....	226
3.8.1.3. Soutien psychologique.....	226
3.8.1.4. Mesures socio-professionnelles et techniques.....	226
3.8.1.5. Prise en charge des complications orthopédiques et de la spasticité.....	227
3.8.2. Causes d'ataxies cérébelleuses traitables.....	228
3.8.2.1. La maladie de Refsum.....	228
3.8.2.2. La maladie de Niemann-Pick de type C.....	229
3.8.2.3. L'abêtalipoprotéïnémie.....	230
3.8.2.4. La xanthomatose cérébrotendineuse.....	231
3.8.2.5. L'ataxie avec déficit en vitamine E.....	232

3.8.2.6. L'ataxie avec déficit en coenzyme Q 10 ou ataxie cérébelleuse autosomique récessive de type 2.....	233
3.8.2.7. Autres ataxies avec une efficacité potentielle du coenzyme Q 10.....	233
3.8.3. Thérapeutiques d'avenir.....	235
3.8.3.1. Thérapie génique.....	235
3.8.3.2. Greffes de cellules souches.....	235
3.8.3.3. Essais pharmacologiques	236
 Bibliographie.....	 238
 Ressources Web.....	 256
 Annexes.....	 257
Annexe 1: Panel "Ataxie" du center for genomics and transcriptomics, Tübingen.....	257
Annexe 2 : Panel de 118 gènes d'ataxie (Nemeth et al., 2013)	259
 Résumé.....	 260
 Résumé en anglais.....	 260

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des ataxies cérébelleuses autosomiques récessives d'après Koenig.....	22
Tableau 2 : Liste des 57 maladies et gènes correspondants inclus dans la capture d'exons...	194
Tableau 3 : Données cliniques des patients avec mutations dans le gène SYNE1 de notre série.....	202

Liste des figures

Figure 1 : algorithme diagnostique devant une ataxie cérébelleuse d'après Fogel.....	28
Figure 2 : algorithme diagnostique devant une ataxie cérébelleuse d'après Schulz.....	29
Figure 3 : algorithme diagnostique devant une ataxie cérébelleuse d'après Anheim.....	30
Figure 4 : Stratégies de filtration des variants au cours du séquençage de l'exome à visée de recherche dans les maladies héréditaires.....	31
Figure 5 : Etapes du séquençage nouvelle génération.....	33
Figure 6 : Etape de Capture des gènes d'intérêt avec le kit Sureselect d'Agilent.....	35
Figure 7 : Bridge PCR avec amplification clonale sur lame.....	37
Figure 8: Séquence consensus des sites d'épissage chez l'homme.....	45
Figure 9: biosynthèse des sphingolipides à partir des acides gras hydroxylés.....	102
Figure 10 : Formule du galactosylcéramide.....	103
Figure 11 : Electrophérogrammes des patients avec mutations dans <i>SYNE1</i>	203

Liste des annexes

Annexe 1 : panel « Ataxie » du Center for genomics and transcriptomics Tübingen.....	256
Annexe 2 : Panel de 118 gènes d'ataxie d'après Nemeth et al., 2013.....	258

Abréviations

AAV : Adeno-associated virus

ABHD12 : ABéta hydrolase domain containing protein 12, muté dans le syndrome PHARC

ADCK3 : aarF domain containing kinase 3, associé à l'ataxie avec déficit en coenzyme Q10 ou ataxie autosomique récessive de type 2 (ARCA2)

AIF : Apoptosis Inducing Factor

ANO10 : gène de l'anoctamine 10, associé à l'ataxie autosomique récessive de type 3 (ARCA3)

AOA1 : ataxie avec apraxie oculomotrice de type 1

AOA2 : ataxie avec apraxie oculomotrice de type 2

*APT*X : gène de l'aprataxine, associée à l'AOA1

ARCA1 : ataxie autosomique récessive de type 1

ARCA2 : ataxie autosomique récessive de type 2

ARCA3 : ataxie autosomique récessive de type 3

ARSACS : autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix Saguenay

AVED : ataxia with vitamin E deficiency ou ataxie par déficit en vitamine E

DRPLA : atrophie dentato-rubro-pallido-luysienne

FA2H : Fatty acid 2 hydroxylase

FAHN : Fatty acid hydroxylase associated neurodegeneration

FMR1 : Fragile X Mental Retardation 1, gène muté dans le syndrome de l’X fragile

FXN : gène de la frataxine associé à l’ataxie de Friedreich (FRDA)

FXTAS : Fragile X Tremor Ataxia syndrome, secondaire à une prémutation du gène *FMR1*

HMPAO : hexa-méthyl-propyl-amineoxime

IOSCA : infantile onset spino-cerebellar ataxia

IPSc : induced pluripotent stem cell ou cellule souche pluripotente induite

LDL : Low Density Lipoprotein

NBIA : Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation

PHARC : Polyneuropathy, Hearing loss, Ataxia, Retinitis pigmentosa, Cataract

PKAN : pantothenate kinase-associated neurodegeneration

PLAN : *PLA2G6*-associated neurodegeneration

PLA2G6 : Phospholipase A2 group VI

SACS : Saccin molecular Chaperone, gène muté dans l’ARSACS

SCA : ataxie spino-cérébelleuse (dominante)

SCAN1 : Spinocerebellar ataxia, autosomal recessive, with axonal neuropathy

SETX : gène de la sénataxine, associée à l'AOA2

SPECT : single photon emission computed tomography (type de scintigraphie cérébrale avec tomographie d'émission monophotonique)

SPG7 : gène de la paraplégie spastique de type 7, SPG7

SYNE1 : spectrin repeat containing, nuclear envelope 1, gène muté dans ARCA1

TTPA : gène de la Tocopherol Transfer Protein Alpha, associé à l'ataxie par déficit en vitamine E

ZFYVE26 : Zinc Finger FYVE Domain-containing Protein 26, gène muté dans la paraplégie spastique de type 15, SPG15

1. Introduction

1.1. Définition de l'ataxie

L'ataxie, du grec *ἀταξία* « ataxia » signifiant littéralement « désordre », désigne un trouble de la coordination des mouvements volontaires, secondaire à une atteinte des voies cérébelleuses ou proprioceptives.

1.2. Séméiologie des atteintes du cervelet

Le syndrome cérébelleux est un syndrome clinique révélant une dysfonction du cervelet, des pédoncules cérébelleux ou des voies spinocérébelleuses.

Un syndrome cérébelleux statique est défini par la présence de troubles de la marche et de l'équilibre avec une tendance à écarter les pieds ou élargissement du polygone de sustentation. Le patient souffre d'une instabilité à la marche responsable d'embardees faisant parler de démarche « ébrieuse » et de troubles axiaux (élargissement du polygone de sustentation) Il s'y associe une asynergie (avec une absence de décollement du talon en position accroupie), une hypotonie avec des réflexes ostéo-tendineux pendulaires, une dysarthrie avec une voix scandée et explosive. Le syndrome cérébelleux statique est le plus souvent en lien avec une atteinte du vermis cérébelleux.

Un syndrome cérébelleux cinétique est défini par la présence d'une atteinte segmentaire d'un ou plusieurs membres avec un trouble de la coordination du mouvement dans l'espace (ou dysmétrie) due à une atteinte des hémisphères cérébelleux ou du pédoncule cérébelleux supérieur. Il existe une imprécision des gestes avec une tendance à dépasser la cible (ou hypermétrie), et un tremblement d'action qui augmente à l'approche de la cible. L'hypermétrie peut être mise en évidence au niveau des membres lors des manœuvres doigt-nez ou talon-genou mais également lors de l'étude des

saccades oculaires. La poursuite oculaire est également touchée avec un aspect saccadé. L'incoordination perturbe grandement les activités de la vie quotidienne du patient.

La symptomatologie n'est pas modifiée par le contrôle visuel contrairement à une autre forme d'ataxie, l'ataxie proprioceptive, qui s'aggrave à la fermeture des yeux. L'ataxie proprioceptive est secondaire à une atteinte des voies proprioceptives qui peut se localiser au niveau des nerfs périphériques, des cordons postérieurs de la moelle épinière ou au niveau cérébral. L'ataxie cérébelleuse peut parfois être associée à une ataxie proprioceptive.

Dans les pathologies cérébelleuses, les plaintes du patient concernent le plus fréquemment la marche avec l'impression d'être « instable », d'avoir « moins d'équilibre » avec de façon précoce des difficultés pour la course puis secondairement une gêne pour la marche avec parfois des chutes. Aux membres supérieurs, la gêne concerne les gestes fins comme l'écriture avec fréquemment un tremblement d'action. Les patients peuvent également se plaindre de difficultés d'articulation en rapport avec une dysarthrie cérébelleuse. Cette atteinte peut rendre difficile la compréhension par l'entourage.

Il y a encore quelques décennies, le rôle du cervelet était limité à des fonctions de contrôle du mouvement. Depuis vingt-cinq ans, des travaux ont pu démontrer son implication dans des tâches non motrices, notamment cognitives. Un « syndrome cérébelleux cognitif et affectif » a été décrit (cerebellar cognitive affective syndrome, Schmahmann et Sherman 1998) après des lésions cérébelleuses (infarctus cérébraux, chirurgie de tumeur cérébelleuse). Ces lésions étaient responsables de diaschisis croisés c'est-à-dire une perte de fonction d'une région distante de la lésion et controlatérale à celle-ci. Ces anomalies ont été mises en évidence par des études de perfusion cérébrale en scintigraphie cérébrale de type tomographie d'émission monophotonique à l'HMPAO (SPECT), révélant des hypoperfusions corticales controlatérales. Les troubles cognitifs

comprenaient des troubles dyséxécutifs, visuo-spatiaux, langagiers et émotionnels. Des voies de connexion entre cervelet et aires associatives corticales ont été mises en évidence par des techniques de traçage transynaptique des fibres chez l'animal. Il existe à présent des arguments pour affirmer qu'il existe des régions différentes du cervelet qui traitent des informations de domaines divers : des régions sensori-motrices (lobe antérieur, lobule VIII), cognitives (lobe postérieur, lobules VI et VII, Crus I et II) et émotionnelles (partie postérieure du vermis) (Stoodley et al., 2012). Une majeure partie du cervelet est connectée avec des aires associatives et comprend de multiples représentations de ces aires en son sein (Buckner, 2013).

1.3. Etiologies des pathologies du cervelet

1.3.1. Les causes acquises

Les formes acquises sont multiples : accident vasculaire cérébral, tumeur, traumatisme crânien, intoxication éthylique chronique, encéphalopathie de Gayet Wernicke, sclérose en plaques, encéphalopathies dysimmunitaires notamment paranéoplasiques, infection, atrophie multi systématisée de type cérébelleuse

1.3.2. Les causes génétiques

Les ataxies cérébelleuses héréditaires forment un groupe hétérogène et complexe de maladies neurodégénératives ou neurodéveloppementales.

1.4. Classifications des ataxies cérébelleuses héréditaires

Plusieurs classifications des ataxies cérébelleuses existent, basées sur des éléments cliniques, d'évolutivité (progressive ou non), et génétiques (mode de transmission, gène incriminé). Les ataxies cérébelleuses congénitales, le plus souvent non progressives, sont classées à part. Des maladies héréditaires du métabolisme peuvent être responsables d'ataxies cérébelleuses mais l'ataxie est rarement isolé avec le plus souvent l'association d'autres signes neurologiques et parfois extra neurologiques.

Les maladies associant épilepsie myoclonique, détérioration cognitive et pouvant comporter une ataxie sont classées dans les épilepsies myocloniques progressives, l'ataxie n'étant pas systématique. Les données récentes de biologie moléculaire (pour une revue, voir Anheim et al. 2012) montrent que de très nombreuses maladies héréditaires du métabolisme et les épilepsies myocloniques progressives peuvent se présenter sous une forme pauci-symptomatique où l'ataxie est au premier plan, lorsque les mutations ne touchent que partiellement la fonction du gène aboutissant à la formation d'une protéine peu active (mutation hypomorphe).

Au sein des ataxies cérébelleuses progressives, on distingue des formes autosomiques récessives, autosomiques dominantes, liées à l'X et secondaires à des mutations de l'ADN mitochondrial. Le travail de cette thèse porte exclusivement sur les formes génétiques d'ataxies cérébelleuses et de façon prédominante sur les formes autosomiques récessives. Des classifications cliniques existent, basées sur la présence d'un syndrome cérébelleux pur ou associé à d'autres symptômes (neuropathie périphérique, épilepsie...) (Harding 1983).

1.4.1. Classification des ataxies cérébelleuses autosomiques récessives

L'ataxie de Friedreich (FRDA) est la forme d'ataxie cérébelleuse autosomique récessive la plus fréquente affectant 1 personne sur 50.000 en France. Elle a été initialement décrite par Nikolaus Friedreich en Allemagne en 1863. Les connaissances sur les maladies héréditaires rares affectant le cervelet ont progressé de façon importante dans les vingt dernières années avec en 1996 l'identification du gène *FXN* muté dans la maladie de Friedreich. Cette découverte a permis de confirmer la présence de patients sans mutation dans le gène de la frataxine avec des formes cliniques différentes.

Plusieurs classifications ont été proposées basées sur des éléments divers ; âge de début des symptômes, présence d'une atrophie cérébelleuse, présence d'une atteinte cérébelleuse pure ou associée à une neuropathie...

La classification proposée par le Pr M. Koenig en 2003 est basée sur le site de la neurodégénérescence. Dans cette classification, l'ARSACS devrait être dans le groupe des atteintes avec polyneuropathie sensitivomotrice : une atteinte nerveuse périphérique apparaît au cours de son évolution clinique.

Atteinte spino-cérébelleuse sensitive	Atteinte cérébelleuse polyneuropathie SM	Atteinte cérébelleuse pure
FRDA	AOA1	ARSACS
AVED	AOA2	Ataxie avec hypogonadisme
Abétalipoprotéïnémie	SCAN1	
Maladie de Refsum		
IOSCA		

Tableau 1 : Classification des ataxies cérébelleuses autosomiques récessives

adapté d'après Koenig M. (Semin Pediatr Neurol, 2003)

La classification de Fogel et Perlman (2007) distingue au sein des ataxies cérébelleuses autosomiques récessives les phénotypes suivants :

1) « Friedreich ataxia like » proche de la maladie de Friedreich comprenant :

- la maladie de Friedreich (*FXN*),
- l'ataxie par déficit en vitamine E (*TTPA*),
- la maladie de Refsum (*PHYH* et *PEX7*)
- l'abétalipoprotéïnémie. (*MTTP*)

2) « Friedreich ataxia like with cerebellar atrophy » proche de la maladie de Friedreich mais comprenant une atrophie cérébelleuse :

- la forme tardive de maladie de Tay Sachs (*HEXA*),
- la xanthomatose cérébro-tendineuse (*CYP27A1*),
- les pathologies associées à un dysfonctionnement de la polymérase gamma (*POLG*) notamment le « SANDO » pour Sensory Ataxic Neuropathy, Dysarthria and Ophthalmoparesis,
- l'ataxie spino-cérébelleuse avec neuropathie axonale ou SCAN1 (*TDPI*).

3) « Early onset ataxia with cerebellar atrophy » de début plus précoce que la maladie de Friedreich et avec une atrophie cérébelleuse :

- l'ataxie télangectasie (*ATM*),
- l'« ataxia telangiectasia like disorder » ou ATLD (*MRE11*)
- l'ataxie avec apraxie oculomotrice de type 1 (*APTX*),
- l'ataxie avec apraxie oculomotrice de type 2 (*SETX*),
- l'ataxie récessive de Charlevoix –Saguenay ou ARSACS (*SACS*),
- des ataxies congénitales : l'ataxie spino-cérébelleuse de début infantile ou IOSCA (*C2orf10* ou *Twinkle*), l'ataxie de Cayman (*ATCAY*) et le syndrome de Marinesco-Sjögren (*SILI*).

Dans cette classification, l'ataxie avec apraxie oculomotrice de type 2 devrait être clairement dans le groupe 2 de par son âge de début (entre 10 et 20 ans en général) et la présence d'une neuropathie périphérique plus sensitive que motrice).

Il n'existe pas de classification basée sur des données moléculaires tant les gènes impliqués dans les pathologies du cervelet ont des fonctions diverses.

1.4.2. Difficultés diagnostiques dans les ataxies cérébelleuses

Le nombre de gènes responsables d'ataxies cérébelleuses d'origine génétique augmentant chaque année, il devient quasiment impossible pour le clinicien d'avoir une connaissance exhaustive de ces pathologies, même s'il est spécialisé en pathologies du mouvement. La collaboration avec une ou plusieurs équipes de généticiens est plus que jamais indispensable. « Un diagnostic moléculaire pour chaque patient » reste un défi : près de la moitié reste sans diagnostic (Anheim et al., 2009). Des stratégies modernes de diagnostic permettent probablement d'améliorer ces résultats par l'utilisation du séquençage haut débit par capture ciblée (Nemeth et al., 2013) mais avec seulement 18% de diagnostics sur la cohorte étudiée. L'utilisation de l'exome (Pyle et al., 2014) semble plus rentable en retrouvant des mutations qui ne sont pas toujours dans des gènes considérés comme des gènes d'ataxie (*SPG7*, *SPG15/ZFYVE26*...).

L'hétérogénéité des ataxies cérébelleuses héréditaires est d'abord clinique. Il existe des tableaux cliniques plus complexes associant une ataxie cérébelleuse à d'autres signes : atteinte du système nerveux périphérique (neuropathie...), du système nerveux central (retard mental,

épilepsie, paraparésie spastique, mouvements anormaux...) ou d'autres organes (rétinite pigmentaire, cardiopathie, diabète...).

L'hétérogénéité est également génétique avec plus de 100 gènes ayant été décrits comme pouvant être responsable d'une ataxie cérébelleuse.

Ces pathologies sont rares. La prévalence estimée dans une méta-analyse récente est de 2,7/100.000 pour les ataxies cérébelleuses autosomiques dominantes et de 3,5/100.000 pour les ataxies cérébelleuses autosomiques récessives (Ruano et al., 2014).

Elles peuvent se révéler dès la naissance et jusqu'à l'âge adulte, le plus souvent avant 40 ans. Ces affections chroniques sont le plus souvent d'aggravation progressive. Elles conduisent à un handicap variable selon les formes. En fonction du gène impliqué, le handicap peut être majeur conduisant à une perte précoce de la marche voire à un décès prématuré lié aux conséquences de l'atteinte neurologique (troubles de la déglutition, chutes) ou de l'atteinte extra-neurologique associée (cardiomyopathie dans l'ataxie de Friedreich par exemple).

Le diagnostic des formes génétiques est rendu difficile pour plusieurs raisons :

- le nombre extrêmement important de gènes pouvant être responsable d'ataxies cérébelleuses avec un accès encore limité aux techniques de séquençage haut débit
- la fréquence des présentations sporadiques
- la variabilité phénotypique
- la méconnaissance de certains gènes non encore identifiés.

En l'absence de diagnostic moléculaire, ni la réalisation de corrélation génotype-phénotype ni l'inclusion dans des protocoles de suivi pour mieux connaître l'histoire naturelle de la maladie ne

sont possibles. Le patient ne peut pas non plus bénéficier d'éventuels essais thérapeutiques pharmacologiques ciblés sur l'anomalie génétique et ses conséquences moléculaires. Bien qu'il n'existe pas dans la majorité des cas de traitement ralentissant l'évolution de la maladie, certains malades peuvent bénéficier d'un traitement spécifique comme la supplémentation en vitamine E dans l'ataxie par déficit en vitamine E (AVED) ou un traitement par miglustat dans la maladie de Niemann-Pick de type C.

1.5. Algorithmes diagnostiques dans les pathologies cérébelleuses héréditaires

L'objectif d'une consultation médicale est de poser un diagnostic syndromique à partir des signes cliniques et de proposer une prise en charge thérapeutique pharmacologique ou non, visant à améliorer la qualité de vie du patient. A partir de la plainte du patient, l'interrogatoire et l'examen clinique permettent de conclure à une ataxie cérébelleuse.

L'objectif final du médecin est d'aboutir à un diagnostic le plus rapidement possible au moindre coût, afin de pouvoir informer le patient du pronostic de l'affection et de débiter une prise en charge adaptée ou un traitement le plus précocement possible s'il en existe un. Poser un diagnostic de certitude permet également d'arrêter des investigations coûteuses itératives notamment dans les formes d'ataxies cérébelleuses sporadiques. Dans ces formes qui sont les plus fréquentes en Europe, il peut parfois persister un doute entre une origine génétique et une origine acquise.

Devant la complexité du diagnostic des ataxies cérébelleuses, plusieurs algorithmes ont été proposés pour aider le clinicien afin d'avancer correctement dans cette situation (Fogel et Perlman, 2007 ; Schulz et al., 2009) et de façon plus récente par notre équipe (Anheim et al, 2012) et d'autres équipes (Mancuso et al., 2014). Leur « efficacité » en conditions réelles de consultation spécialisée n'avait jusqu'à maintenant pas été testée. Une des limites de ces algorithmes est qu'ils ne peuvent rendre en compte que partiellement de l'immense diversité des ataxies métaboliques.

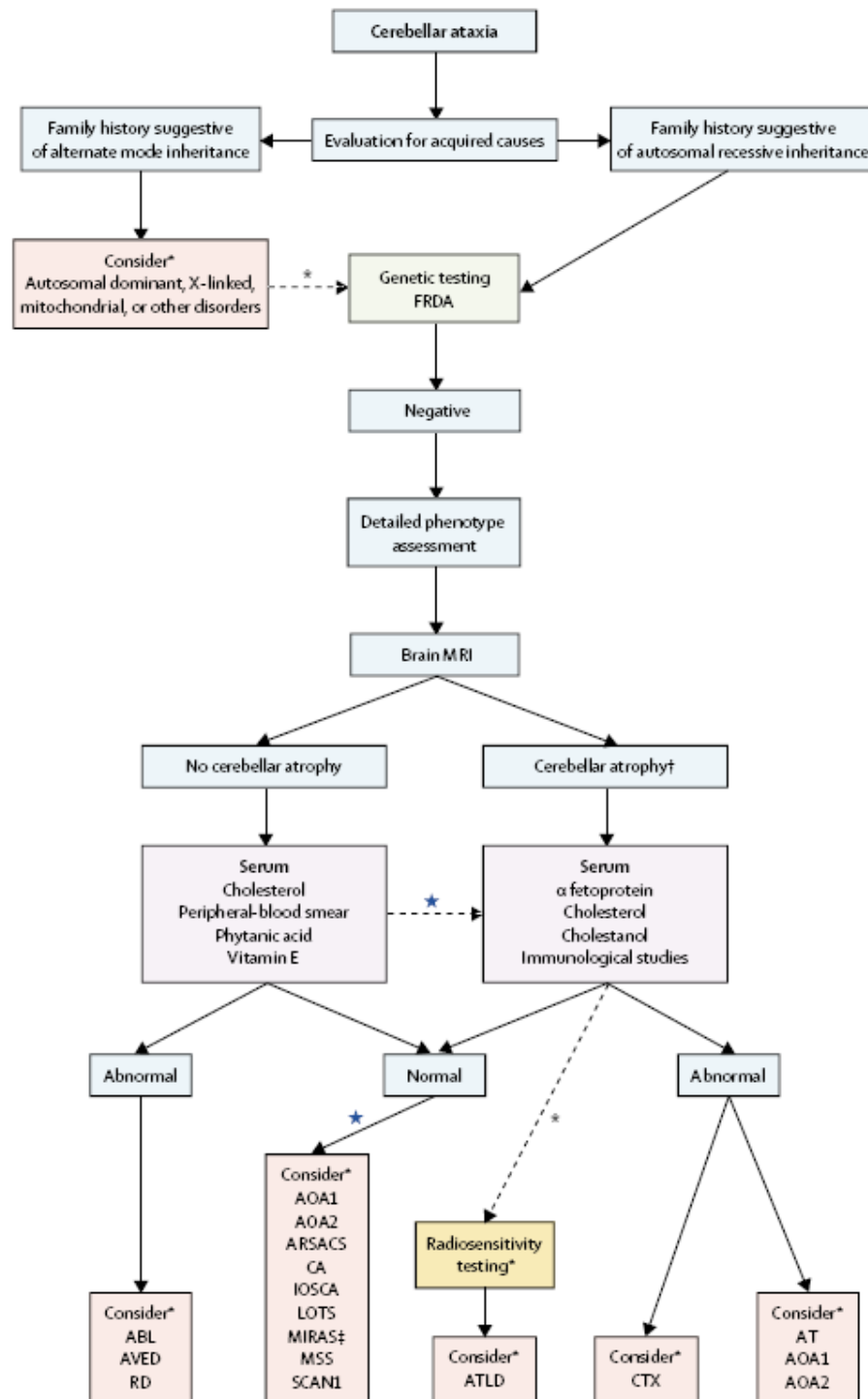


Figure 1 : Algorithme diagnostique devant une ataxie cérébelleuse d'après Fogel et Perlman

(Lancet Neurol, 2007) AT : ataxia telangiectasia ; ATLD : ataxia telangiectasia like disorder ; CA : Cayman ataxia ; CTX : cerebrotendinous xanthomatosis ; IOSCA : infantile onset spinocerebellar ataxia ; LOTS : Late onset Tay Sachs disease ; MIRAS : mitochondrial recessive ataxia syndrome ; MSS : Marinesco Sjogren syndrome ; SCAN1 : spinocerebellar ataxia and neuropathy 1

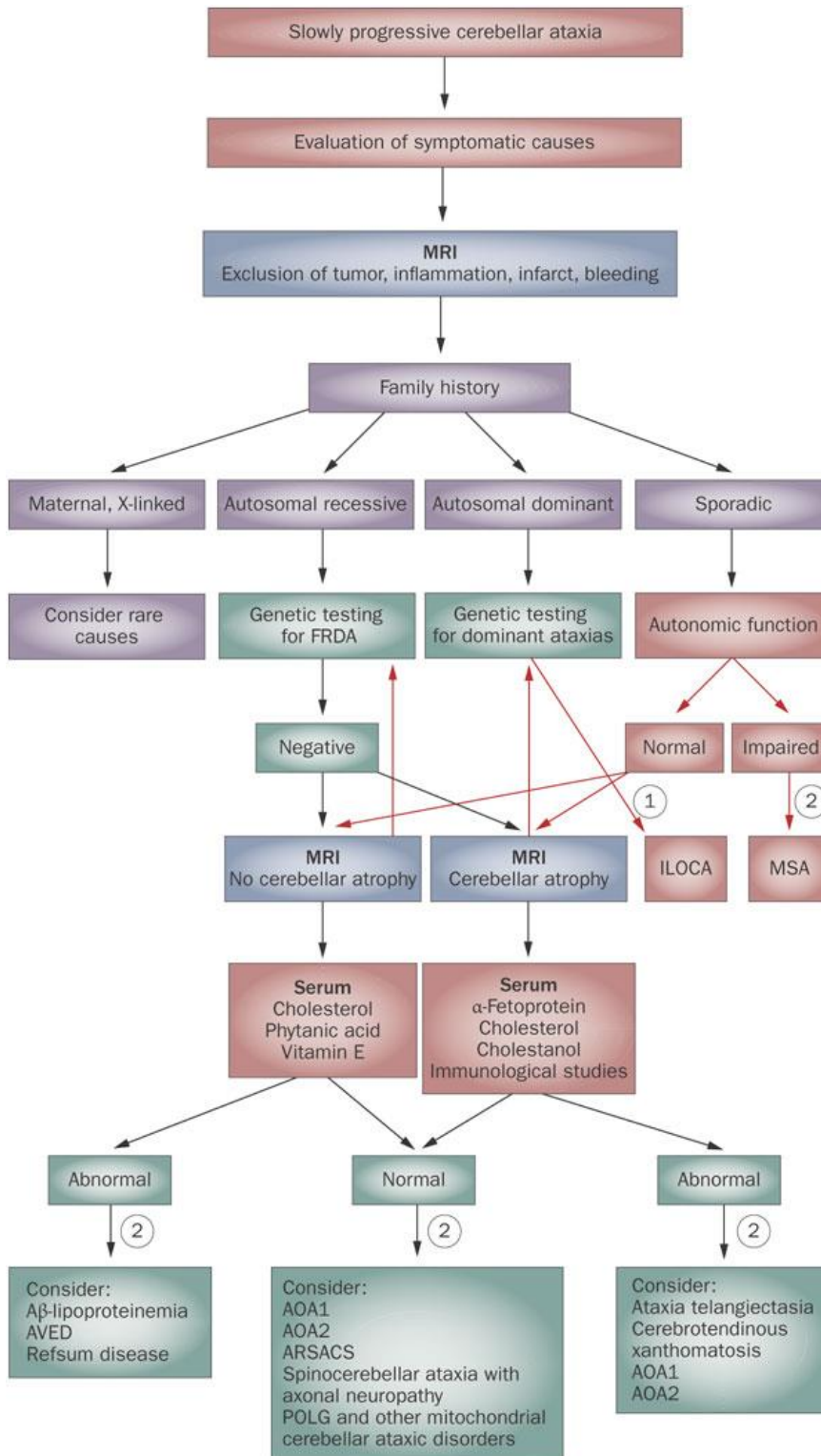


Figure 2 : algorithme diagnostique devant une ataxie cérébelleuse

D'après Schulz et al. (Nat Rev Neurol, 2009)

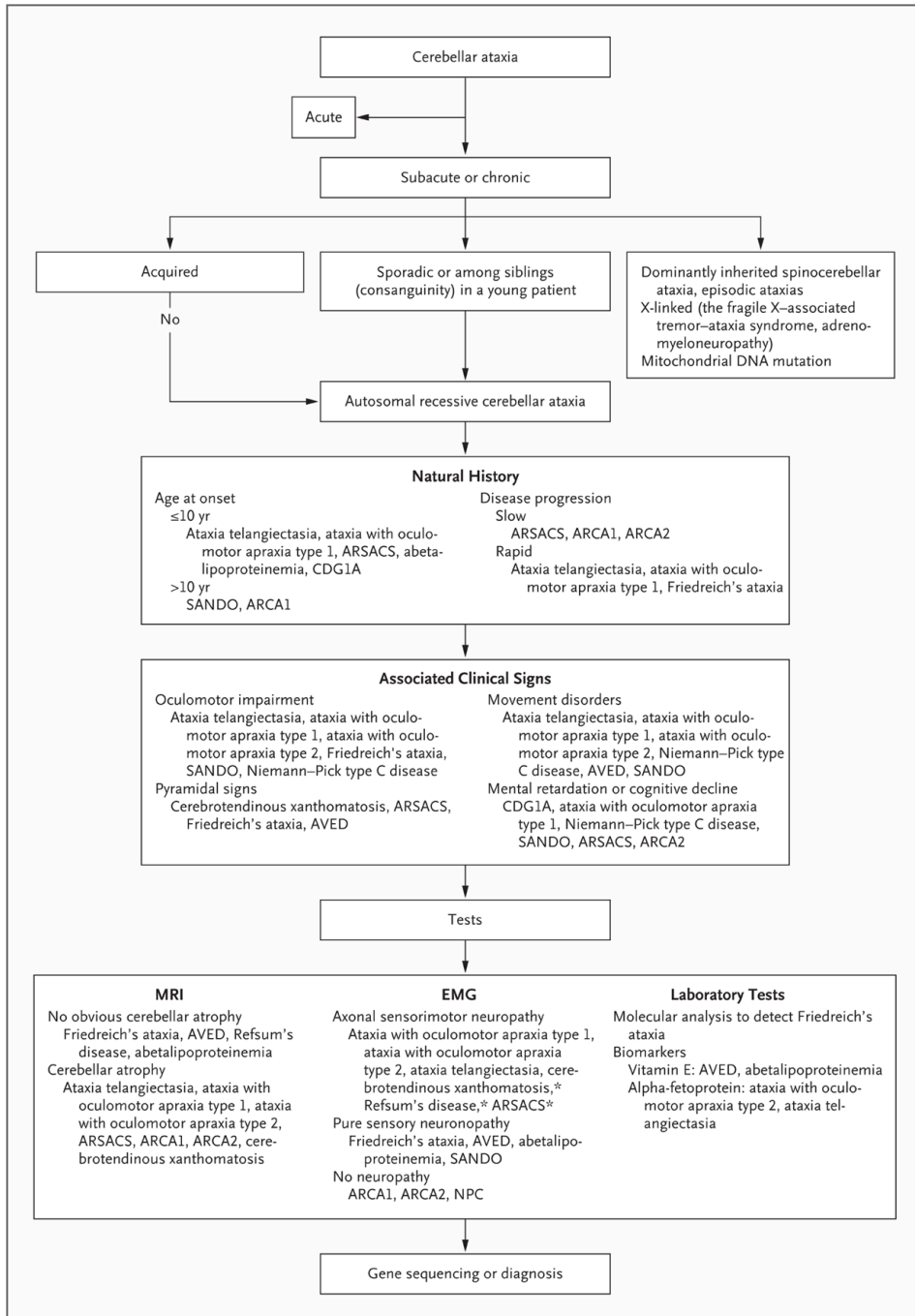


Figure 3 : algorithme diagnostique devant une ataxie cérébelleuse

D'après Anheim et al. (New England Journal of Medicine, 2012)

1.6. Intérêt du séquençage nouvelle génération dans la génétique des ataxies cérébelleuses

Partant du constat que le séquençage classique par méthode Sanger ne permettait d'aboutir à un diagnostic moléculaire que dans 50% des cas, de grandes espérances ont été placées dans l'amélioration des méthodes de séquençage, notamment les méthodes de séquençage dites « massivement parallèle » ou « de haut débit ». Ces techniques ont été validées pour retrouver de façon fiable la présence de mutation, y compris dans les ataxies cérébelleuses autosomiques récessives (Hoischen et al., 2010). Le développement des techniques de séquençage haut débit a rendu possible le séquençage en une seule étape d'un grand nombre de gènes par la capture ciblée d'un panel de gènes voire de l'exome (l'ensemble des séquences codantes du génome humain). La disponibilité de grandes bases de données de polymorphismes a été un autre changement radical (Figure 4). Dans le domaine de la recherche, ces techniques ont accéléré l'identification de nouveaux gènes de pathologies humaines. Dans la pratique clinique, cela a permis d'aboutir plus rapidement à des diagnostics sur le plan moléculaire.

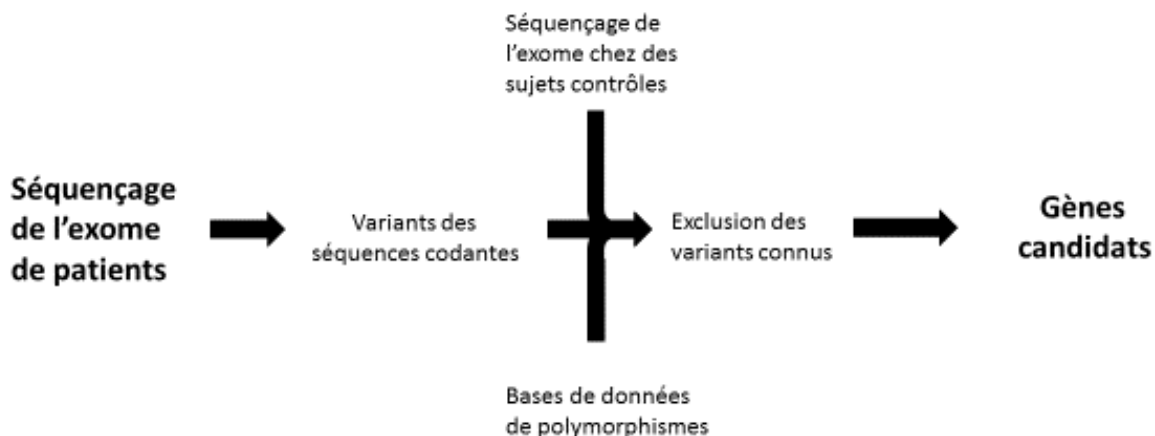


Figure 4 : Stratégies de filtration des variants au cours du séquençage de l'exome à visée de recherche dans les maladies héréditaires. Adapté d'après Biesecker, Nature Genetics 2010.

1.6.1. Méthodologie du séquençage nouvelle génération

1.6.1.1. Généralités

Le séquençage à visée diagnostique a pour but de porter un diagnostic dont la fiabilité doit être rigoureusement contrôlée en raison des conséquences d'un diagnostic positif pour l'individu et sa famille. Même si la fiabilité du séquençage nouvelle génération reste pour l'instant inférieure à celle du séquençage classique (Sanger), ce désavantage est très largement compensé par le très grand nombre de gènes couverts et la rapidité et l'automatisation de cette approche. Cette fiabilité nécessite une bonne couverture des gènes d'intérêt pour minimiser autant que possible le risque de rater une mutation qui n'aurait pas été séquencée. De plus, une profondeur importante est indispensable pour d'une part confirmer avec certitude une mutation en s'affranchissant des erreurs techniques de séquençage et d'autre part pour rechercher des anomalies génomiques comme les variations du nombre de copies (Copy Number Variations ou CNV). Afin d'avoir une couverture et une profondeur suffisante des zones d'intérêt dans le génome, une étape d'enrichissement d'exons est nécessaire.

Plusieurs techniques d'enrichissement sont disponibles sur le marché avec des principes différents (www.biorigami.com) :

- Enrichissement par capture d'hybrides : La capture par hybridation des régions cibles est initiée à partir de la librairie de séquençage. Elle peut être effectuée soit en solution (billes magnétiques) soit sur support solide (microarrays). Le kit SureSelect (Agilent), utilisé pour notre étude, se sert de cette méthode.

- Enrichissement par circularisation de fragments d'ADN : En amont de la préparation de la librairie, les fragments d'ADN (fragmentation enzymatique ou mécanique selon la méthode) sont enrichis via une sonde constituée d'une séquence universelle flanquée aux extrémités de séquences

spécifiques de la région cible, permettant la circularisation de ces séquences cibles et leur capture à l'aide de la séquence universelle (par exemple, méthode Haloplex, Agilent).

- Enrichissement par PCR : Cette approche intervient avant la préparation de la librairie et consiste grossièrement en une PCR multiplexée ciblant les régions d'intérêts. Une étape préliminaire de design des amorces est requise.

- Une technologie plus récemment arrivée sur le marché, faisant appel à la microfluidique et l'émulsion PCR, permet l'amplification multiplexée (jusqu'à 20000) en microgouttelettes (une paire d'amorces par microréacteur) en un seul tube (Rain Dance).

En fonction du type de technique de séquençage de nouvelle génération, une phase d'amplification se fait soit par une PCR émulsion soit par PCR sur un support solide.

Le protocole utilisé dans notre laboratoire est résumé dans la figure 5 ci-dessous.

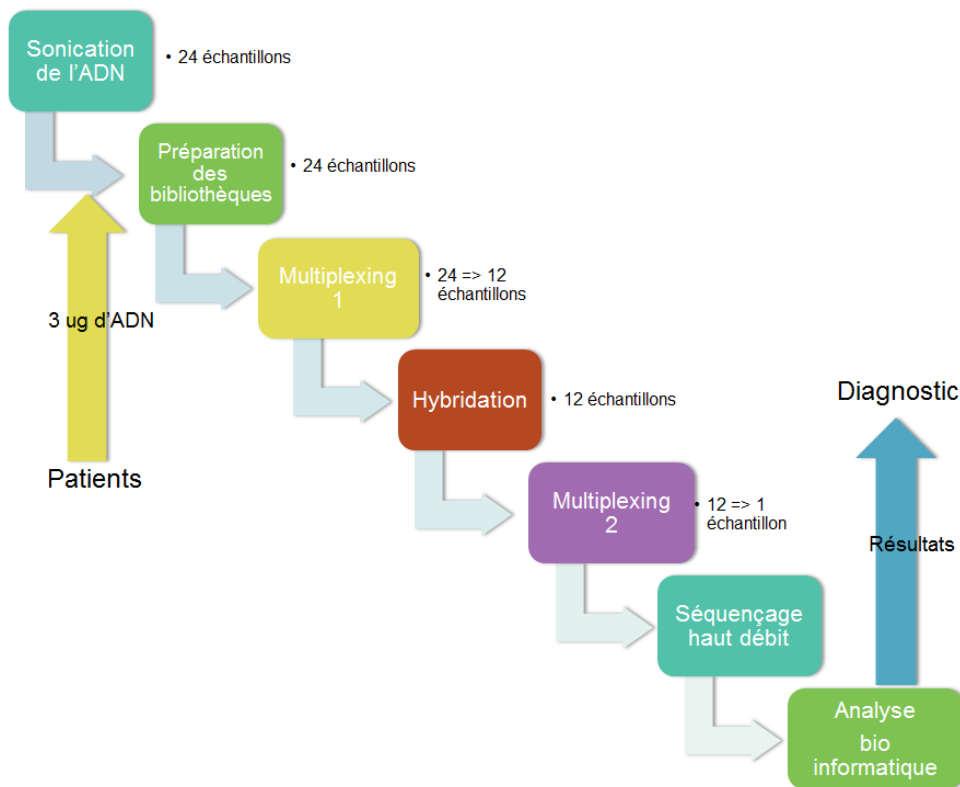


Figure 5 : Etapes du séquençage nouvelle génération

1.6.1.2. Préparation des échantillons

L'ADN est extrait des leucocytes du patient à partir d'un échantillon de sang. La technique de séquençage nouvelle génération nécessitait (jusqu'en 2013) trois microgrammes d'ADN.

1.6.1.3. Sonication de l'ADN

Nous avons effectué une sonication de l'ADN avec le robot Covaris E210. L'ADN est coupé en petits fragments de 100 à 300 paires de bases. La qualité de l'ADN soniqué (taille et quantité) est analysée sur le Bioanalyzer « DNA 1000 assay » (Agilent).

1.6.1.4. Préparation des bibliothèques (« libraries »)

Les fragments d'ADN vont subir une ligation à des adaptateurs (tag) qui permettront de les identifier ultérieurement, puis les fragments sont purifiés. Les réactions et purifications sont effectuées à l'aide de l'automate SRPI (Beckman Coulter, Inc.). Cinq cent nanogrammes d'ADN fragmenté sont nécessaires pour cette étape. Ensuite, la première amplification par PCR est réalisée (8 cycles), suivie d'une analyse de l'ADN de la bibliothèque sur Bioanalyzer avec un pic unique dans la gamme des 300 paires de base (entre 200 et 400 pb).

1.6.1.5. Multiplexage pour un groupement des échantillons

Les ADN sont poolés afin de pouvoir séquencer plusieurs patients au cours de la même lecture. Les tags d'indexage permettent ce multiplexage des échantillons, réalisé dans le but de diminuer les coûts de séquençage. Une première étape de multiplexage est réalisée avant l'hybridation-capture. Un deuxième multiplexage, après l'étape de capture, permet au total de passer 24 échantillons dans une seule ligne de séquençage.

1.6.1.6. Hybridation-capture

Une hybridation avec des amorces oligonucléotidiques d'ARN complémentaires est effectuée à 65°C pendant deux jours. Dans la figure 6, l'étape d'hybridation-capture est décrite. Le kit de capture Sureselect utilisé comprend dans notre cas les « appâts » (baits) pour les 57 gènes sélectionnés qui vont être amplifiés (57 gènes d'ataxie et le gène SRY pour la vérification du sexe). Dans le cadre d'un exome, les « appâts » pour l'ensemble des exons du génome sont nécessaires. Après l'hybridation-capture, la deuxième amplification PCR (10 cycles) puis une purification et un contrôle de la qualité sont effectués.

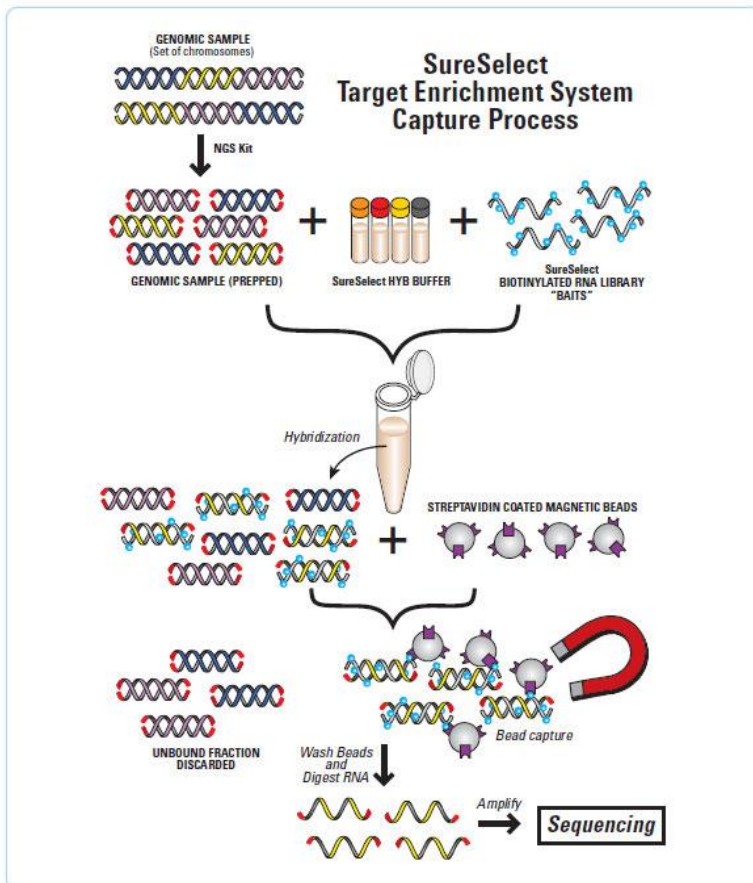


Figure 6 : Etape de Capture des gènes d'intérêt avec le kit Sureselect d'Agilent

<http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pageId=3083>

1.6.1.7. Séquençage à l'aide de terminateurs réversibles (Illumina)

L'amplification « clonale » des fragments d'ADN à séquençer s'effectue sur un support solide (PCR par « ponts » ou bridge PCR-Figure 7), ce qui permet d'individualiser sur la lame un spot (cluster) pour chaque fragment de la bibliothèque. La réaction de séquençage est réalisée directement sur le support où l'ADN a été amplifié. Un mélange contenant toutes les bases est ajouté, qui portent chacune un fluorophore différent (A, G, T, C). L'extrémité de ces bases est protégée pour empêcher l'addition de bases supplémentaires à chaque cycle d'incorporation.

Le premier cycle de séquençage commence en ajoutant les 4 terminateurs réversibles marqués, les amorces et l'ADN polymérase. Après excitation par un laser, la fluorescence émise par chaque cluster est mesurée par caméra CCD et la première base est lue. Le cycle suivant continue en enlevant le fluorophore et le groupement protecteur puis en ajoutant à nouveau les 4 terminateurs réversibles marqués. Après excitation, l'image est acquise de la même façon et la deuxième base est lue. Les cycles de séquences sont répétés pour lire chaque base les unes après les autres. La lecture laser permet donc de détecter simultanément toutes les positions incorporées à chaque cycle. Cette méthode permet l'acquisition en parallèle de plus de 3 milliards de séquences de 100 bases de long. Chaque position étant lue l'une après l'autre, les erreurs principales de cette technologie sont liées aux erreurs de PCR lors des deux cycles d'amplification au cours de la préparation des bibliothèques, et les ambiguïtés liées aux chevauchements physiques de certains spots.

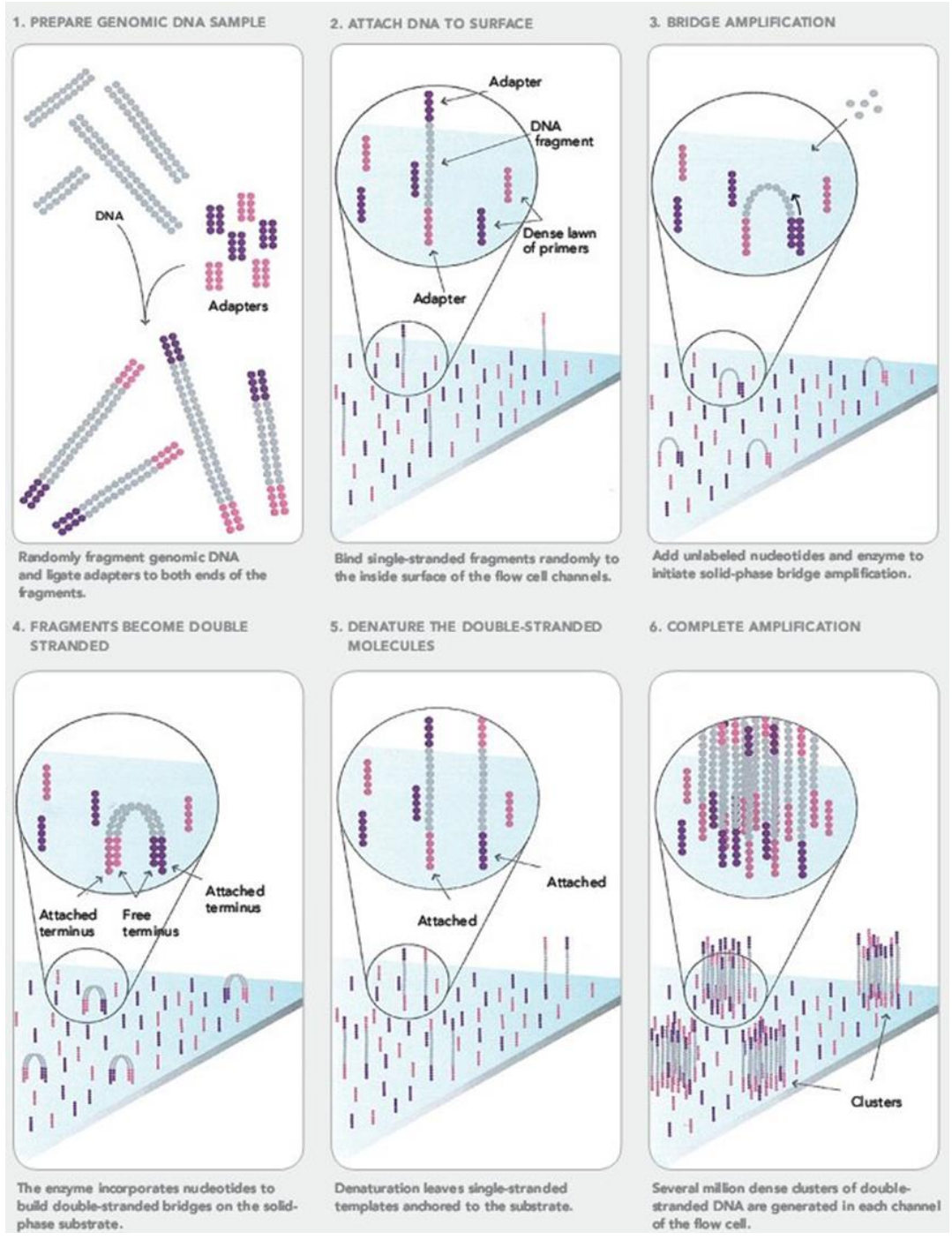


Figure 7 : Bridge PCR avec amplification clonale sur lame

<http://seqanswers.com/forums/showthread.php?t=21>

1.6.1.8. Analyse des données

Après le séquençage, une analyse bio-informatique est réalisée par un bio informaticien pour l'alignement et l'annotation des variants. L'analyse est ensuite effectuée manuellement pour étudier les variants un par un et séparer les polymorphismes rares absent des bases de données, les variants de signification indéterminée et les mutations probablement pathogènes (cf. 1.8. Interprétation des résultats).

1.6.1.9. Technologies d'avenir (Buermans et al., 2014)

Le séquençage nouvelle génération s'est perfectionné jusqu'à la détection d'une seule molécule d'ADN avec le séquençage de molécule unique en temps réel (« Single molecule real time » sequencing technology ou SMRT) développé par Pacific Biosciences. L'ADN est clivé comme dans les techniques précédemment citées mais il n'y a pas besoin de phase d'amplification. La réaction de séquençage s'effectue dans un petit puits, ou est fixé une ADN polymérase. Le système de détection est suffisamment sensible pour détecter l'incorporation d'une seule base. Les signaux sont détectés en temps réel (75/minute).

Une deuxième technique par Nanopore utilise un séquençage en molécule unique. La molécule va passer à travers un pore qui sépare deux compartiments. La présence de la molécule qui traverse ce pore entraîne une modification du potentiel entre les deux compartiments.

1.6.2. Identification de nouveaux gènes d'ataxies cérébelleuses autosomiques récessives

L'identification de nouveaux gènes de pathologies récessives a été réalisée jusqu'à récemment par l'étude de grandes familles consanguines avec plusieurs atteints en réalisant une étude des régions d'homozygotie communes par cartographie d'homozygotie. Après avoir identifié une ou plusieurs grandes régions d'intérêt, une approche par séquençage de « gènes candidats » était réalisée. En raison d'un nombre de gènes très important dans ces larges régions communes d'homozygotie, seul les gènes jugés pertinents étaient séquencés. La sélection des gènes séquencés était basée sur les fonctions connues ou supposées du gène et l'expression de la protéine dans le système nerveux central en ce qui concerne les ataxies.

L'étude de familles consanguines reste d'actualité mais le séquençage haut débit permet actuellement d'explorer l'ensemble de l'exome ou l'ensemble d'un locus permettant de se passer de la sélection de gènes candidats. Il paraît préférable maintenant que les capacités techniques le permettent d'étudier sans préjugés l'ensemble des gènes ayant des variants dans une région d'intérêt. L'analyse de l'exome dans ces cas permet également d'exclure les gènes connus et de s'assurer de la validité de la découverte. L'approche par gène candidat laissait place à une certaine subjectivité dans le nombre de gènes à séquencer et pouvait mettre de côté le gène responsable de l'affection pour peu que sa fonction présumée soit méconnue ou erronée.

D'autres méthodes d'identification sont en train d'être développées sans avoir recours à l'étude de familles consanguines. L'étude en exome de grande cohorte de patients avec une ataxie cérébelleuse sporadique présumée génétique pourrait permettre de trouver plusieurs mutations dans le même gène. Ceci permettrait d'incriminer ce nouveau gène dans une nouvelle forme d'ataxie. La

principale limite à cette approche est le très grand polymorphisme du génome humain qui fait que dans une cohorte de plusieurs centaines de patients, on peut retrouver de façon fortuite des variations de signification inconnue dans le même gène chez deux, trois ou plus de patients. Ceci est particulièrement vrai pour les variations faux-sens (9000 en moyenne par exome, dont beaucoup sont des variations privées ou rares, et donc compatibles avec une transmission héréditaire récessive). Dans ces cas, seule l'analyse fonctionnelle des variants permettra de les incriminer comme causaux dans la maladie. Cette analyse fonctionnelle peut s'avérer délicate pour les mutations hypomorphes, mentionnées plus haut, et souvent responsables d'ataxies.

1.6.3. Identification de nouveaux gènes d'ataxies cérébelleuses autosomiques dominantes

La stratégie dans les formes dominantes est différente. Plusieurs individus atteints et sains sont séquencés en exome afin d'exclure les variants présents chez les sains et ne retenir que les variants communs aux atteints.

La principale difficulté est de trouver des familles avec plusieurs atteints. L'analyse peut être rendue complexe par une maladie de pénétrance incomplète. En général, il est nécessaire d'avoir au moins 11 individus atteints prélevés et analysables par famille, ce qui permet d'atteindre un LOD score de 3 et de s'affranchir de la pénétrance incomplète. Là aussi, le très grand polymorphisme du génome humain représente un frein considérable dans l'interprétation des données.

1.6.4. Apport du séquençage haut débit au diagnostic « au lit du patient »

L'accès accru à cette technique permet de diagnostiquer des mutations dans des gènes non explorés en routine jusqu'à maintenant, comme c'était notamment le cas du gène *SYNE1*, en raison

de sa taille très importante (145 exons). Le séquençage haut débit est également la solution nécessaire pour le diagnostic des maladies génétiquement très hétérogènes, comme c'est le cas des ataxies héréditaires (plus de 100 gènes incriminés jusqu'à présent).

1.6.5. Validation d'une mutation en séquençage haut débit

La profondeur du séquençage correspond au nombre de séquences obtenues pour une même région (d'où la nouvelle appellation « séquençage massivement parallèle » pour cette technologie). La couverture est le pourcentage de bases séquencées par rapport au nombre de bases totales. Les données de séquençage haut débit pour un patient permettent de s'assurer de la qualité du séquençage en donnant des valeurs de profondeur et de couverture de séquençage. La profondeur est variable entre les différentes régions du génome explorées, pouvant être faible avec au minimum 10 à 20 séquences pour être significative, et à l'opposé être très importante, supérieure à 100 voire beaucoup plus pour les panels de capture ciblée. Il est encore recommandé de demander une confirmation par séquençage Sanger d'une mutation découverte en séquençage haut débit, ceci surtout dans un but d'identito-vigilance de ce processus très complexe.

1.7. Stratégies de séquençage haut débit

1.7.1. Capture ciblée d'un panel de gènes

L'utilisation d'une capture d'un nombre limité de gènes permet de réduire le coût du séquençage avec une bonne profondeur des gènes explorés. Le temps d'analyse est réduit. Des solutions commerciales sont proposées avec des panels de gènes en fonction de la maladie (exemple panel www.cegat.de; Annexe 1). Cette technique permet d'éviter de découvrir des anomalies génétiques qui n'étaient initialement pas recherchées. La limite principale est la non prise en compte de la découverte de nouveaux gènes impliqués dans la pathologie d'intérêt. Une autre limite est la non prise en compte des gènes impliqués dans des pathologies cliniquement chevauchantes (par exemple, un nombre croissant de gènes de paraplégie spastique s'avère être également responsable de nouvelles formes d'ataxie, qu'elles soient spastiques ou non).

1.7.2. L'exome

L'étude de l'exome permet d'explorer l'ensemble des exons du génome, où est localisée la grande majorité des mutations impliquées dans les maladies génétiques.

Dans le cadre de la recherche, l'exome classique permet à la fois de rechercher une mutation dans un gène connu, mais aussi de rechercher une mutation dans des gènes non connus pour définir une nouvelle entité de la pathologie d'intérêt.

Dans le cadre du diagnostic, des techniques de « mini exome » permettent d'étudier l'ensemble des gènes déjà connus comme étant impliqués dans les maladies génétiques humaines.

1.7.3. Le génome entier

L'étude du génome entier est une technique plus coûteuse que les méthodes présentées auparavant (en raison du très grand nombre de bases analysées, 50 fois plus que pour un exome), la réservant actuellement à la recherche. Le très grand avantage du séquençage du génome entier est sa simplicité, par l'absence d'étape de capture. L'objectif est avant tout d'avoir les mêmes données concernant les exons que pour un exome mais avec une meilleure qualité. L'étude du génome entier pourrait donner de meilleurs résultats que l'exome pour les variants affectant un seul nucléotide (Single Nucleotide Variant ou SNV) et les insertions/délétions de petite taille (Belkadi et al., 2015). Par contre, la découverte de mutations introniques ne se situant pas à proximité d'un site d'épissage restent toujours d'interprétation difficile par leur nombre très important et par les difficultés à prédire leur pathogénicité. Cette interprétation nécessite une analyse bio-informatique, afin de cibler précisément ceux méritant une validation par des tests fonctionnels longs, coûteux et fastidieux. Par l'absence d'étape de capture, le séquençage du génome entier devrait également permettre l'analyse simultanée des CNV (copy number variations, c'est à dire les grandes délétions ou insertions géniques) responsables d'un nombre non négligeable d'anomalies génétiques.

1.8. Interprétation des résultats

L'interprétation des résultats en génétique nécessite une série de vérifications et de recoupements. Le type de mutation influe grandement sur la prédiction de la pathogénicité d'un variant :

1.8.1. Les mutations insertions-délétions (ou « ins/del ») touchant la séquence codante

Certaines sont responsables d'un décalage du cadre de lecture aboutissant à la formation d'un codon stop prématuré et d'une protéine tronquée, le plus souvent non fonctionnelle et dégradée par le protéasome.

D'autres sont responsables d'une insertion ou d'une délétion en phase, allongeant ou raccourcissant la protéine. Ces ins/del en phase sont considérées comme autant pathogènes voire davantage que les mutations faux sens en raison de la modification tridimensionnelle de la protéine qu'elles peuvent entraîner.

1.8.2. Les mutations d'épissage

Le site d'épissage peut être affecté à deux parties distinctes :

-les positions canoniques AG/exon/GT (Chambon's rule) se trouvant dans les séquences immédiatement flanquantes à l'exon (figure 8). Ces variants sont considérés comme pathogènes (car ils aboutissent à un saut d'exon(s). L'interprétation est difficile s'ils touchent un exon correspondant à un transcrit alternatif minoritaire et non spécifique d'un tissu pour sa fonction.

-au niveau des nucléotides en dehors de la séquence canonique.

Pour déterminer la pathogénicité de ces mutations, des logiciels de prédiction, tel que les logiciels SplicePort et Human Splicing Finder, ont été créés, permettant de déterminer l'impact d'un changement nucléotidique sur l'épissage. Cependant, la fiabilité de ces logiciels n'est pas absolue et la pathogénicité prédite des variants doit être confirmée par RT-PCR du transcrit correspondant.

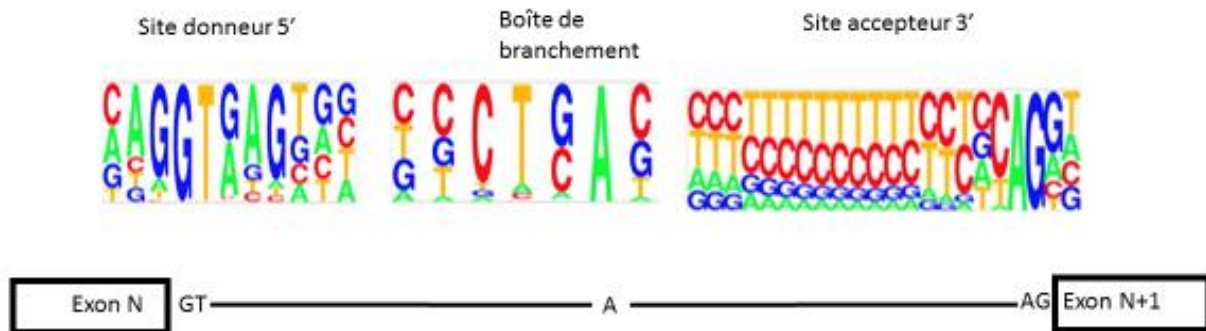


Figure 8 : Séquence consensus des sites d'épissage chez l'homme, adaptée d'après Lim et Burge, 2001.

1.8.3. Les mutations non-sens, stop-del et touchant le codon initiateur

Tout comme les mutations ins/del et les mutations touchant les séquences canoniques d'épissage, les mutations non-sens (mutations « stop » ou «*»), stop-del (mutation du codon stop en un codon codant pour un acide aminé) et touchant le codon ATG d'initiation de la traduction sont considérées comme pathogènes, sauf si elles touchent un exon correspondant à un transcrit alternatif minoritaire.

1.8.4. Les mutations faux-sens

En raison de la modification moins drastique qu'ils entraînent, l'interprétation des variants affectant un seul acide aminé doit se baser sur plusieurs principes. Cette analyse est rendue encore plus délicate et fastidieuse par le fait que ces variants sont les plus nombreux (9000 par exome et par individu en moyenne).

1.8.4.1. La conservation inter-espèces

On considère qu'un acide aminé conservé au cours de l'évolution (ce dont témoigne sa présence dans des espèces éloignées sur le plan phylogénétique) est important pour la fonction de la protéine et ne peut être modifié sans conséquence fonctionnelle.

De nombreux scores de conservation existent comme Polyphen 2 (Adzhubei et al, 2010) et SIFT (Ng et Henikoff, 2003), permettant d'étudier un variant en prenant en compte la conservation inter espèces au sein des vertébrés. Plus récemment, le score CAROL a été publié combinant Polyphen-2 et SIFT (Lopes et al, 2012).

- Le score PolyPhen-2 : il est compris entre 0 et 1 ; 1 correspond à un variant très probablement pathogène. Le variant est classé en « benign », « possibly damaging », ou « probably damaging »
- Le score SIFT : une valeur inférieure à 0,05 (proche de 0) est prédite comme délétère. Si le score est supérieur à 0,05 la modification est prédite mineure.

L'étude d'espèces plus éloignées que les vertébrés peut être très utile car certains acides aminés peuvent être conservés chez l'ensemble des métazoaires, voire chez tous les eucaryotes et

parfois jusqu'aux bactéries. Cela donne un poids accru pour affirmer la pathogénicité de la mutation.

Cependant, il existe des mutations plus subtiles comme des mutations faux-sens non conservées ou des mutations silencieuses (modification du nucléotide sans changement de l'acide aminé) qui peuvent toucher la partie codante d'un site d'épissage, ou être responsables de la création de site d'épissage cryptique, ou toucher les sites « exonic splicing enhancers » (ESE) ou « exonic splicing silencers » (ESS).

1.8.4.2. Le changement d'acide aminé

Les acides aminés ont des propriétés physico-chimiques différentes et sont classés en acides aminés polaires, apolaires (hydrophobes), basiques, acides, aromatiques. Le remplacement d'un acide aminé entraîne un changement de propriété physico-chimique et parfois de conformation (proline...).

Le score Grantham est basé sur l'étude de ces modifications (Grantham, 1974). Cependant cette analyse souffre de beaucoup d'exceptions. La localisation de l'acide aminé dans la protéine paraît plus importante ; une modification d'un acide aminé dans un domaine fonctionnel en un autre acide aminé de la même classe peut être responsable d'une altération de la fonction protéique. C'est le cas de la mutation p.Ala304Val dans l'ataxie autosomique récessive de type 2 (ARCA2, déficit en coenzyme Q10, gène *ADCK3*). L'alanine et la valine sont deux petits acides aminés hydrophobes et sont souvent interchangeables dans les domaines protéiques ; le score de Grantham est faible pour ce changement. Toutefois, l'alanine est souvent classée parmi les très petits acides aminés polaires et son changement en valine peut dans certains cas être délétère.

1.8.4.3. Etude de populations témoins

Plusieurs études de populations ont permis de créer des bases de données de polymorphismes comme Exome Variant Server, Ensembl, 1000 genomes Project etc...

Ces analyses permettent de connaître la fréquence d'un variant au sein d'une population témoin. Si le variant est présent chez plusieurs témoins à l'état hétérozygote, il est peu probable qu'il s'agisse d'une mutation pathogène pour une maladie dominante.

Si le variant est présent chez plusieurs témoins à l'état homozygote, il est peu probable qu'il s'agisse d'une mutation pathogène pour une maladie récessive. Dans le cadre de l'étude d'ataxies récessives rares, la présence de plusieurs sujets sains hétérozygotes rend le variant peu probable. Par exemple, si 10 sujets sont hétérozygotes sur 1000 témoins ($= 1/100$), la prévalence de la maladie serait théoriquement de $1/40.000$, c'est-à-dire une maladie qui serait aussi fréquente que l'ataxie de Friedreich, ce qui est très peu probable.

Pour ces différentes raisons, les filtres permettant d'éliminer les polymorphismes les plus fréquents sont fixés avec un seuil de 1% ($1/100$), sachant que pour les maladies dominantes, on utilise plutôt un seuil de $1/10000$ (fréquence de la maladie de Huntington). Les maladies correspondant à des fréquences de mutation plus élevées sont des maladies multifactorielles avec pénétrance très incomplète (facteur de prédisposition) et doivent être analysées avec des stratégies différentes.

1.8.5. Mutations du promoteur ou de sites régulateurs de la transcription

Des mutations de promoteur ont rarement été mises en cause dans des maladies monogéniques (identifiées dans le syndrome TAR: thrombocytopénie et absence de radius) par Albers et al. en 2012), et ceci pour plusieurs raisons. La pathogénicité des mutations de promoteur est assez difficile à mettre en évidence, les mutations peuvent se situer à de très grandes distances des sites d'initiation de la transcription (boucles chromatinienne) et seraient plus souvent des facteurs de prédisposition que des mutations monogéniques. Dans le cas du syndrome TAR, il s'agit d'une situation très particulière où les polymorphismes régulateurs de la transcription ne sont pathologiques que s'ils sont associés en *trans* à une délétion totale du gène, leur présence à l'état homozygote n'étant (apparemment) pas associée à un phénotype (ou du moins pas au même phénotype) et les délétions homozygotes sont vraisemblablement non viables.

1.8.6. Mutations dans des gènes redondants et dans des pseudogènes

Lorsqu'une mutation est retrouvée dans un gène, il convient d'étudier le site d'expression du transcrit ou de la protéine correspondante en confirmant sa présence dans le système nerveux central (ubiquitaire le plus souvent ou tissus spécifique) dans des bases de données (site Uniprot.org par exemple) et son rôle s'il est connu. Les variants dans des pseudogènes, dans des exons minoritaires ou dans des familles de gènes redondants (par exemple les récepteurs olfactifs) doivent être éliminés.

1.8.7. Recherche de polymorphismes rares privés

L'exclusion des différents variants par leur présence dans des bases de données de polymorphismes permet de faire la majorité du tri. Il est souvent nécessaire de réaliser un

séquençage de sujets témoins de l'origine ethnique du patient pour s'assurer qu'il ne s'agisse pas d'un polymorphisme rare local. Les bases de données comme Exome Variant Server se basent principalement sur des populations témoins caucasiennes et afro-américaines : ces bases de données pourraient manquer d'exhaustivité pour des populations du Maghreb, du Moyen Orient ou pour des populations asiatiques.

1.8.8. Etude de ségrégation des variants

Pour les maladies récessives, l'étude des parents permet de confirmer la présence d'une mutation sur chaque chromosome parental, confirmant la position en *trans* des mutations. Il faut également vérifier la présence de mutations retrouvées chez le cas index chez les autres apparentés atteints. Le test dans la fratrie des sujets sains reste plus discutable et nécessite un conseil génétique. La présence des deux variants chez un frère ou une sœur sain, plus âgé que le cas index, exclut a priori la pathogénicité des variants.

Pour les maladies dominantes, l'étude des parents permet de confirmer que la mutation provient bien du parent également malade. Si aucun des deux parents n'est malade de la même affection, la démonstration d'une mutation *de novo* (absence chez les deux parents) est en général démonstrative de la pathogénicité de la mutation. Ceci est surtout vrai pour les maladies à début précoce. En effet, pour les maladies à début tardif, la transmission de la mutation par un parent non malade (absence de néomutation) pose un problème majeur et nécessite un conseil génétique préalable indispensable. Dans ces cas, l'interprétation va osciller entre les extrêmes : absence de pathogénicité, mutation à expressivité variable et pénétrance incomplète, et le conseil génétique est particulièrement délicat.

1.8.9. Synthèse après exclusion des variants présumés non pathogènes

Après avoir utilisé ces différents filtres, un ou plusieurs variants non connus peuvent être considérés comme potentiellement pathogènes. Pour confirmer le caractère pathogène du variant, des études fonctionnelles doivent être, si possible, réalisées (mesure des métabolites/ marqueurs biochimiques perturbés dans la maladie, et dans un cadre de recherche, mesure de l'activité catalytique, perte d'interaction protéique, perturbation de la localisation intracellulaire...).

2. Résultats

Dans une première partie, je présenterai les résultats obtenus par séquençage de l'exome de deux grandes familles consanguines, aboutissant à la découverte d'un nouveau gène responsable d'un tableau clinique associant ataxie cérébelleuse précoce, épilepsie et retard mental, et plus ou moins une spasticité. Ce gène, *WWOX*, était connu depuis de nombreuses années comme étant un suppresseur de tumeur potentiel, et il est probable que nos travaux remettent en cause les résultats de ces nombreux travaux antérieurs.

Dans une deuxième partie, je présenterai les résultats concernant l'identification de nouvelles mutations dans le gène *FA2H* responsable d'ataxie spastique.

Dans une troisième partie, je développerai les résultats obtenus à partir d'une cohorte de 155 patients ayant bénéficié d'un séquençage haut débit d'un panel de 57 gènes d'ataxie. Cela a permis d'une part l'identification de nouveaux patients avec de nouvelles mutations dans les gènes *ANO10* et *SYNE1*. D'autre part, l'étude des cas sporadiques et récessifs a permis d'étudier et de valider l'algorithme diagnostique proposé par Anheim et al, 2012 dans un article revue publié dans le *New England Journal of Medicine*.

2.1. Identification d'un nouveau gène d'ataxie cérébelleuse avec retard mental et épilepsie

2.1.1. Manuscrit 1 :

Mallaret M, Synofzik M, Lee J, Sagum CA, Mahajnah M, Sharkia R, Drouot N, Renaud M, Klein FA, Anheim M, Tranchant C, Mignot C, Mandel JL, Bedford M, Bauer P, Salih MA, Schüle R, Schöls L, Aldaz CM, Koenig M. The tumour suppressor gene WWOX is mutated in autosomal recessive cerebellar ataxia with epilepsy and mental retardation. *Brain*. 2014 Feb;137(Pt 2):411-9.

The tumor suppressor gene *WWOX* is mutated in autosomal recessive cerebellar ataxia with epilepsy and mental retardation

Martial Mallaret^{1,2*}, Matthis Synofzik^{3, 4*}, Jaeho Lee⁵, Cari A. Sagum⁵, Muhammad Mahajnah^{6,7}, Rajech Sharkia⁸, Nathalie Drouot², Mathilde Renaud^{1,2}, Fabrice A.C. Klein², Mathieu Anheim^{1,2}, Christine Tranchant^{1,2}, Cyril Mignot⁹, Jean-Louis Mandel^{2,10}, Mark Bedford⁵, Peter Bauer¹¹, Mustafa A. Salih¹², Rebecca Schüle^{3,4,13}, Ludger Schöls^{3,4}, C. Marcelo Aldaz⁵, Michel Koenig^{2,10,14}

1: Department of Neurology, Hôpital de Hautepierre, Strasbourg, France

2: Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), INSERM-U964/CNRS-UMR7104/Université de Strasbourg, Collège de France, 67404 Illkirch, France

3: Department of Neurodegenerative Diseases and Hertie-Institute for Clinical Brain Research, University of Tübingen, Germany

4: German Research Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Tübingen, Germany

5: Department of Molecular Carcinogenesis, University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Smithville, TX, USA

6 : Pediatric Neurology and Child Developmental Center, Hillel Yaffe Medical Center, Hadera 38100, Israel

7 : Rappaport Faculty of Medicine, The Technion, Haifa 31096, Israel

8 : The Triangle Regional Research and Development Center, P. O. Box-2167, Kfar Qari'-30075, Israel; Beit-Berl Academic College, Beit-Berl 44905, Israel

9: APHP, Groupe Hospitalier Pitié Salpêtrière, Unité Fonctionnelle de Génétique Médicale, Paris, France

10 : Laboratoire de Diagnostic Génétique, Nouvel Hôpital Civil, 67091 Strasbourg, France

11 : Institute of Medical Genetics and Applied Genomics, University of Tübingen, Germany

12 : Division of Pediatric Neurology, Department of Pediatrics, College of Medicine, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia

13 : Dr. John T. Macdonald Foundation Department of Human Genetics and John P. Hussman
Institute for Human Genomics, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, FL
33136, USA

14 : INSERM UMR_S 827, Laboratoire de Génétique Moléculaire, CHU de Montpellier, and
Université de Montpellier 1, UFR de Médecine, 34000 Montpellier, France

*Authors contributed equally

Correspondence to: Dr Michel Koenig

INSERM UMR_S 827, Institut Universitaire de Recherche Clinique

641 Avenue du Doyen Gaston Giraud, 34093 Montpellier cedex5, France (present address).

E-mail : michel.koenig@inserm.fr

Abstract

We previously localized a new form of recessive ataxia with generalized tonic-clonic epilepsy and mental retardation to a 19 megabases interval in 16q21-q23 by homozygosity mapping of a large consanguineous Saudi Arabia family. We now report the identification by whole exome sequencing of the missense mutation changing proline 47 into threonine in the first WW domain of the WW domain containing oxidoreductase gene, *WWOX*, located in the linkage interval. Proline 47 is a highly conserved residue that is part of the WW motif consensus sequence and is part of the hydrophobic core that stabilizes the WW fold. We demonstrate that proline 47 is a key amino-acid essential for maintaining the *WWOX* protein fully functional, with its mutation into a threonine resulting in a loss of peptide interaction for the first WW domain. We also identified another highly conserved homozygous *WWOX* mutation changing glycine 372 to arginine in a second consanguineous family. The phenotype closely resembled the index family, presenting with generalized tonic-clonic epilepsy, mental retardation and ataxia, but also included prominent upper motor neuron disease. Moreover, we observed that the short lived *Wwox* knock out mice display spontaneous and audiogenic seizures, a phenotype previously observed in the spontaneous *Wwox* mutant rat presenting with ataxia and epilepsy (Suzuki et al., 2007 and Suzuki et al., 2009), indicating that homozygous *WWOX* mutations in different species causes cerebellar ataxia associated with epilepsy.

Key words: ataxia, tonic-clonic epilepsy, *WWOX*, WW domain, hereditary spastic paraplegia.

Introduction

Autosomal recessive cerebellar ataxias are a clinically and genetically heterogeneous group of inherited neurodegenerative disorders that affect the cerebellum, the spinocerebellar long tracts and often the peripheral nerves. Recessive ataxias may present as a pure cerebellar syndrome or are associated with neurological symptoms such as peripheral neuropathy, cognitive impairment, optic atrophy, hearing loss, seizures or extra neurological symptoms such as cardiomyopathy and diabetes mellitus in Friedreich ataxia (MIM# 229300)(Anheim *et al.*, 2012). Main clinical features are uncoordinated gait with frequent falls, upper limb coordination problems, impairment of speech, swallowing and eye movements.

Recessive ataxias associated with myoclonus, epilepsy and cognitive deterioration are classified within the progressive myoclonic epilepsies, and include Unverricht-Lundborg disease, Lafora disease, neuronal ceroid lipofuscinoses, sialidoses, action myoclonus-renal failure syndrome and Gaucher disease, suggesting a global central nervous system involvement. Mitochondrial inheritance in myoclonic epilepsy with ragged red fibres (MERRF, MIM #545000) or autosomal dominant inheritance in dentate-rubro-pallido-luysian atrophy (DRPLA, MIM# 125370) may also be responsible for a progressive myoclonic epilepsy phenotype. Other recessive ataxias with a frequent occurrence of seizures, such as infantile onset spino-cerebellar ataxia (IOSCA, MIM# 271245) or recessive ataxia with coenzyme Q10 deficiency (ARCA2, MIM# 612016) are usually excluded from the group of progressive myoclonic epilepsies.

We reported a new form of childhood onset autosomal recessive cerebellar ataxia with generalized tonic-clonic epilepsy and mental retardation in a large consanguineous family from Saudi Arabia with four affected children (Gribaa *et al.*, 2007, SCAR12, MIM#614322). MRI of one patient revealed posterior white matter hyperintensities, whereas muscle biopsy showed

vacuolization of the sarco-tubular system. The gene was localized by homozygosity mapping to a 19 megabases interval in 16q21-q23 between markers D16S3091 and D16S3050. We report here the identification by whole exome sequencing of a homozygous missense mutation in the WW oxido-reductase gene (*WWOX*, MIM# 605131) located in the linkage interval. It affects the first WW domain of the mutant protein, which interacts with other proteins by specific binding with proline-proline-X-tyrosine motifs (Ludes-Meyers *et al.*, 2004). The causative involvement of the mutation was confirmed by functional analysis of the mutant domain and phenotypic studies of conditional KO murine model, and secondarily strengthened by a second homozygous missense mutation in a consanguineous Israeli Palestinian family with the same phenotypic key features.

Methods

Genetic studies

To obtain patient's DNA and primary fibroblasts, written informed consents were obtained, as defined by the Local Ethical Committee of the College of Medicine, King Saud University, Riyadh. Whole exome sequencing was performed by DNAVision SA (Charleroi, Belgium) by exon capture with the Agilent Sureselect kit and high throughput sequencing with an Illumina HiSeq2000 sequencer. Approximately 102 million reads were obtained and mapped to the human reference genome (hg18). The median depth of reads over exons was 48.7 with 77.3% of total exons covered by ten reads or more. Exon coverage with at least one sequence was 97.6%. dbSNP 130 served as a reference to exclude known single nucleotide polymorphisms (SNP), with additional search in Ensembl, NCBI and exome variant server (NHLBI GO Exome Sequencing Project) SNP databases when a variant was unknown. A second family was identified by whole exome sequencing performed on the same sequencer model and with the same kit, but analyzed with help of the GENomes Management Application (GEM.app)

(Gonzalez *et al.*, 2013). Search for mutations in genes known to be responsible for neurological phenotype including recessive cerebellar ataxia was performed and no mutation was found. Genomic DNA of 189 patients from 182 families with sporadic or recessive ataxias was screened by direct sequencing of the protein coding exons of *WWOX* (nine coding exons and an alternative exon 6).

WW domain three-dimensional modeling and western blot analysis

Protein sequence conservation was studied with the PipeAlign online software (<http://bips.u-strasbg.fr/PipeAlign>). Three-dimensional homology models of WW domains were generated with the online swissmodel software (<http://swissmodel.expasy.org>; Arnold *et al.*, 2007), based on sequence alignment with the closest WW homologues found in the protein database (pdb), which were used as reference. Homology models and NMR model of WW domains were then superimposed using PyMol (<http://pymol.org>). Western blot analysis was performed with polyclonal IgG antibodies directed against the 19 first aminoacids of *WWOX* (Santa Cruz biotechnology, dilution 1:500). Human skin fibroblasts were cultured from a skin biopsy from patient II-3 and from four different controls in Dulbecco Modified Eagle's medium with glucose 1g/l, 10% fetal calf serum and gentamicine, at 37°C with 5% CO₂.

Construction of wild type and mutant WW domain fusion proteins and peptide pull-down assays.

To study *WWOX* protein-protein interaction *in vitro*, we used synthetic constructs with Glutathione-S-Transferase (GST) tags for affinity purification. GST fusion proteins containing *WWOX* 1st and 2nd WW domains (*WWOX*1-2), and only the first WW domain (*WWOX*1) were constructed by insertion of PCR amplified fragments of the *WWOX* cDNA into the BamH1 and EcoR1 sites of the bacterial expression vector pGEX-2TK (Pharmacia). The resulting fusion

proteins contain the WWOX amino acids 16 to 94 (GST-WWOX1-2) and amino acids 16 to 53 (GST-WWOX1) as previously described (Ludes-Meyers *et al.*, 2004).

Site-directed mutagenesis was performed using the GeneArt Site-Directed Mutagenesis PLUS kit (Invitrogen). The target for mutation was p.Pro47Thr (c.139C>A) in the first WW domain of fusion proteins WWOX1-2 and WWOX1. All sequences were verified by DNA sequencing.

GST fusion proteins were purified from bacterial lysates through the use of glutathione sepharose beads (GE Healthcare). *In vitro* peptide pull-down assays were conducted by overnight pre-binding of 15 µg of the biotinylated WBP1 peptide (SGSGGTPPPPYTVG) with 1 µg of GST fusion protein in 500 µl of 1x binding buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% NP-40, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 15 mM MgCl₂) and rocking at 4°C. After pre-washing with binding buffer, 25 µl of streptavidin agarose beads (Millipore) were incubated with the peptide-protein mix and rocked for 1 h at 4°C. Agarose beads were then washed three times with binding buffer. 30 µl of 2x protein loading buffer was added to the agarose beads and boiled. Protein separation was performed by SDS-PAGE and analyzed by western blot using a rabbit anti GST-specific primary antibody developed in M.B. lab (Espejo *et al.*, 2002; 1:2000 dilution).

Animal Experiments

All animal research was conducted in facilities accredited by the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International at the University of Texas, M.D. Anderson Cancer Center, Science Park, following international guidelines and all research was specifically approved by the University of Texas M. D. Anderson Cancer Center Institutional Animal Care and Use Committee (Animal Welfare Assurance Number A3343-01).

For the generation of *Wwox* KO mice, we crossed male *Wwox*^{fl^{ox}/fl^{ox}} mice (129SV/C57Bl/6 background) (Ludes-Meyers *et al.*, 2009) with female BK5-Cre mice (129SV/C57Bl/6 background). Cre recombinase in these females is activated in oocytes with Cre protein persisting in the embryo leading to constitutive recombination and producing full KO progeny (Ramirez *et al.*, 2004).

Wwox KO mice and WT counterparts (16-20 days of age) were exposed to sound stimulation while in conventional polycarbonate cages. Exposure to digital 11 and 14 KHz tones (5-10 minutes exposure) was conducted using speakers adjacent to three sides of the cages. Mice behavior was monitored and recorded using a video camera.

Results

Mutation analysis of Family 1

Exome sequencing of individual II-1 revealed eleven unknown homozygous variations in the linkage region. Three coding variants appeared to be present in more recent SNP databases as dbSNP132 (rs74344827, rs76382044, rs77067228). Seven variants were intronic. Three of the intronic variants were subsequently found in an update of Ensembl SNP database (rs117678211, rs74647029 and rs74980679). The fourth intronic variant, in the gene encoding for the carboxyl esterase 3 (CES3) protein (position chr16: 65564056C>A), was not present in Ensembl but was present in Exome Variant Server (EVS) with a frequency of 34 A alleles for 10724 C alleles. The fifth intronic variant, in the gene encoding for the splicing factor 3b subunit 3 (SF3B3) protein (position chr16: 69155457), is located in the donor splice site of exon 18 (+3; A>G) and was also found in EVS at a low frequency (3 A alleles for 10755 G alleles). The last two intronic variants, in the genes encoding for the neurexin CASPR4 (position chr16:75126896A>G) and for the carboxyl esterase 4A (CES4A) protein (position chr16: 65596532C>T), respectively, were present neither in Ensembl nor in EVS. None of the intronic variants are likely pathogenic since

they are not predicted by the SplicePort program to affect the adjacent splice sites or to activate cryptic splice sites.

The only unknown variant affecting a coding sequence (position chr16: 76699852 C>A [hg18], 99 reads coverage) was located in the gene encoding for WWOX, a protein with two WW domains and an oxidoreductase domain. As expected, the mutation (c.139C>A, exon 2) is homozygous in the patient and segregates with the disease (Figure 1). The mutation affects the first WW domain (WW1) of WWOX (p.Pro47Thr) and is causing a radical change from a hydrophobic amino-acid, proline, to a polar one, threonine. The mutated proline is conserved in all metazoans (including distant ones such as *Trichoplax* and sea anemone, Figure 1) which are the only species having a WWOX homologue (i.e. a protein with WW and oxidoreductase domains). Moreover, this highly conserved proline 47 is the last amino-acid of the WW motif consensus and is one of the few aromatic residues (together with tryptophane 22 and tyrosine 34) that build up the hydrophobic core of WW domains (Macias *et al.*, 1996; Petrovich *et al.*, 2006).

Three-dimensional modeling of the first WW domain

We modeled the structure of the WW1 domain of WWOX according to the structure of its closest homologue rNEDD4 WWIII (pdb code 1I5H) and compared it to the WW structures of transcription elongation regulator 1/TCERG1 (previously known as FBP28, pdb code 1E0L) and polyglutamine binding protein 1/PQBP1 (modeled according to the structure of PIN1, pdb code 3KAB.pdb) for which mutation of the equivalent proline or of the equivalent interacting tyrosine within the core, respectively, are known to dramatically destabilize the fold (Petrovich *et al.*, 2006; Tapia *et al.*, 2010). The position of WWOX proline 47 and tyrosine 34 precisely match the position of TCERG1 and PQBP1 equivalents, which are direct hydrophobic core

neighbors and are crucial for proper folding of the WW domain (Figure 2). Thus, the change of proline 47 into a threonine most likely destabilizes the WW1 domain.

Interaction studies of the mutant WW domain

In order to test this hypothesis, we constructed GST-WWOX fusion proteins containing the first WW domain (WWOX1) as well as both WW domains (WWOX1-2). We generated both wild type and mutant versions (p.Pro47Thr (c.139C>A)) of these fusion proteins. As previously demonstrated, the first WW domain of WWOX represents a typical Group I WW domain with predilection for binding proline-proline-X-tyrosine motifs, where X stands for any amino-acid, while no ligand was identified for the second WW domain (Ludes-Meyers *et al.*, 2004). We performed peptide pull down assays using as ligand a biotinylated oligopeptide from the WW domain-binding protein 1 (WBP1), a typical WW group I binder, containing a proline-proline-proline-tyrosine motif (PPPY). As can be observed in Figure 3, the wild type WWOX1 and WWOX1-2 fusion proteins were successfully pulled down while the p.Pro47Thr mutant versions failed to interact with the PPPY containing oligopeptide.

The high conservation of the proline 47 residue and the above experiments demonstrate the crucial role of this residue in WW domains, indicating that the observed mutation likely plays a key structural role leading to unfolding and dysfunction of WWOX1. This evidence suggest that p.Pro47Thr is the disease causing mutation in the ataxia/epilepsy family from Saudi Arabia.

Furthermore, western blot analysis from patient fibroblasts showed a similar level of WWOX protein compared to 4 different controls (Figure 2) suggesting that the mutation does not alter global protein levels. Globally unchanged protein levels were also reported for the equivalent Tyr34 mutation of polyglutamine tract binding-protein 1 (PQBP1) involved in X-linked mental retardation disorders like Golabi-Ito-Hall syndrome, showing that a disease

causing mutation that affects the fold and the function of a WW domain does not necessarily result in enhanced mutant protein degradation (Tapia *et al.*, 2010).

Mutation analysis of Family 2

After the identification and characterization of the first disease-associated WWOX mutation, a second mutation was identified by exome sequencing of a consanguineous Palestinian family. The two patients from this Israeli Palestinian family carried a highly conserved homozygous WWOX mutation (p.Gly372Arg; c.1114G>C in exon 9) (for conservation data and pedigree, see Figure 1) which was not observed in dbSNP 137 or in the NHLBI 6500 exome variant server. The homozygous variant segregated with disease in the affected siblings and testing of the parents demonstrated localization in *trans*. The phenotype in this second family closely resembled the index family: both affected siblings showed an early disease onset in the first two years of life with generalized tonic-clonic epilepsy, mental retardation, and ataxia. In addition, prominent upper motor neuron affection with leg spasticity and positive bilateral extensor plantar response was present, thus resembling spastic ataxia or complicated hereditary spastic paraplegia. The mutated glycine 372 is located in the C-terminal part of the dehydrogenase/reductase domain of WWOX. The closest homologue of this domain with known three-dimensional structure is 3RD5, a bacterial small dehydrogenase/reductase (pdb code 3RD5). Moderate conservation of the amino-acid sequence between the human and bacterial homologues prevented reliable modeling of the sequence surrounding glycine 372 of WWOX. The extensive screening of WWOX in 189 unrelated ataxic patients with no molecular diagnosis (7 patients with childhood onset ataxia associated with epilepsy, 67 patients with onset of ataxia before 3 years, and 135 patients with onset of ataxia before 20 years) revealed no additional mutation.

Conditionnal KO mouse model

Since it appears that ataxia/epilepsy associated with *WWOX* mutation is very rare in humans, we sought to confirm the involvement of *WWOX* in neurodegeneration from the study of our mice *Wwox* KO model (Ludes-Meyers *et al.*, 2009). These KO mice are characterized by a short lifespan of only 3 to 4 weeks maximum (Aqeilan *et al.*, 2008, Ludes-Meyers *et al.*, 2009). Interestingly, we observed that the *Wwox* KO mice start having a few spontaneous seizures at about two weeks of age. In order to investigate susceptibility to epilepsy, 16 days old KO mice were exposed to sustained sound (11-14 KHz tone) for 5-10 minutes. A few KO mice (3 out of 8) presented with audiogenic tonic-clonic seizures in the first minutes after sound exposure. Seizures begun with wild running and jumping, then progressed to tonic contraction of limbs and tail and often presented with limb clonic movements, followed by lethargy. At 20 days, the 4 surviving mice were exposed to a 14 KHz tone. All KO mice presented at different times with seizures, consisting as before of wild running followed by tonic contractions and clonic movements, and had uncontrolled sphincter relaxation (Figure 4 and video #1 in supplementary material). At the end of seizures, the mice presented with lethargy. Other stimuli such as animal handling also induced seizures on some occasions. At this point, all KO mice presented with balance disturbances when challenged to walk on the edge of the cage but they showed no pathological clasping reflexes. They eventually died before 4 weeks of age from failure to thrive. No WT mice of matched age and background (n= 8) presented with seizures upon 11 or 14 KHz sound exposure.

Discussion

We describe the first germline mutations in *WWOX* causing a recessive form of early onset neurodegenerative disease in man including epilepsy, mental retardation, cerebellar ataxia, and -

at least in the second family - prominent spasticity. *WWOX* has been identified in 2000 (Bednarek *et al.*, 2000) and codes for a 414 amino acid protein containing two WW domains and a short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) domain (suggesting a role in steroid metabolism). *WWOX* is a ubiquitous protein with high expression in prostate, gonads, breast, lung, endocrine tissues, cerebellum and brain (Nunez *et al.*, 2006; Aqeilan *et al.*, 2007b). *Wwox* is expressed in mouse developing nervous system including cerebral cortex and cerebellum from day 12-14 in utero to adulthood (Chen *et al.*, 2004). We demonstrate that the *WWOX* mutation, p.Pro47Thr, which could be modelled by our *in silico* model, renders *WWOX* unable to bind protein partners via the WW1 domain, and that the complete loss of function of *WWOX* in mice results in epilepsy and balance disturbances, phenotypes reminiscent of the clinical presentation of all our affected patients with *WWOX* mutations.. The *Wwox* KO mice show a progressive susceptibility to spontaneous and audiogenic tonic clonic epilepsy, suggesting a neurodegenerative process. However, the severe condition and early death of the *Wwox* KO mice prevented us from testing whether the balance problems were directly related to cerebellar dysfunction or not. Interestingly, a spontaneous rat mutation of *Wwox*, *lde* (lethal dwarfism and epilepsy) results in a condition very similar to the presentation of the mutant *WWOX* patients and the *Wwox* KO mice, since homozygous *lde* rats present with ataxic gait and audiogenic seizures (Suzuki *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2009). The *lde* mutation is a 13 bp deletion in exon 9 leading to a frameshift of the last 44 codons of *Wwox* and replacement with a novel open reading frame of 54 codons. Mutated *WWOX* is not detected in Western blots of *lde* rat tissues. The milder presentation of the human disease compared to the mouse and rat models is presumably due to a partial loss of function mutation since the mutant p.Pro47Thr *WWOX* protein is still present, at least in human skin fibroblasts, and the dehydrogenase/reductase domain of the mutant protein is presumably still

functional in family 1 and partially functional in family 2, unlike the dehydrogenase/reductase domain of the WWOX mouse and rat models. Homozygous complete loss of function of WWOX in man may also cause early death or embryonic lethality, suggesting that WWOX related ataxia cases are rare, in line with our failure to identify additional WWOX mutation in a large cohort of ataxia patients.

WWOX is a cytoplasmic protein that participates in a number of cellular processes including growth, differentiation, and tumor suppression. WWOX somatic mutations, including homozygous deletions, have been involved in different human cancers cell types (Paige, 2001). WW domains are protein-protein interaction domains that recognize proline-rich sequences. Numerous interactors of the WW1 domain of WWOX have been identified, including p73, RUNX2, ERBB4, Dvl2, SIMPLE/LITAF among others (Aqeilan *et al.*, 2007a). Alteration of WW1 is responsible for a loss of interaction with Dvl2 (Bouteille *et al.*, 2009). Direct mutagenesis of amino-acid 44 to 47 of the WW1 domain of WWOX leads to a loss of interaction with SIMPLE/LITAF (Ludes-Meyers *et al.*, 2004), a protein mutated in a dominant form of Charcot-Marie-Tooth disease, CMT1C (Street *et al.*, 2003).. Heterozygous deletion of exons 6 to 8 (amino-acids 173 to 352 of WWOX) has recently been described in a single patient with ambiguous genitalia having a 46,XY disorder of sex development (White *et al.*, 2012). The deletion is not causing a frame-shift but leads to a smaller protein missing part of the SDR domain. It is possible that the heterozygous deletion of exons 6 to 8 of WWOX is co-incidental in the patient with ambiguous genitalia, since no such phenotype is present in heterozygous animal models or in the parents and carrier siblings of the Saudi or Palestinian patients. Future research should investigate the presence of WWOX variants in epilepsy, mental retardation, and/or complicated hereditary spastic paraplegia (cHSP) patients, as the phenotype of our affected

subjects indicates that these might also be presenting features of *WWOX* patients. Analysis of larger pediatric cohorts of early onset ataxia and/or generalized epilepsy and mental retardation should allow to evaluate the prevalence of *WWOX* mutations and to perform genotype-phenotype correlation studies.

Disease mechanisms resulting from *WWOX* mutations are difficult to infer because the *WWOX* protein has numerous functions and protein partners. Moreover, the potential substrates of the *WWOX* dehydrogenase domain are not known. *WWOX* has been described as a tumor suppressor gene. Interestingly, neither the patients (current age ranging from 17 to 26 years in family 1, and 5 and 10 years in family 2) nor the heterozygous carriers presented with tumor development, but we cannot exclude that the patients may present an increased risk of developing cancer at a later stage. Further studies are needed to establish the full spectrum of diseases resulting from *WWOX* alterations.

Acknowledgements

We are grateful to Dr Stephan Züchner and Mike Gonzalez, John P. Hussman Institute for Human Genomics University of Miami Miller School of Medicine, for the use of GENomes Management Application (GEM.app), a comprehensive web-based tool for analyzing next generation sequencing data.

Funding

This study was supported by funds from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Agence Nationale pour la Recherche-Maladies Rares and Maladies Neurologiques et Psychiatriques

(ANR-09-MNPS-001-01 to M.K.), the ANR/E-rare JTC 2011 “Euro-SCAR” (2011-RARE-004-01 to M.K. and 01GM1206 to L.S.), the National Institutes of Health/National Cancer Institute (grant number R01 CA102444-6 to C.M.A.), the Deanship of Scientific Research at King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia (through Research Group no. RGP-VPP-301, to MAS), the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SCHO754/5-1 to L.S.), the European Union grant (PIOF-GA-2012-326681 HSP/CMT genetics) to RS, and the University of Tübingen (IZKF grant 1970-0-0 to R.S.). M.M. was supported by a fellowship from the “Journées de Neurologie de Langue Française”.

Web ressources

UCSC Genome Browser: <http://genome.ucsc.edu/index.html>

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

Exome Variant Server (EVS), NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA:

<http://evs.gs.washington.edu/EVS> [June, 2013]

SplicePort software: <http://spliceport.cbcb.umd.edu>

PipeAlign software: <http://bips.u-strasbg.fr/pipealign>

Swiss-Model Workspace: <http://swissmodel.expasy.org>

PyMol software: <http://pymol.org>

References

Anheim M, Tranchant C, Koenig M. The autosomal recessive cerebellar ataxias. *N Engl J Med* 2012; 366: 636-46.

Aqeilan RI, Croce CM. WWOX in biological control and tumorigenesis. *J Cell Physiol* 2007; 212: 307-10. Aqeilan RI, Trapasso F, Hussain S, Costinean S, Marshall D, Pekarsky Y et al. Targeted deletion of Wwox reveals a tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 3949-54.

Aqeilan RI, Hassan MQ, de Bruin A, Hagan JP, Volinia S, Palumbo T et al. The WWOX tumor suppressor is essential for postnatal survival and normal bone metabolism. *J Biol Chem* 2008; 283: 21629-39.

Arnold K, Bordoli L, Kopp J, and Schwede T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics* 2006; 22: 195-201.

Bednarek AK, Laflin KJ, Daniel RL, Liao Q, Hawkins KA, Aldaz CM. WWOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23.3 -24.1, a region frequently affected in breast cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 2140-5.

Bouteille N, Driouch K, Hage PE, Sin S, Formstecher E, Camonis J et al. Inhibition of the Wnt/beta-catenin pathway by the WWOX tumor suppressor protein. *Oncogene* 2009; 28: 2569-80.

Chen ST, Chuang JI, Wang JP, Tsai MS, Li H, Chang NS. Expression of WW domain-containing oxidoreductase WOX1 in the developing murine nervous system. *Neurosci* 2004; 124: 831-9.

Espejo A, Côté J, Bednarek A, Richard S, Bedford MT. A protein-domain microarray identifies novel protein-protein interactions. *Biochem J* 2002; 367: 697-702.

Gonzalez MA, Lebrigio RF, Van Booven D, Ulloa RH, Powell E, Speziani F et al. GENomes Management Application (GEM.app): a new software tool for large-scale collaborative genome analysis. *Hum Mutat* 2013; 34: 842-6.

Gribaa M, Salih M, Anheim M, Lagier-Tourenne C, H'mida D, Drouot N et al. A new form of childhood onset, autosomal recessive spinocerebellar ataxia and epilepsy is localized at 16q21-q23. *Brain* 2007; 130: 1921-8.

Ludes-Meyers JH, Kil H, Bednarek AK, Drake J, Bedford MT, Aldaz CM. WWOX binds the specific proline-rich ligand PPXY: identification of candidate interacting proteins. *Oncogene* 2004; 23: 5049-55.

Ludes-Meyers JH, Kil H, Parker-Thornburg J, Kusevitt DF, Bedford MT, Aldaz CM. Generation and characterization of mice carrying a conditional allele of the *Wwox* tumor suppressor gene. *PLoS One* 2009; 4: e7775.

Macias MJ, Gervais V, Civera C, Oschkinat H. Structural analysis of WW domains and design of a WW prototype. *Nat Struct Biol* 2000; 7: 375-9.

Macias MJ, Hyvönen M, Baraldi E, Schultz J, Sudol M, Saraste M, et al. Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide. *Nature* 1996;382:646-9.

Nunez MI, Ludes-Meyers J, Aldaz CM. WWOX protein expression in normal human tissues. *J Mol Histol* 2006; 37: 115-25.

Paige AJ, Taylor KJ, Taylor C, Hillier SG, Farrington S, Scott D et al. WWOX: a candidate tumor suppressor gene involved in multiple tumor types. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 11417-22.

Petrovich M, Jonsson AL, Ferguson N, Daggett V, Fersht AR. Phi-analysis at the experimental limits: mechanism of beta-hairpin formation. *J Mol Biol* 2006; 360: 865-81.

Ramirez A, Page A, Gandarillas A, Zanet J, Pibre S, Vidal M et al. A keratin K5-Cre transgenic line appropriate for tissue-specific or generalized Cre-mediated recombination. *Genesis* 2004; 39: 52-7.

Street VA, Bennett CL, Goldy JD, Shirk AJ, Kleopa KA, Tempel BL et al. Mutation of a putative protein degradation gene LITAF/SIMPLE in Charcot-Marie-Tooth disease 1C. *Neurology* 2003; 60: 22-6.

Suzuki H, Takenaka M, Suzuki K. Phenotypic characterization of spontaneously mutated rats showing lethal dwarfism and epilepsy. *Comp Med* 2007; 57: 360-9.

Suzuki H, Katayama K, Takenaka M, Amakasu K, Saito K, Suzuki K. A spontaneous mutation of the *Wwox* gene and audiogenic seizures in rats with lethal dwarfism and epilepsy. *Genes Brain Behav* 2009; 8: 650-60.

Tapia VE, Nicolaescu E, McDonald CB, Musi V, Oka T, Inayoshi Y, et al. Y65C missense mutation in the WW domain of the Golabi-Ito-Hall syndrome protein PQBP1 affects its binding activity and deregulates pre-mRNA splicing. *J Biol Chem* 2010; 285: 19391-401.

White S, Hewitt J, Turbitt E, van der Zwan Y, Hersmus R, Drop S et al. A multi-exon deletion within *WWOX* is associated with a 46,XY disorder of sex development. *Eur J Hum Genet* 2012; 20: 348-51.

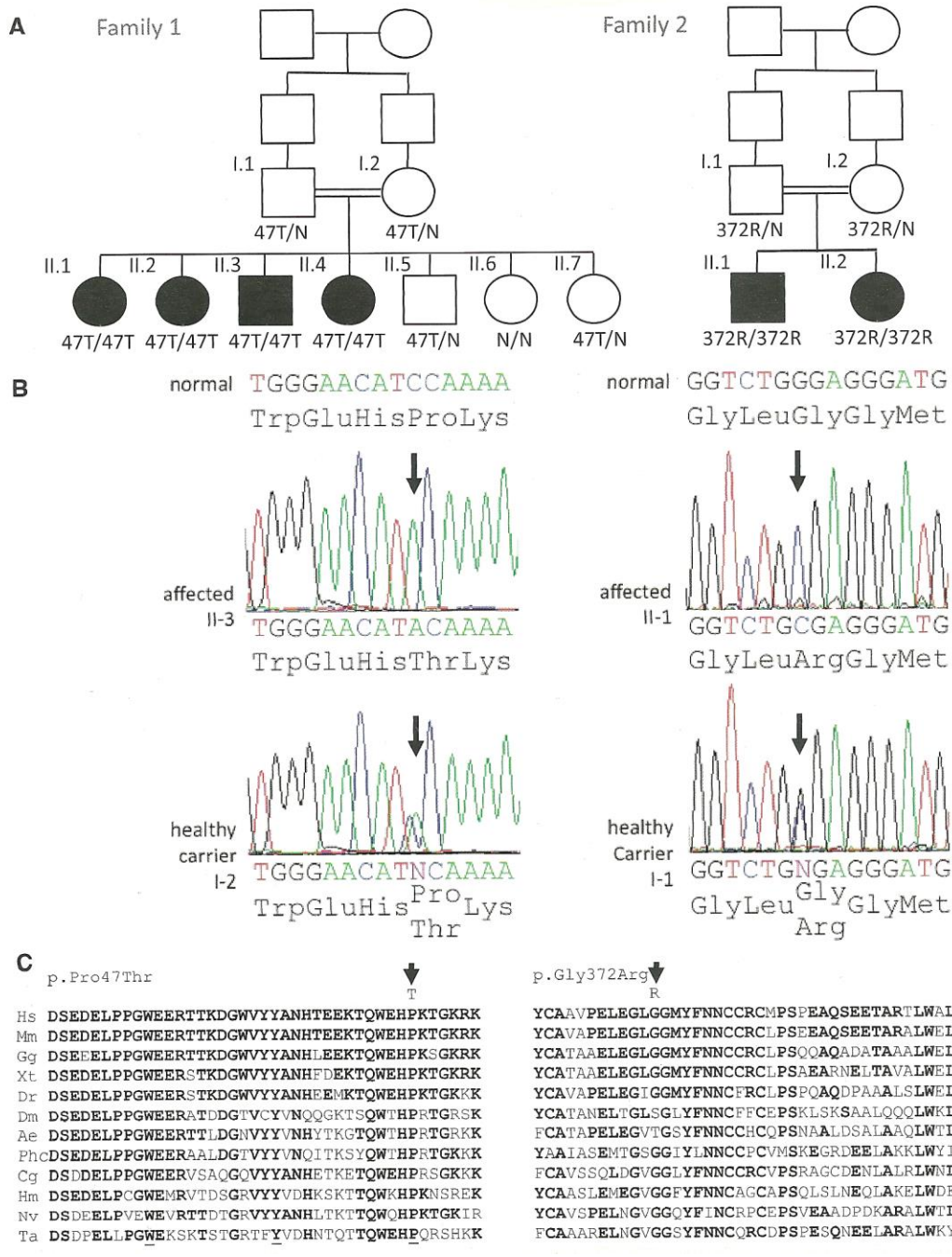


Figure 1: Identification of WWOX mutations in the Saudi and Israeli Palestinian families.

(A) Family trees showing consanguinity and segregation of the disease with mutations c.139C>A, causing the p.Pro47Thr missense change (47T) and c.1114G>C causing the p.Gly372Arg missense change (372R).

(B) Sanger sequencing of the mutations c.139C>A and c.1114G>C: index patients are homozygous for the substitution and carrier relatives (mother I-2 in family 1 and father I-1 in family 2) are heterozygous for the same substitution.

(C) Sequence comparison of the WW1 domain (left) and of the C-terminal part of the dehydrogenase/reductase domain (right) of WWOX from different species. Amino acids that are identical to the human sequence are shown in bold. The highly conserved aromatic residues that are part of the hydrophobic core of the WW1 domain are underlined. The mutant amino acids (threonine, T, and arginine, R), on top of the mutated amino acids (proline, P, and Glycine, G, respectively), are indicated by an arrow. The mutated amino acids are conserved in all metazoan species analyzed, except glycine 372 in some insects (endopterygota branch). Hs man, Mm opossum, Gg chicken, Xt frog, Dr bony fish, Dm fly, Ae ant, Phc louse, Cg oyster, Hm hydra, Nv sea anemone, Ta trichoplax (multi-cellular amoeba).

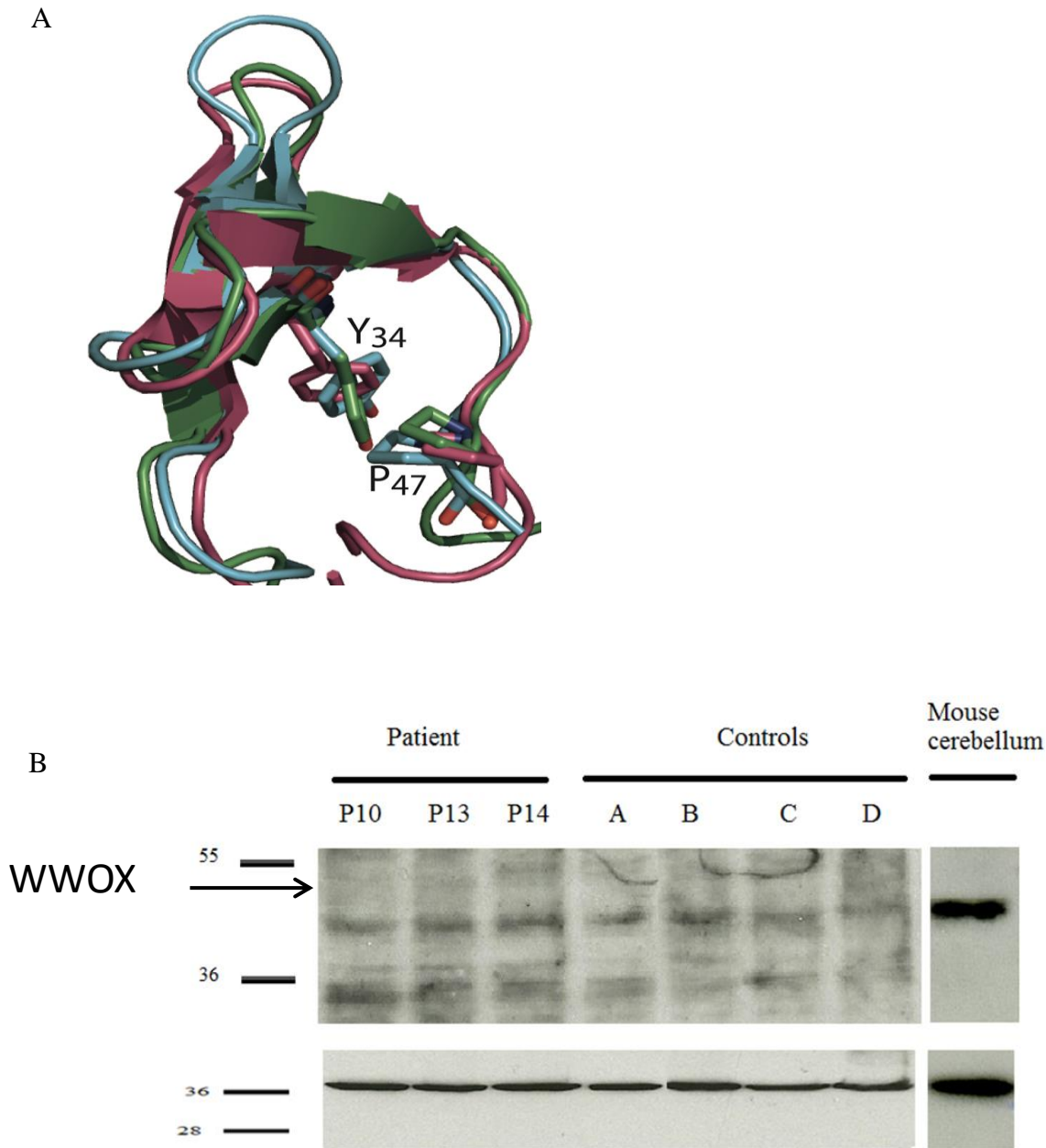


Figure 2: Analysis of normal and p.Pro47Thr mutant WWOX protein

(A) Superimposition of the well structurally characterized WW domain of TCERG1 (purple, pdb code 1E0L, Macias et al., 2000) and the 3D homology models of WWOX (green) and PQBP1 (blue) WW domains. Two amino-acids belonging to the hydrophobic core of WW domains are highlighted and annotated according to the WWOX sequence: tyrosine 34

(Y34) and proline 47 (P47). In TCERG1, mutation of the proline into alanine results in a WW domain that is largely unfolded (Petrovich et al., 2006). In PQBP1, the mutation of the tyrosine into a cysteine is causing Golabi-Ito-Hall mental retardation syndrome: the mutation affects the WW domain folding, reduces its binding activity, and alters the function of PQBP1 (Tapia et al., 2010). These two residues are in direct hydrophobic contact within WW domains.

(B) Western blot analysis of WWOX expression in cultured human skin fibroblasts and in mouse cerebellar tissue. Upper panel, WWOX expression in cultured skin fibroblasts from patient II-3 of family 1 at 3 passages 10, 13 and 14 (P10, P13, P14) and from fibroblasts from 4 different controls (A to D). Based on visual inspection, similar amounts of the mutant and wild type WWOX protein (arrow) are observed. Right lane, cerebellar mouse extracts were analyzed in a similar western blot with the same primary antibody, in order to show the position of the WWOX band and high expression of WWOX in this tissue. The nature of the 35 kDa band seen on the human fibroblast lanes is not known and is presumably non-specific cross-reaction since it is not seen in the mouse tissues (tissues other than cerebellum were also tested, not shown). Lower panel, the same western blot was analyzed with anti-actin antibodies, to check for equal loading of protein extracts.

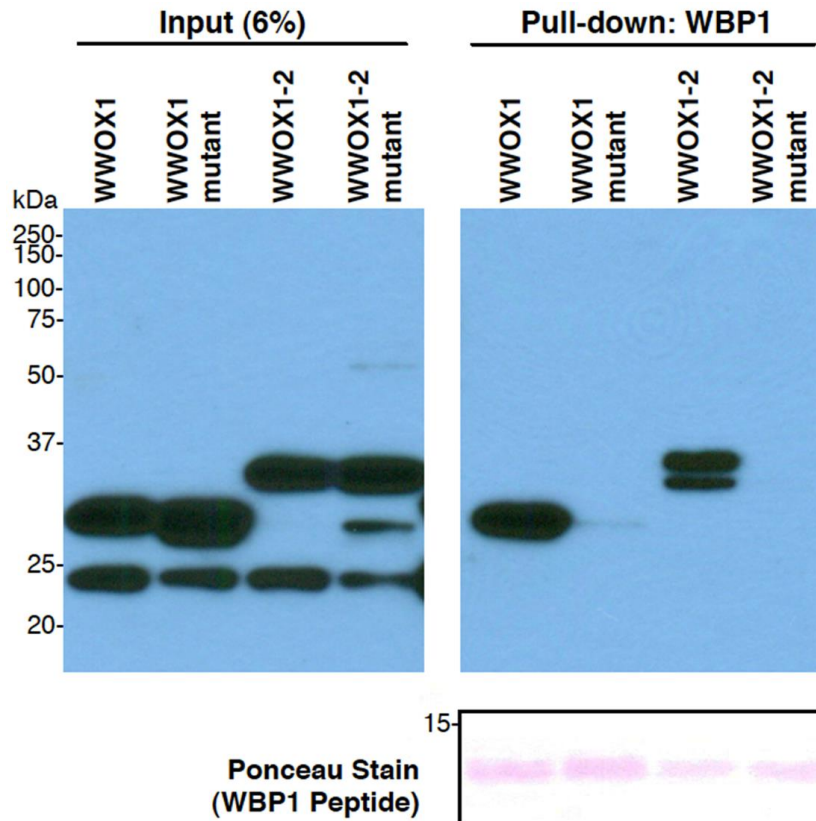
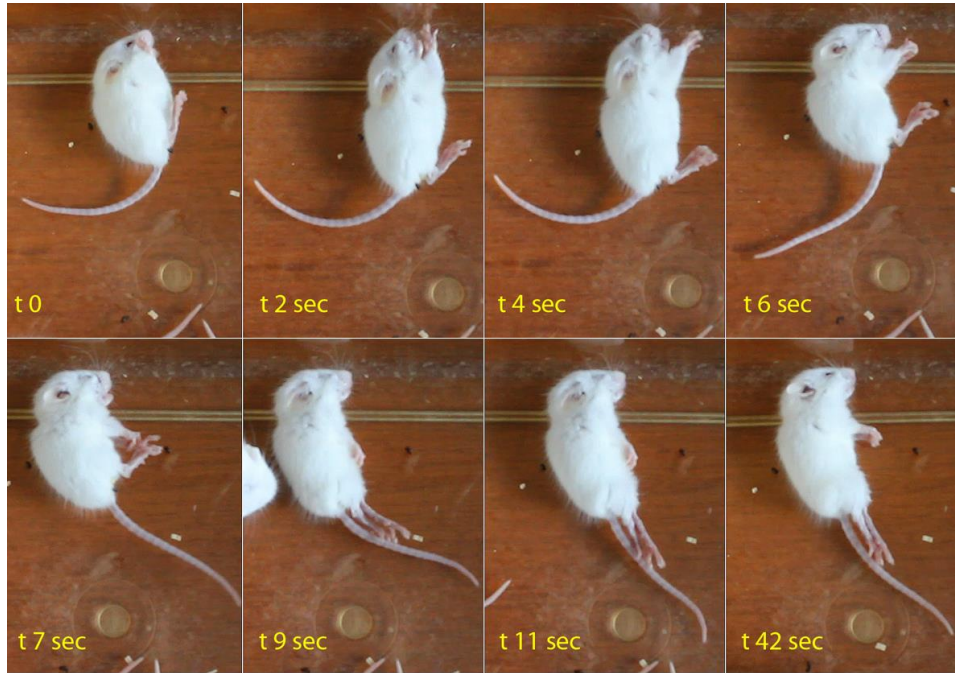


Figure 3 : Wild type and mutant WWOX WW domain pull-down assays

Purified GST-WWOX WW domain fusion proteins were incubated with biotinylated WBP1 peptide (SGSGGTPPPYTVG) in pull-down assays. WWOX1, first WWOX WW domain only; WWOX1-2, WWOX WW1 and WW2 domains. Mutant indicates the fusion peptides with the p.Pro47Thr change. Western blot of 6% input of GST fusion proteins in order to demonstrate equal amounts of input material in the pull-down experiments (left panel). Right panel, Only the wild type and not the mutant fusion peptides were efficiently pulled down with the PPPY containing oligopeptide, demonstrating that the change of proline 47 to threonine is sufficient to abrogate the affinity of WWOX for PPXY motif containing interacting partners, presumably by destabilizing the WW1 fold. Bottom panel, red ponceau stain of the pull-down blot (oligopeptide range), in order to demonstrate incubation with equal amounts of biotinylated WBP1 peptide.

A



B

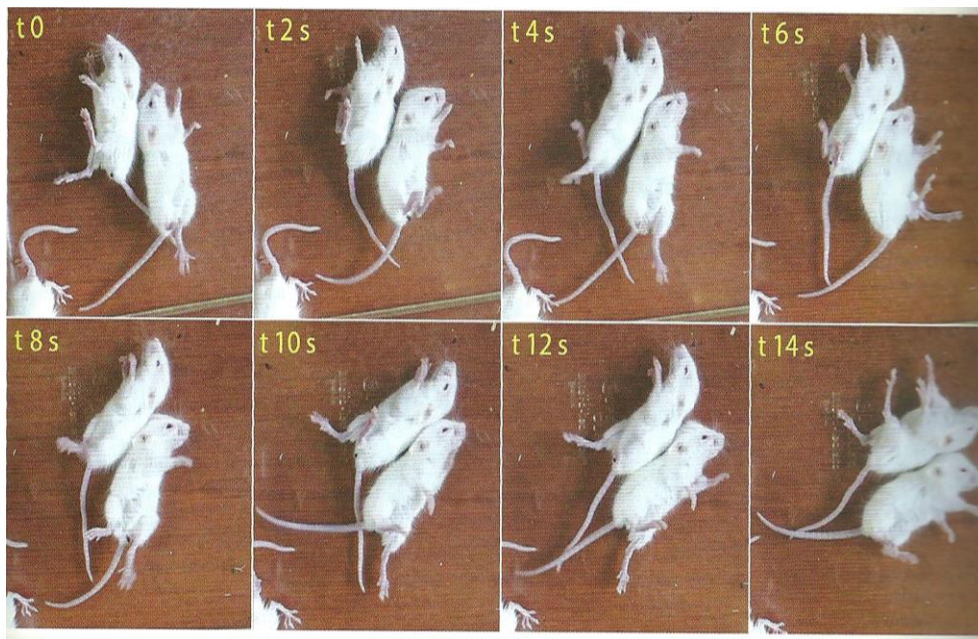


Figure 4: Still frames of audiogenic tonic-clonic seizures of *Wwox* KO mouse

Twenty day old *Wwox* KO mice were exposed for 10 minutes to a digital 14 KHz tone. After 30 seconds sound exposure, the first mouse presented a wild-running phase (see video #1,

supplementary data), followed by tonic contractions that lasted over 42 seconds (panel A). After 4 minutes sound exposure, two other mice also experienced clonic movements (panel B, see also video #1, supplementary data).

Video 1: Audiogenic tonic-clonic seizures of *Wwox* KO mice (on line)

Four twenty-day old *Wwox* KO mice were exposed for 10 min to a digital 14 KHz tone. At different times, the mice exhibited wild-running phases, tonic contractions and/or tonic-clonic seizures.

2.1.2. Fonctions du gène *WWOX*

Le gène *WWOX* a été découvert par l'équipe de Marcelo Aldaz (Bednarek et al., 2000). Ce gène code pour une protéine de 414 acides aminés, exprimée de façon ubiquitaire au niveau du cytoplasme. Elle est retrouvée de façon prédominante dans le système nerveux dont le cervelet, ainsi que dans les poumons, les glandes endocrines, les gonades, le sein et la prostate. Ce gène est composé de 9 exons. Au sein de l'intron 8 de *WWOX* qui est de très grande taille, se situe le site fragile FRA16D. La protéine est composée de deux domaines WW et d'un domaine SDR (short-chain dehydrogenase-reductase) qui ferait de *WWOX* une oxydoréductase. En 2015, les substrats potentiels de *WWOX* ne sont pas connus. Les deux domaines WW sont des domaines WW de type I, permettant des interactions protéiques avec des ligands porteurs d'une séquence PPxY (P : proline, x : n'importe quel acide aminé, Y ; tyrosine).

Ce gène a d'abord été étudié pour ses fonctions de possible suppresseur de tumeur. Son expression est fréquemment altérée dans de nombreux types de cancers humains. Plusieurs mécanismes conduisent à une réduction de l'expression de la protéine *WWOX* (Kuroki et al., 2004) : mutations somatiques avec perte d'hétérozygotie ou synthèse de transcrits aberrants de *WWOX* ainsi que des modifications épigénétiques (hyperméthylation du promoteur). Cet effet suppresseur de tumeur a été retrouvé *in vivo* (Aqeilan et al., 2007) avec une augmentation de l'incidence des tumeurs spontanées et induites par l'éthylnitrosurée chez des souris KO *WWOX* -/- et des souris hétérozygotes +/- . Une autre équipe n'a par contre pas retrouvé de développement de tumeurs spontanées chez des souris KO conditionnel (Ludes-Meyers et al., 2009).

Plusieurs fonctions de *WWOX* ont été évoquées :

- Une action pro-apoptotique sur les cellules cancéreuses (Bednarek et al., 2001 ; Kuroki et al., 2004).
- Une augmentation de l'expression de *WWOX* dans des situations de déclenchement d'apoptose comme une intoxication au MPP+ (Lo et al. 2008).
- Une fonction de régulation de certains facteurs de transcription comme p73, ErbB-4, AP2gamma en les séquestrant dans le cytoplasme, les empêchant de migrer vers le noyau (Aqeilan et al., 2004, Aqeilan et al., 2005).
- Son expression dans le système nerveux murin en développement chez des fœtus (Chen et al., 2004) fait évoquer un rôle dans la différenciation neuronale.
- Ses fonctions métaboliques potentielles sont encore méconnues. Certains variants, notamment du promoteur ou au niveau de l'intron 8, auraient un rôle dans la modulation des taux sanguins d'HDL cholestérol et de triglycérides (Saez et al., 2010). Des troubles du développement osseux (Ludes-Meyers et al., 2009) ainsi que des anomalies des gonades et de la stéroïdogénèse (Aqeilan et al., 2009) ont été retrouvés dans des modèles murins.

2.1.3. Mutations dans le gène *WWOX*

Une grande famille saoudienne consanguine (Gribaa et al., 2007) avait initialement bénéficié d'une cartographie d'homozygotie dans notre laboratoire retrouvant une zone d'homozygotie commune aux quatre atteints sur un intervalle de 19Mb, en 16q21-23. Certains gènes candidats avaient été séquencés sans retrouver de mutation pathogène.

Une souche de rats *lde* (lethal dwarfism with epilepsy) présentant un nanisme, une ataxie, des crises d'épilepsie audiogéniques et un décès néonatal a fait l'objet d'une publication la même année (Suzuki et al., 2007). La mutation homozygote dans le dernier exon de *WWOX* associée à ce phénotype n'a été décrite que deux ans plus tard (Suzuki et al., 2009). Il n'y a pas eu de lien entre cette découverte et cette famille probablement en raison du grand nombre de gènes dans cette région, rendant difficile une veille bibliographique exhaustive.

En raison du grand nombre de gènes à explorer dans cette zone, un séquençage de l'exome a été réalisé chez un des individus. Une nouvelle mutation homozygote p.Pro47Tyr dans *WWOX* a pu être retrouvée dans la séquence consensus du premier domaine WW (cf. manuscrit 1). Les gènes connus d'ataxie ont pu être exclus. Nous avons collaboré avec une équipe allemande qui avait également retrouvé une mutation homozygote dans une famille palestinienne consanguine avec deux atteints, présentant un tableau similaire associé à une spasticité.

L'analyse fonctionnelle de la première mutation p.Pro47Tyr, effectuée en collaboration avec l'équipe de CM Aldaz, a confirmé le caractère pathogène de la substitution, qui est responsable d'une perte de la fonction d'interaction du domaine WW. La deuxième mutation, p.Gly372Arg, n'a pu être testée fonctionnellement. En effet, les fonctions de cette zone de la protéine *WWOX* sont inconnues (substrats de l'oxydoréductase potentielle inconnus).

2.2. Identification de nouvelles mutations dans le gène *FA2H* responsable d'ataxie spastique

2.2.1. Manuscrit 2 :

Marelli C, Salih MA, Nguyen K, **Mallaret M**, Leboucq N, Hassan HH, Drouot N, Labauge P, Koenig M. Cerebral iron accumulation is not a major feature of FA2H/SPG35. *Mov Dis Clin Pract.* Published online 18 February 2015. doi:10.1002/mdc3.12118

Cerebral iron accumulation is not a major feature of *FA2H*/SPG35

Cecilia Marelli¹, Mustafa A Salih², Karine Nguyen³, Martial Mallaret^{4,5}, Nicolas Leboucq⁶, Hassan H Hamdy⁷, Nathalie Drouot⁴, Pierre Labauge¹, Michel Koenig^{4,8}

1: Department of Neurology, University Hospital Gui de Chauliac, Montpellier, France

2: Division of Pediatric Neurology, Department of Pediatrics, College of Medicine, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia

3: Department of Medical Genetics, University Hospital “Timone Enfants”, Marseille France

4: Institute of Genetics and Cellular and Molecular Biology, Illkirch, France

5: Department of Neurology, Strasbourg University Hospital, Strasbourg, France

6: Department of Neuroradiology, University Hospital Gui de Chauliac, Montpellier, France

7: Department of Radiology, King Khalid University Hospital and College of Medicine, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia

8: University Institute of Clinical Research, INSERM UMR_S 827, Montpellier, France

Corresponding author: Michel Koenig, University Institute of Clinical Research, INSERM UMR_S 827, 640 av. Doyen G. Giraud, 34295, CEDEX 5, Montpellier, France. Telephone: +33 (0) 411759879; fax: +33 (0)4 11759882; e-mail: Michel.koenig@inserm.fr

Word count: 1488

Key words: autosomal recessive spastic paraplegia, neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA), ataxia, *FA2H*, SPG35

Grant support: This study was supported by funds from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Agence Nationale pour la Recherche-Maladies Rares and Maladies Neurologiques et Psychiatriques (ANR-09-MNPS-191 001-01 to M.K.), the ANR/E-rare JTC 2011 “Euro-SCAR” (2011-RARE-004-01 to M.K.). M.A.S. is thankful to the Deanship of Scientific Research, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia, for supporting this work through the Research Group Project number RGP-VPP-301.

ABSTRACT

Mutations in the fatty-acid 2-hydroxylase (*FA2H*) gene cause an autosomal recessive spastic paraplegia (SPG35), often associating with cerebellar ataxia; cerebral MRI may show iron accumulation in the basal ganglia, leading to the inclusion of SPG35 among the causes of neurodegeneration with brain iron accumulation. This finding was initially considered strongly relevant for diagnosis, although its frequency is not yet established. We found 5 novel patients (from two families) with mutations in the *FA2H* gene: none of them showed cerebral iron accumulation (T2-weighted images performed in all; T2 gradient-echo in 2); notably, in 1 case, iron accumulation was absent even after 18 years from disease onset on both T2 gradientecho and susceptibility-weight MRI sequences. Cerebral iron accumulation is not a prominent feature in SPG35 and is not always dependent on disease duration; its absence should not discourage from evoking this diagnosis.

INTRODUCTION

Mutations in the Fatty-Acid 2-Hydroxylase (*FA2H*) gene cause a rare autosomal recessive spastic paraplegia (SPG35) with a complex phenotype, variably associating ataxia, dystonia, cognitive decline, optic atrophy, and epilepsy.¹ A large spectrum of cerebral MRI alterations can be observed consisting of cerebellar atrophy, brainstem atrophy, thin corpus callosum, white matter hyperintensities (WMH), and cerebral iron accumulation, notably in the pallidum and, to a lesser degree, in the substantia nigra.²⁻⁵ These clinical and radiological manifestations are collectively designated as fatty acid hydroxylase-associated neurodegeneration (FAHN). As cerebral iron accumulation was a clear-cut and obligatory feature in one of the first series of patients,³ *FA2H* was included among the causes of neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA) and significant relevance was initially given to this feature in orienting diagnosis. However, further descriptions of *FA2H* patients showed that cerebral iron accumulation was not universally present and was milder than in other forms of NBIA, although the exact frequency of this finding is not yet established. We report five patients with novel *FA2H* mutations without evidence of iron accumulation and we present a review of the literature with particular focus on neuroimaging findings.

CASE SERIES

Genetic analysis

SNP genotyping. Genome-wide homozygosity mapping technique was performed in 97 consanguineous families primarily presenting with ataxia,⁶ using the GeneChip Mapping Mapping 50K Xba 240 Array containing 58,102 SNPs (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA). SNP genotypes were obtained by the Affymetrix protocol for the GeneChip Mapping Array (Mapping

100K Assay Manual (P/N701684 Rev.3)). Homozygous regions were identified with the HomoSNP software developed by Plewniak and Müller (available on request from jmuller@igbmc.fr).

Microsatellite marker analysis. Microsatellite markers from chromosome 16q were designed from the UCSC Human genome database (<http://genome.ucsc.edu>, March 2006 release) and analysed on an ABI Prism 3100 genetic analyser with allele sizes determined using the ABI PRISM1 Genotyper software package (Applied Biosystems, Foster City, CA).⁷

Mutational analysis. Sequencing of *FA2H* was undertaken as reported.⁷ 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 from the human genome databases (<http://genome.ucsc.edu>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the software package Seqscape. (Version 2.5; ABI).

Genetic, clinical, and neuroimaging findings

Shared homozygosity over the chromosome 16q interval containing *FA2H* was identified among the affected patients of two unrelated consanguineous families with ataxia and spastic paraplegia. Sequencing of *FA2H* revealed two novel homozygous mutations (Supplementary Figure). Genetic analysis was performed after signature of a written informed consent approved by the Local Ethics Committee.

Family 1. This is a multi-consanguineous family of Moroccan origin harbouring the homozygous p.R269H mutation in the *FA2H* gene; two out of five siblings and their mother were affected, with a pseudo-dominant inheritance pattern. The two sisters had an normal psychomotor development; at the age of respectively 16 and 12 years they presented a progressive spasticity and ataxia, associated with cognitive decline and incontinence. Ability of walking was lost around 15 (subject 1) and 9 (subject 2) years after disease onset. At the last neurologic assessment (mean follow up= 17.5 years) disability stage was scored at 6/7 for the two sisters. Sensation and nerve conduction were normal (2/2) although central somato-sensory evoked potential were not recordable (2/2). They presented a bilateral optic atrophy without retinopathy, confirmed by altered visual evoked potential (VEP) and optical-coherence tomography, and normal electroretinogram (ERG) (2/2).

Initial MRI, at respectively seven and six years from onset, showed cerebellar atrophy (2/2), mild posterior periventricular WMH (2/2), and thin corpus callosum (1/2); no iron accumulation was evident on T2-weighted sequences. A second MRI performed 18 years after disease onset in the subject 1, and 14 years after disease onset in the subject 2, (Table) showed progression of cerebral and cerebellar atrophy, brainstem atrophy and extension of WMH to the centrum semiovale and to the subcortical and peri-rolandic regions. Nevertheless, no cerebral iron accumulation was evident on T2-weighted (2/2), or T2 gradient-echo (T2*, 1/1) sequences (Figure). Spinal MRI showed marked spinal atrophy (2/2).

Family 2. This is a consanguineous family from Saudi Arabia harbouring the homozygous p.H336N mutation in the *FA2H* gene. A pair of twin brother and sister (subject 1 and 2), and another female (subject 3) out of four siblings was affected. After an normal psychomotor

development, they presented progressive spasticity and ataxia with a mean age of onset of four years, without cognitive decline. They were still able to walk at a mean of 4.5 years from onset. Neurophysiological examination showed normal nerve conduction (3/3), normal ERG (2/2) and altered VEP (1/2). Cerebral MRI, at a mean of 2.5 years from disease onset, showed periventricular WMH (3/3) and cerebellar atrophy (1/3). No cerebral iron accumulation was found on T2-weighted (3/3) and T2* (1/1) sequences (Table).

DISCUSSION

We presented a series of five novel *FA2H*-mutated patients without evidence of cerebral iron accumulation. They showed a progressive spastic-ataxia syndrome without dystonia; disease onset was in the adolescence in family 1 (mean 14 years) and in childhood in family 2 (mean 4 years).

Patients from family 1 presented the full spectrum of *FA2H*-related MRI alterations, but iron deposition (Figure). In family 2, isolated WMH without iron deposition were a constant finding, with additional cerebellar atrophy in one subject.

Our five patients presented symmetrical T2-weighted and FLAIR WMH, predominantly in the posterior but also in the anterior periventricular regions; sometimes WMH extended to the centrum semiovale, and to subcortical and peri-rolandic regions; no tract-specific pattern of white matter involvement was observed. As *FA2H* is primarily involved in myelin metabolism and as WMH could be an early and isolate finding, like in family 2, these alterations are probably a direct consequence of the disease.

None of our patients showed pallidal iron accumulation on T2-weighted sequences; T2* sequences were additionally performed in patient 1, from family 1, and in patient 2, from family

2. Although T2* and SWI sequences are more sensitive in the detection of cerebral iron deposition, in NBIA pallidal iron accumulation is traditionally already detected as a symmetrical, homogeneous hypointensity on T2-weighted sequences.⁵ In previously-reported SPG35 cases,^{1-4;8-13} cerebral iron deposition was almost always examined with T2-weighted sequences; in the sole patient with iron deposition and available T2* sequences, the hypointensity was already evident on T2-weighted images.⁴

Although SPG35 was included among the causes of NBIA, the exact frequency of cerebral iron accumulation is still unknown. We therefore performed a review of the literature^{1-4, 8-13} and after inclusion of the five patients described in the present study, a total of 33 *FA2H*-mutated patients were available for comparison of cerebral MRI data (table): iron accumulation was definitively present in only 11/33 patients (33%, stated as mild in 2/11 patients), was present with borderline features in 2/33 (6%),^{1,9} and absent or not mentioned in 20/33 (61%); pallidal iron deposition was more frequently reported in patients with longer disease duration (table).

Notably, according to the literature other neuroimaging findings were more constantly present: WMH (30/33 patients 91%), cerebellar atrophy (24/32, 75%), thin corpus callosum (22/32, 69%), and brainstem atrophy (15/23, 65%); finally, cortical atrophy was reported in 13/23 patients (56%). One patient had normal cerebral MRI.³ Isolated cerebral iron accumulation was never detected in *FA2H*-mutated patients.

The two families reported here were identified from a group of patients mainly selected on the basis of the presence of ataxic signs and absence of predominant extrapyramidal presentation;⁶ this could constitute a bias with respect to the presence of iron deposition. However, no *FA2H* mutations were detected in two different cohorts of 43 and 46 *PANK2*- and *PLA2G6*-negative NBIA patients, defined by the presence of movement disorders and MRI evidence of iron

deposition in the basal ganglia, confirming that *FA2H* mutations are a rare cause of NBIA.^{3,14} On the contrary, mutations in *PLA2G6*, also causing cerebellar atrophy, WMH, and basal ganglia iron accumulation, were detected in 20/105 NBIA patients (19%) of one of the two cohorts¹⁴ and pallidal iron accumulation was detected in 50%¹⁵ to 80%¹⁶ of the *PLA2G6*-mutated patients.

Literature-reported *FA2H*-mutated patients showed a well-defined progression of WMH and brain atrophy according to disease evolution.^{4,8,9} The inconsistency of iron accumulation was explained as a tardive finding, possibly appearing mainly in later disease stages.³ However, in the two patients from family 1 subsequent MRI showed a clear progression of brain atrophy and WMH and no iron deposition in T2 and T2* sequences, even after 18 years of disease duration, clearly indicating that at least some patients are not prone to develop iron deposition. Of note, *FA2H* is primarily and directly involved in metabolism of the myelin; the pathophysiological mechanism of iron accumulation is less clear and may be a possible indirect consequence.³

In conclusion cerebral iron accumulation is a very inconstant finding in SPG35, particularly in the initial and intermediate stages of the disease. Its absence should not discourage from evoking this diagnosis. Notably, iron deposition does not seem to be always dependent on disease duration.

Acknowledgments: we are grateful to the patients and their families. We wish to thank Nicolas Menjot de Champfleury for the help in radiological images.

Author's roles: Research project: A) Conception: MK; B) Organisation: CM, MM, ND, and MK; C) Execution: CM, SMA, NK, MM, LN, HHH, ND, PL, and MK. Statistical analysis: NA.

Manuscript preparation: A) Writing of the first draft: CM and MK; Analysis and interpretation of the data: CM, SMA, NK, MM, LN, HHH, ND, PL, and MK; Review and critique: CM, SMA, LN, PL, and MK.

Disclosures

Funding Sources and Conflicts of Interest: This study was supported by funds from the Institut National de la Sante et de la Recherche Médicale (INSERM), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Agence Nationale pour la Recherche-Maladies Rares and Maladies Neurologiques et Psychiatriques (ANR-09-MNPS-191 001-01; to M.K.), and the ANR/E-rare JTC 2011 “Euro-SCAR” (2011RARE-004-01; to M.K.). M.A.S. is thankful to the Deanship of Scientific Research, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia, for supporting this work through the Research Group Project no. RGP-VPP-301. The authors report no conflicts of interest.

Financial Disclosures for previous 12 months: The authors declare that there are no disclosures to report.

Ethical statement: all human studies have been approved by the appropriate ethic committee and have been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

Author’s responsibility: the corresponding author takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

REFERENCES

1. Dick KJ, Eckhardt M, Paisán-Ruiz C, et al. Mutation of FA2H underlies a complicated form of hereditary spastic paraplegia (SPG35). *Hum Mutat* 2010; 31: E1251-1260.
2. Edvardson S, Hama H, Shaag A, et al. Mutations in the fatty acid 2-hydroxylase gene are associated with leukodystrophy with spastic paraparesis and dystonia. *Am J Hum Genet* 2008; 83: 643-648.
3. Kruer MC, Paisán-Ruiz C, Boddaert N, et al. Defective FA2H leads to a novel form of neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA). *Ann Neurol* 2010; 68: 611-618.
4. Tonelli A, D'Angelo MG, Arrigoni F, et al. Atypical adult onset complicated spastic paraparesis with thin corpus callosum in two patients carrying a novel FA2H mutation. *Eur J Neurol* 2012; 19: e127-129.
5. Kruer MC, Boddaert N, Schneider SA, et al. Neuroimaging features of neurodegeneration with brain iron accumulation. *AJNR Am J Neuroradiol* 2012; 33: 407-414.
6. H'mida-Ben Brahim D, M'zahem A, Assoum M, et al. Molecular diagnosis of known recessive ataxias by homozygosity mapping with SNP arrays. *J Neurol* 2011; 258: 56-567.
7. Gribaa M, Salih M, Anheim M, et al. A new form of childhood onset, autosomal recessive spinocerebellar ataxia and epilepsy is localised at 16q21-q23. *Brain* 2007; 130: 1921-1928.
8. Garone C, Pippucci T, Cordelli DM, et al. FA2H-related disorders: a novel c.270+3A>T splice-site mutation leads to a complex neurodegenerative phenotype. *Dev Med Child Neurol* 2011; 53: 958-961.
9. Pierson TM, Simeonov DR, Sincan M, et al. Exome sequencing and SNP analysis detect novel compound heterozygosity in fatty acid hydroxylase-associated neurodegeneration. *Eur J Hum Genet* 2012; 20: 476-479.
10. Cao L, Huang XJ, Chen CJ, et al. A rare family with Hereditary Spastic Paraplegia Type 35 due to novel FA2H mutations: a case report with literature review. *J Neurol Sci* 2013; 329: 1-5.

11. Rupps R, Hukin J, Balicki M, et al. Novel Mutations in FA2H-Associated Neurodegeneration: An Underrecognized Condition? *J Child Neurol* 2013; 28: 1500-1504.
12. Donkervoort S, Dastgir J, Hu Y, et al. Phenotypic variability of a likely FA2H founder mutation in a family with complicated hereditary spastic paraplegia. *Clin Genet* 2014; 85: 393-395.
13. Pensato V, Castellotti B, Gellera C, Pareyson D, Ciano C, Nanetti L, Salsano E, Piscosquito G, Sarto E, Eoli M, Moroni I, Soliveri P, Lamperti E, Chiapparini L, Di Bella D, Taroni F, Mariotti C. Overlapping phenotypes in complex spastic paraplegias SPG11, SPG15, SPG35 and SPG48. *Brain*. 2014 ;137: 1907-1920.
14. Panteghini C, Zorzi G, Venco P, et al. C19orf12 and FA2H mutations are rare in Italian patients with neurodegeneration with brain iron accumulation. *Semin Pediatr Neurol* 2012; 19: 75-81.
15. Gregory A, Westaway SK, Holm IE, et al. Neurodegeneration associated with genetic defects in phospholipase A(2). *Neurology* 2008; 71: 1402-1409.
16. Salih MA, Mundwiller E, Khan AO, et al. New findings in a global approach to dissect the whole phenotype of PLA2G6 gene mutations. *PLoS One*. 2013; 8: e76831.

TABLES AND FIGURES

Table 1: Neuroimaging findings in *FA2H*-mutated patients from the present report and from the literature.

Article	Subject	Mutation	Cortical Atrophy	Cerebellar Atrophy	Thin CC	Pallidal Iron Deposition	WMH	Brainstem Atrophy	MRI Follow-up (Years)	Dystonia
Present report	I.1	p.R269H ^a	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	18	No
	I.2	p.R269H ^a	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	14	No
	II.1	p.H336N ^a	No	Yes	No	No	Yes	No	2.5	No
	II.2	p.H336N ^a	No	No	No	No	Yes	No	2.5	No
Cao et al. ¹⁰	II.3	p.H336N ^a	No	No	No	No	Yes	No	2.5	No
	I.1	p.P323Q; p.G326S; p.E230K	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	nr	Yes
Dick et al. ^{1b}	I.2	p.P323Q; p.G326S; p.E230K	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	nr	Yes
	VII. 2	p.R235C ^a	nr	nr	nr	nr	Yes	nr	3	Yes
Donkervoort et al. ¹²	IV.8	p.R53_I58del ^a	Yes	Yes	Yes	Borderline	Yes	Yes	19	Yes
	I.1	p.Y170X ^a	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes	8	No
Edvardson et al. ^{2b}	I.2	p.Y170X ^a	No	Yes	No	No	Yes	No	5	No
	I.1	Skipping of exons 5 and 6 ^a	nr	No	No	No	Yes	nr	nr	Yes
	I.2	Skipping of exons 5 and 6 ^a	nr	Yes	Yes	nr	Yes	Yes	12	Yes
	I.3	Skipping of exons 5 and 6 ^a	nr	Yes	Yes	nr	Yes	nr	nr	Yes
	II.1	Skipping of exons 5 and 6 ^a	nr	Yes	Yes	nr	Yes	nr	nr	Yes
	II.2	Skipping of exons 5 and 6 ^a	nr	No	No	nr	Yes	nr	nr	Yes
	II.3	Skipping of exons 5 and 6 ^a	nr	No	No	nr	Yes	nr	nr	Yes
	II.4	Skipping of exons 5 and 6 ^a	nr	No	No	Yes	Yes	nr	3	Yes
Garone et al. ⁸	III.2	p.D35Y	No	No	No	No	No	No	nr	No
	I.1	Frameshift after exon 1 ^a	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	13	No
	I.2	Frameshift after exon 1 ^a	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	10	No
Kruer et al. ³	I.1	p.R154C ^a	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Approximately 13	Yes
	I.2	p.R154C ^a	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	nr	Yes
	I.3	p.R154C ^a	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	nr	Yes
	II.1	p.Y170X ^a	nr	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	>10	Yes
	II.2	p.Y170X ^a	nr	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	nr	Yes
Pierson et al. ⁹	I.1	p.F236S; deletion of exons 3 to 7	No	Yes	Yes	Borderline	Yes	Yes	>7	Yes
Rupps et al. ¹¹	I.1	p.S70L; p.P323L	No	No	No	No	Yes	nr	1	No
Tonelli et al. ⁴	I.1	p.Y170C ^a	Yes	Yes	Yes	Yes	No	nr	10	No
	II.2	p.Y170C ^a	Yes	Yes	Yes	No	No	nr	9	No
Pensato et al. ¹³	I.1	p.Y34C; p.T207M	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	nr	No
	I.2	p.Y34C; p.T207M	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	nr	No
	II.1	p.G46D ^a	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No	nr	No

*MRI results are not available for the other *FA2H*-mutated subjects reported in these papers;

Homozygous mutations; nr: not reported; WMH: white matter hyperintensities

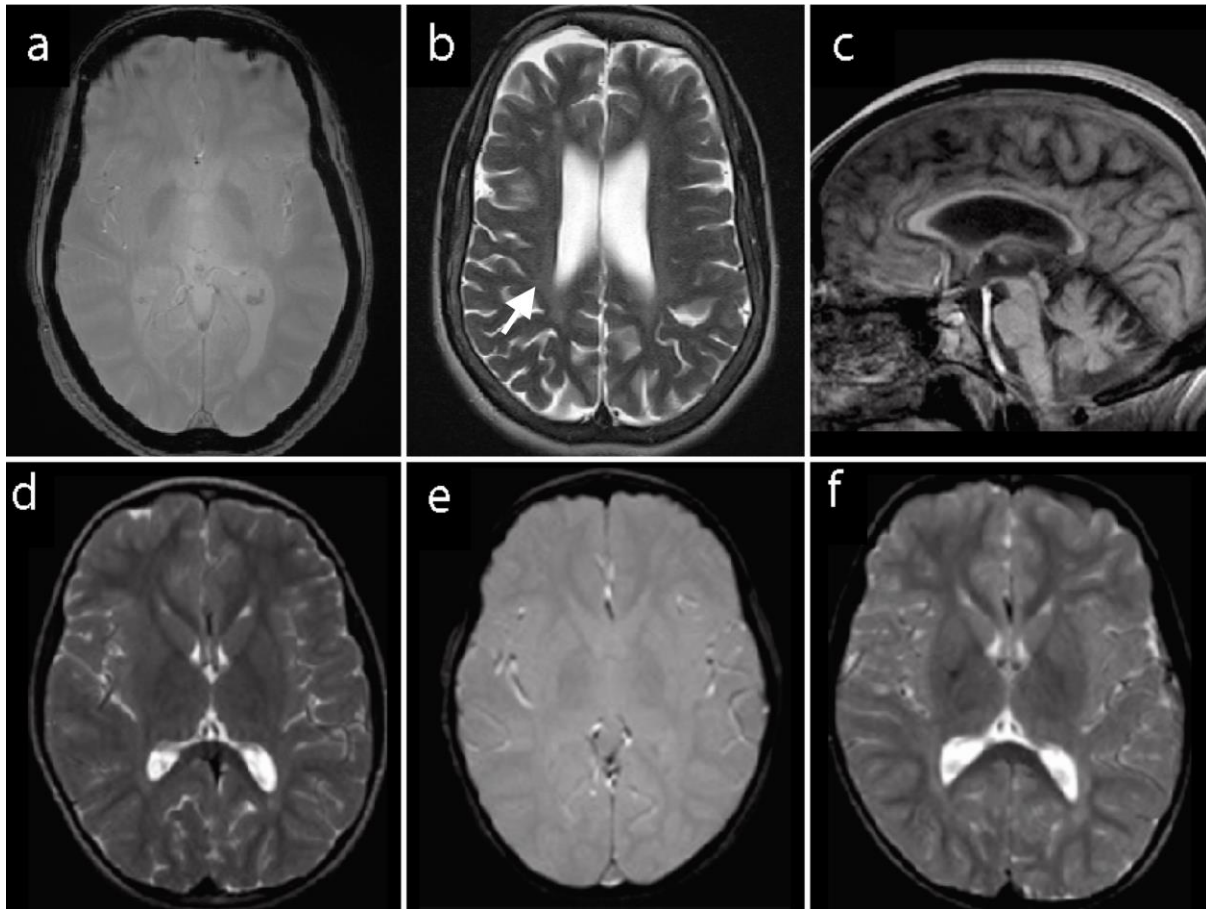
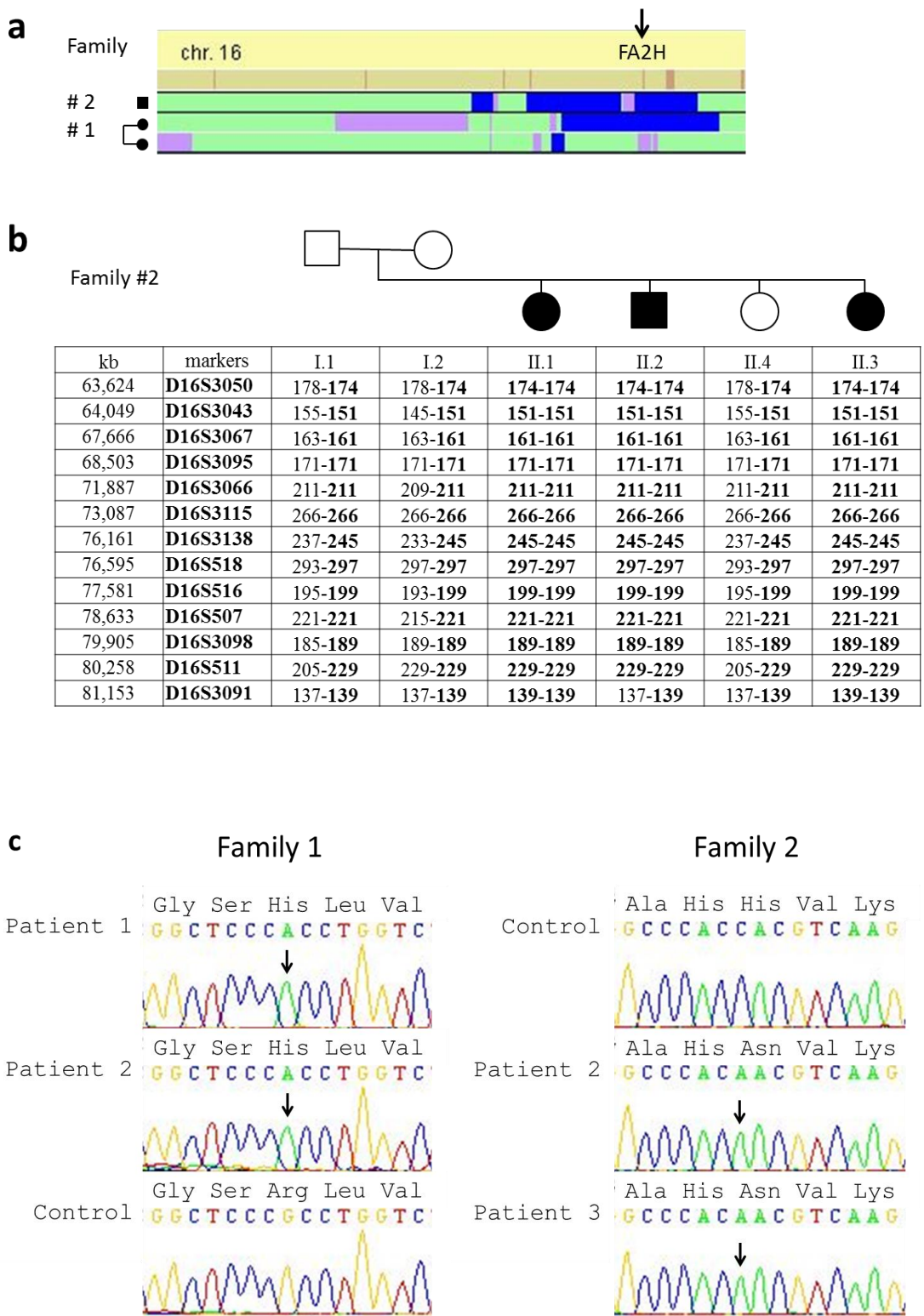


Figure 1: MRI findings of family 1 and 2.

A, b, c: cerebral MRI of patient 1 from family 1 showing no pallidal iron accumulation (a, T2* axial image), WMH (b, T2-weighted axial image, white arrow), and cerebellar, brainstem and corpus callosum atrophy (c, T1-weighted sagittal image). D,e,f,: cerebral MRI from family 2 showing no pallidal iron accumulation in patient 1 and 3 (d and f, T2-weighted axial image), and in patient 2 (e, T2* axial image).

Supplementary Figure: Genetic analysis of the two FA2H-mutated families.



d

p.Arg269His family 1		↓	p.His336Asn family 2		↓
		H			N
Hs	I MLHFVM HGQHHK APFDGS R LVF PP VPA		Hs	KGSYLYSL K AH H VK H HFAHQKSGF	
Tr	ITLH F LL HGQHHK SPFDGS R LVF PP GLA		Tr	RGSYMYSL K AY H VK H HFEHQKSGF	
Dm	CTF H FLL HGQHHK VPFDS R LVF PP PLPG		Dm	AGHHL Y RM K KRY H Y Q H H F S HQDLGY	
Ta	ISL H FLL HGQHHK VPFDP R LVF PP VPA		Ta	QGT Y LKGL K TY H VV H H F V Q DKGF	
Sp	LTM H FAF HGCHH FLPADKY R LV M PPALF		Sp	PNAYLTDL K T W HLD H H Y KDYKSAY	
Sc	FAT H FLL HGCHH YLPMDKY R LV M PPTLF		Sc	LPPFMR K L K KY H LE H H Y KNYQLGF	
At2	NTA H YLL HGCHH KHPQDGL R LV F PPAT		At2	KEPT F KHL K KY H LN H H F RIQDKGY	
At1	NTA H YLI HGCHH KHPMDHL R LV F PPAT		At1	TRPVT K NL K KY H LN H H F RIQDKGF	

A) Homozygous regions over chromosome 16 in the two affected sisters of family #1 and the affected boy of family #2. Homozygous regions are displayed by the HomoSNP software as blue bars (more than 30 consecutive homozygous SNPs), and pink bars (more than 20 consecutive homozygous SNPs). The arrow indicates the position of the *FA2H* gene. B) Pedigree of family #2 with analysis of chromosome 16q microsatellite markers. Linked haplotypes are shown in bold. The disease fully segregates with chromosome 16q markers. Microsatellite positions are indicated on the left (hg18 reference map). *FA2H* is located between markers D16S3115 and D16S3138. C) Electropherograms of patients and a control individual over part of exon 6 of *FA2H*, revealing homozygous mutation in patients (arrows). D) Mutant amino-acids (arrows) in families 1 and 2 are extremely conserved during evolution, indicating an important function in protein structure. Amino-acid alignment (single letter code) of orthologues over part of the conserved domains of *FA2H*. Highly conserved amino-acids (conserved in all eukaryotes) are shown in bold. Hs, Homo sapiens, Tr Takifugu rubripes (fish), Dm Drosophila melanogaster (fly), Ta Trichoplax adherens (a multi-cellular amoeba), Sp Schizosaccharomyces pombe (yeast), Sc Saccharomyces cerevisiae (yeast), At Arabidopsis thaliana (plant).

2.2.2. Fonctions du gène *FA2H*

Le gène *FA2H* (fatty acid 2-hydroxylase) humain, localisé sur le chromosome 16, a été identifié en 2004 par Alderson et al. Quatre ans plus tard, des mutations récessives de ce gène ont été associées à un tableau clinique de paraparésie spastique complexe s'associant à une dystonie, une ataxie et une leucodystrophie (Edvardon et al, 2008). La paraparésie spastique était le symptôme initial et constant chez les neuf patients décrits, issus de trois unions consanguines. Un locus de paraparésie spastique complexe nommé SPG35 avait été auparavant publié en 16q21-23 (Dick et al., 2008) qui s'est avéré secondairement en lien à des mutations dans *FA2H* (Dick et al, 2010). Le gène *FA2H* code pour une protéine de 342 acides aminés qui a pour rôle d'hydroxyler les acides gras libres afin qu'ils soient incorporés dans les céramides (Figure 9), qui sont les précurseurs du galactosylcéramide (Figure 10). Le galactosylcéramide est un composant de la myéline du système nerveux central.

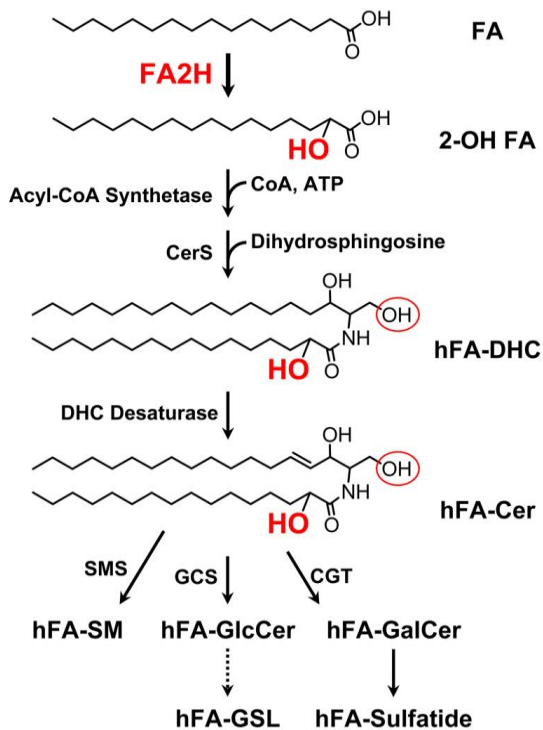


Figure 9 : biosynthèse des sphingolipides à partir des acides gras hydroxylés

(d'après Hama, 2010)

FA : acide gras ; hFA acide gras hydroxylé ; DHC, dihydrocéramide; CerS, dihydrocéramide synthase; Cer, céramide; SMS, sphingomyéline synthase; CGT, UDP-galactose: céramide galactosyltransférase; GCS, UDPglucose:céramide glucosyltransférase; GSL, glycosphingolipides.

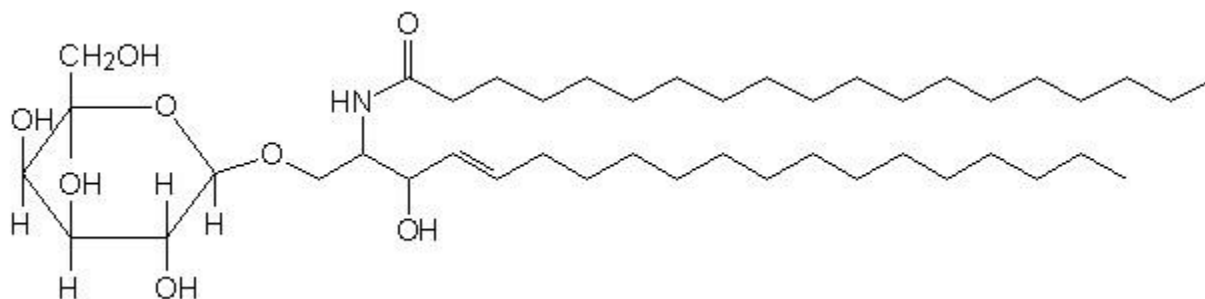


Figure 10 : Formule du galactosylcéramide

D'après <http://themedicalbiochemistrypage.org/images/galactosylceramide.jpg>

2.2.3. Identification de nouvelles mutations dans *FA2H*

La cartographie d'homozygotie qui avait été réalisée au laboratoire a permis d'identifier deux familles consanguines porteuses d'une grande zone d'homozygotie partagée entre les atteints sur le chromosome 16 et contenant *FA2H*. Il s'agissait d'une famille marocaine dont deux filles étaient atteintes d'ataxie cérébelleuse et de spasticité associées à un déclin cognitif et d'une famille saoudienne dont trois enfants étaient atteints d'ataxie cérébelleuse et spasticité sans trouble cognitif. J'ai effectué le séquençage par la méthode Sanger d'un patient issu de chacune des deux familles et j'ai étudié la ségrégation chez les atteints de la famille dont l'ADN était disponible.

Une mutation faux-sens homozygote a été identifiée dans chacune des deux familles. Les mutations c.807G>A; p.Arg269His et c.1006C>A; p.His336Asn sont situées dans le domaine fonctionnel stérol désaturase ERG3, lieu de l'hydroxylation des acides gras. L'étude de

conservation au cours de l'évolution montre qu'il s'agit dans les deux cas d'acides aminés conservés chez tous les eucaryotes (supporting Figure 1, page 75).

2.2.4. Corrélations génotype-phénotype dans les mutations récessives de *FA2H*

Les mutations frameshift décrites dans la littérature (Kruer et al., 2010 ; Garone et al., 2011; Donkervoort et al., 2014) sont globalement plus sévères que les mutations faux sens. Chez deux frères décrits par Garone et al., les éléments cliniques de sévérité sont la perte rapide de la déambulation à 8 ans et le déclin cognitif sévère. Chez les deux patients décrits par Donkervoort et al., les éléments de sévérité sont la perte précoce de la marche à 5 et 9 ans respectivement. Dans la deuxième famille décrite par Kruer et al., on retrouve une perte précoce de la marche entre 4 et 9 ans, une dystonie généralisée, une ataxie et une détérioration cognitive modérée. Il faut tempérer cette affirmation par le fait que certaines mutations faux sens particulières peuvent déstabiliser la structure tridimensionnelle de la protéine et avoir des conséquences fonctionnelles similaires à des mutations non-sens. Par exemple, la mutation p.Arg154Cys (première famille décrite dans l'article de Kruer et al., 2010) entraîne une diminution de l'abondance de la protéine en lien avec une probable réduction de la stabilité de la protéine et/ou de l'ARNm.

Contrairement aux tableaux cliniques sévères présentés ci-dessus, les formes décrites avec mutations faux sens par notre équipe correspondent à un début plus tardif et/ou une perte moins rapide de la marche et l'association d'une ataxie cérébelleuse et d'une paraparésie spastique.

Dans la première famille avec deux atteints, le début est plus tardif entre 12 et 16 ans avec perte de la marche à « seulement » 31 ans et 22 ans respectivement. Il existe une détérioration cognitive, la dystonie est absente.

Dans la deuxième famille avec trois atteints, l'âge de début est précoce et se situe entre 4 et 5 ans, mais la marche est conservée (suivi entre 2 et 8 ans au maximum). Il n'y avait pas de dystonie ni de détérioration cognitive.

2.2.5. Atteinte cérébelleuse dans la FAHN (Fatty acid hydroxylase associated neurodegeneration)

L'implication du cervelet sur le plan clinique dans les mutations récessives de *FA2H* est relativement fréquente, retrouvé dans 51% des cas publiés (27 patients sur 53). Elle est le plus souvent légère à modérée, rarement sévère. L'ataxie cérébelleuse peut être inaugurale et peut précéder la paraparésie spastique (Zakis et al., 2015).

Nous avons constaté que l'atrophie cérébelleuse est fréquente, retrouvée chez 24 patients sur les 32 cas publiés avec des données d'imagerie. Comme dans plusieurs gènes de paraparésie spastique comme *SPG7* (Pfeffer et al., 2015), une ataxie cérébelleuse peut être présente. Ce gène doit être inclus à l'avenir dans les gènes à séquencer dans le bilan d'une ataxie cérébelleuse autosomique récessive, surtout si un syndrome pyramidal avec spasticité est présent.

2.2.6. Dépôts de fer intra cérébraux et neurodégénérescence

L'entité correspondant à la « Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation » (NBIA) est caractérisée par la présence de dépôts de fer au niveau des noyaux gris centraux, visible sur la

séquence T2* sur une IRM cérébrale. Ces dépôts sont associés à différentes pathologies génétiques notamment la pantothenate kinase-associated neurodegeneration (PKAN, NBIA1) et *PLA2G6*-associated neurodegeneration (PLAN, NBIA2). D'autres pathologies génétiques comportent des dépôts de fer mais de façon moins fréquente dont *FA2H* (Schneider et Bathia, 2013). Notre étude a permis de montrer que les dépôts de fer intracérébraux n'étaient pas une caractéristique majeure de SPG35 (absence chez les 5 patients des 2 familles que nous avons analysées).

2.3. Capture ciblée de 57 gènes d'ataxies cérébelleuses et séquençage haut débit d'une série de 155 patients

2.3.1. Manuscrit 3 (accepté J. neurol.)

Mallaret M, Renaud M, Redin C, Drouot N, Muller J, Severac F, Mandel JL, Hamza W, Benhassine T, Ali-Pacha L, Tazir M, Durr A, Monin ML, Mignot C, Charles P, Van Maldergem L, Chamard L, Thauvin C, Laugel V, Burglen L, Fleury MC, Tranchant C, Anheim M, Koenig M. Validation of a clinical practice-based algorithm for the diagnosis of autosomal recessive cerebellar ataxias based on NGS identified cases.

Validation of a clinical practice-based algorithm for the diagnosis of autosomal recessive cerebellar ataxias based on NGS identified cases

Martial Mallaret^{1,2,3}, Mathilde Renaud^{2,3,4}, Claire Redin², Nathalie Drouot², Jean Muller^{2,5}, Francois Severac⁶, Jean Louis Mandel^{2,5,7}, Wahiba Hamza⁸, Traki Benhassine⁸, Lamia Ali-Pacha⁹, Meriem Tazir^{9,10}, Alexandra Durr^{11,12}, Marie-Lorraine Monin¹³, Cyril Mignot¹³, Perrine Charles¹⁴, Lionel Van Maldergem¹⁵, Ludivine Chamard¹⁶, Christel Thauvin-Robinet¹⁷, Vincent Laugel¹⁸, Lydie Burglen¹⁹, Patrick Calvas²⁰, Marie-Céline Fleury³, Christine Tranchant^{2, 3,4}, Mathieu Anheim^{*2,3,4}, Michel Koenig^{*21}.

¹Service de Neurologie, Centre Hospitalier de Haguenau, 67500 Haguenau, France

²Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), INSERM-U964/CNRS-UMR7104/Université de Strasbourg, 67404 Illkirch, France

³Département de Neurologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, hôpital de Hautepierre, 67098 Strasbourg cedex, France

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

⁵Laboratoire de Génétique Médicale, UMR_S INSERM U1112, IGMA, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

⁶Laboratoire de Biostatistique et d'Informatique Médicale, Faculté de Médecine, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.

⁷Chaire de Génétique Humaine, Collège de France, Illkirch, France

⁸Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Faculté des Sciences Biologiques, USTHB, Algiers, Algeria

⁹Département de Neurologie, Centre hospitalier universitaire Mustapha Pacha, Algiers, Algeria

¹⁰Laboratoire de Neurosciences, Université d'Alger, Algiers, Algeria.

¹¹Fédération de Génétique, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, F-75013, Paris, France

¹²Institut du cerveau et de la moelle épinière, INSERM U1127/CNRS UMR7225, Université de Paris VI, F-75013, Paris, France.

¹³ Département de Génétique et de Cytogénétique, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, F-75013, Paris, France.

¹⁴Département de Neurologie, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, F-75651, Paris, France.

¹⁵Centre de Génétique Humaine, Université de Franche-Comté, Besançon, France.

¹⁶Research Memory Center (CMRR), CHU Besançon, Besançon, France.

¹⁷Centre de Génétique, Hôpital d'Enfants, CHU Dijon and EA4271, Université de Bourgogne, Dijon, France

¹⁸Neuropédiatrie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, hôpital de Hautepierre, 67098 Strasbourg cedex, France

¹⁹Centre de Référence Malformations et Maladies congénitales du Cervelet, INSERM U1141, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris

²⁰Service de Génétique Médicale, Pavillon Ch Lefebvre, Hôpital Purpan-CHU de Toulouse, TSA 40031, 31059 Toulouse Cedex,

²¹Laboratoire de Génétique de Maladies Rares, Institut Universitaire de Recherche Clinique, EA 7402 Université de Montpellier, CHU Montpellier, 34093 Montpellier, France

* MA and MK have equally contributed to this work

Corresponding author: Mathieu Anheim

Postal address: Movement Disorders Unit, Department of Neurology, Hôpital de Hautepierre,
67098 Strasbourg, France Cedex

Phone : +33-3 88 12 87 11,

Fax: +33-3 88 12 85 33,

Email: mathieu.anheim@chru-strasbourg.fr

Keywords: recessive ataxia, next generation sequencing, neurogenetics, electromyography

Acknowledgments:

Sequencing was performed by the IGBMC Microarray and Sequencing platform, a member of the “France Génomique” consortium (ANR-10-INBS-0009). This study was supported by funds from the Agence Nationale pour la Recherche-Maladies Rares and Maladies Neurologiques et Psychiatriques (ANR-09-MNPS-001-01 to M.K. and A.D.), the ANR/E-rare JTC 2011 “Euro-SCAR” (2011-RARE-004-01 to M.K.) and the Agence de la Biomédecine (to J.-L.M.). M.R. was supported by a fellowship from the “Journées de Neurologie de Langue Française”.

ABSTRACT :

Background: Establishing a molecular diagnosis of autosomal recessive cerebellar ataxias (ARCA) is challenging due to phenotype and genotype heterogeneity. We report the validation of a previously published clinical practice-based algorithm to diagnose ARCA.

Methods: Two assessors performed a blind analysis to determine the most probable mutated gene based on comprehensive clinical and paraclinical data, without knowing the molecular diagnosis of 23 patients diagnosed by targeted capture of 57 ataxia genes and high throughput sequencing coming from a 145 patients series.

Results: The correct gene was predicted in 61% and 78% of the cases by the two assessors, respectively. There was a high inter-rater agreement ($K = 0.85$ [0.55 – 0.98] $p < 0.001$) confirming the algorithm's reproducibility.

Conclusion: Phenotyping patients with proper clinical examination, imaging, biochemical investigations and nerve conduction studies remains crucial for the guidance of molecular analysis and to interpret next generation sequencing results. The proposed algorithm should be helpful for diagnosing ARCA in clinical practice.

INTRODUCTION

Autosomal recessive cerebellar ataxias (ARCAs) are heterogeneous and complex inherited neurodegenerative disorders that affect the cerebellum, the spinal cord and the peripheral nerves. Molecular diagnosis of the ARCAs is challenging due to both phenotypic and genetic heterogeneity [1]. It was formerly a step by step approach with serial sequencing of several genes by the Sanger technique. The advent of affordable next generation sequencing (NGS) technologies allows now sequencing of exomes or large gene panels for diagnosis of rare neurological diseases such as ARCAs [2]. However, massive amount of data with multiple rare variants in several genes in a single patient increases the complexity of the analysis. A collaborative cross-talk between molecular geneticists and clinicians is even more necessary than before for NGS diagnosis validation in clinical practice. Age of onset, ataxia progression rate and careful clinical examination combined with laboratory, morphological and neurophysiological investigations (including vitamin E, alpha-fetoprotein (AFP), albumin, cholestanol, brain MRI, nerve conduction studies (NCS)) are useful for reaching a diagnostic conclusion. A new classification of ARCAs also has been established comprising 3 groups: ARCA with pure

sensory neuropathy, ARCA with sensorimotor axonal neuropathy and ARCA without neuropathy. An algorithm for the diagnosis of ARCAs based on these items has been proposed by our group according to personal experience and literature data [3] (Figure 1). We conducted a blind study to validate this clinical practice-based algorithm on a series of patients with molecular diagnosis of ARCA. These patients were part of a cohort of patients consecutively investigated with targeted capture sequencing of a panel of 57 ataxia genes.

PATIENTS AND METHODS

Between 2010 and 2012, 145 unrelated index patients were recruited in 12 tertiary centers for movement disorders: 130 in France and 15 in Algeria. Inclusion criteria for the NGS analysis were the combination of: 1) progressive cerebellar ataxia; 2) age at onset before 60 years; 3) molecular analysis negative for Friedreich ataxia and other investigations depending on clinical assessment; 4) recessive inheritance or sporadic cases. Written informed consent was obtained from all participants and local ethics committee approved the study. Hundred and forty five consecutive patients were analyzed by a targeted exon-capture strategy coupled with multiplexing and high-throughput sequencing of 57 genes causing ataxia when mutated (listed in supplementary file-A). Library preparation, targeted capture and sequencing were realized as previously reported [4]. NGS analysis is detailed in supplementary file-B [5].

Hundred and thirty four patients were presenting ataxia starting before 40 years and 11 patients had late onset ataxia, starting after 40 years. Our cohort was mainly comprised of sporadic cases: 85 patients (59%) had neither familial history of ataxia nor consanguinity. Fifty four patients (37%) had a recessive pedigree (2 or more affected in the kindred or isolated case with parental consanguinity). A molecular diagnosis was made in 27/145 patients (19%) with mutations in ARCA genes. Among the 27 patients with ARCA molecular diagnosis, 4 were excluded due to

the lack of available data. Molecular data of these 4 patients and clinical data of 118 patients without diagnosis are summarized in supplementary file C [6] and D, respectively.

We selected the remaining 23 ARCA patients with an established molecular diagnosis to assess the validity of the clinical practice-based algorithm. Two movement disorders specialists (MA, CT) performed independently a blind analysis based on the clinical (age at onset, current age, current disability based on scale of assessment and rating of ataxia (SARA) [7] score and/or spinocerebellar degeneration functional score (SDFS) [1], exhaustive clinical examination abnormalities including ocular motor signs, movements disorders, pyramidal signs, mental retardation) and paraclinical (biomarkers - especially vitamin E, AFP, albumin, cholestanol -, brain MRI, NCS findings) but molecular data: each patient had to be categorized in one of the three ARCA groups as described above and ranking of the two most probable disease causing genes was achieved. Inter-rater agreement was assessed by computing a weighted Kappa coefficient (K) with "squared" weights. All mutated genes affecting the 23 patients were ordered according to the data of the literature as followed on a ordinal scale to take account of the degree of disagreement (group without neuropathy: 1) *SYNE1* 2) *ANO10*, 3) *ADCK3*; group with pure sensory neuronopathy: 1) *POLG*, 2) *TTPA*; group with axonal sensorimotor neuropathy 1) *APTX*, 2) *SETX*, 3) *CYP27A1*, 4) *SACS*). Genes that showed larger number of associated phenotypic differences were separated by greater distance on the ordinal scale. Confidence interval was calculated using the adjusted bootstrap percentile (BCa) method based on 10000 replicates. A "z" test was performed to assess if the classification which produced the Kappa statistic is significantly better than a random result ($K = 0$). A p-value < 0.05 was considered statistically significant. Analyses were performed using R software version 3.1.0 (R Project for Statistical Computing) with the "irr" package.

RESULTS

Twenty three patients were investigated with the clinical-practice based algorithm. The age of onset ranged from 1 to 47 years (median: 16). Genetic analysis identified two pathogenic mutations in *ANO10* (6 patients), in *SETX* (4), in *SYNE1* and *ADCK3* (3 each), in *SACS* and *APTX* (2 each) and in *TTPA*, *CYP27A1*, *POLG* (1 each) (Table 1). The correct ARCA group was found in all patients by the two assessors. The gene ranked first by the first assessor (MA) was correct in 14/23 cases (61%) and 18/23 cases (78%) for the second assessor (CT). The most frequent error (11 errors/14) was misdiagnosis within the ARCA group without neuropathy probably due to the closely overlapping phenotypes of pure cerebellar ataxias (especially ARCA1, ARCA3 and to some extent ARCA2), with a wide range of age at onset. Five errors were shared by both experts. Considering the two most probable genes according to the assessors, the correct diagnosis was identified in 18/23 (78%) and 21/23 (91%), respectively. There was a high inter-rater agreement ($K = 0.85$ [0.55 – 0.98] $p < 0.001$) on the first gene ranked by the assessors confirming the algorithm's reproducibility.

DISCUSSION

We report on the validation of a clinical practice-based algorithm in a series of patients, based on a blind analysis of clinical and paraclinical data. Given the high percent of correct diagnosis in our study (the assessors were able to find the good molecular diagnosis in 2/3 and 3/4 of cases, respectively), it is expected that this algorithm will be useful in clinical practice for neurologists and geneticists. Moreover, the algorithm allowed us to identify nine distinct entities, including entities that belong to the 3 different groups of the new classification of ARCAs [3]. One hundred forty five patients suspected with ARCA were included in the study which is a high

number since Friedreich ataxia was previously excluded. Therefore, the evaluation of the 23 patients with a molecularly confirmed diagnosis is relevant.

Confirmation of diagnosis by NGS can be straightforward in presence of clear-cut mutations, even with few clinical data. However, NGS data analysis frequently reveals several variants of unknown significance especially missense mutations in one or more ARCA-causing genes. In these difficult cases, proper phenotyping of ARCA patients, including precise clinical examination, biochemical investigations, brain imaging and NCS, is still necessary for guidance of genetic analysis and interpretation of the NGS data: these data have to be in agreement with an already described phenotype in order to confirm the variant's pathogenicity. Similarly, appropriate knowledge of the several entities and of their description in the literature is recommended for the best management of such scarce diseases.

Despite the relevance of the algorithm, it is not infallible since few errors were made. *ANO10* and *SYNE1* mutations are responsible for close phenotypes [8-9] with pure cerebellar ataxia and slow progression and may be difficult to distinguish without genetic analysis especially because there is no biomarker. Some errors were therefore done during the blinded assessment regarding these entities. Such algorithm is limited by the presence of atypical phenotypes associated with mutations in known genes. For instance, most patients with autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix Saguenay (ARSACS) experience their first symptoms before 5 years of age, but in very few patients the first signs may occur after 20 or 30 years. Atypical phenotypes have also been reported regarding peripheral neuropathy which was lacking in 1/11 patient in a recent series of ARSACS [10]. Lack of neuropathy is also a rare feature in ataxia with oculomotor apraxia type 2 (AOA2), representing only 2.5% of cases in a series of 90 patients [11]. Only one patient with *ADCK3* confirmed mutations presented a mild axonal neuropathy (out of 34 patients

described in the literature [12-18]). In the same way, few patients with AOA2 or ataxia telangiectasia presented with the very unusual lack of elevated AFP serum level [11, 19]. However, the overall clinical and paraclinical assessment mostly lead to only a few possible diagnoses, confirming that the phenotype in one subtype of ARCA is relatively homogeneous. Few clinical findings (such as oculomotor apraxia, vertical supranuclear gaze palsy, spastic paraplegia, telangiectasia) as well as reliable biomarkers (such as vitamin E, AFP and albumin serum level) may also be suggestive of one or few diseases. The good results of our blinded assessment support this statement.

Herein, the percentage of positive diagnosis (19%) is similar to previous studies on NGS in cerebellar ataxias [2] but remains low for several reasons including selection of patients with onset before 60 years of age (whereas ARCAs mostly occur before 30), exclusion of patients with Friedreich ataxia, absence of important ataxia genes in the gene panel, such as *WFS1* and *SPG7*, and the fact that many genes have not been identified yet. It is also possible that a few sporadic cases have in fact polyglutamine SCA due to marked anticipation, particularly for SCA2 and SCA7. Polyglutamine expansions should therefore also be tested, along with Friedreich ataxia expansions.

Financial disclosure: The authors declare no financial disclosure related to the research covered by this article. Martial Mallaret received travel grants from Ipsen and Merz. Mathieu Anheim received honoraria and travel grants from Actelion.

Contributors : The final manuscript has been seen and approved by all authors, and all authors accepted full responsibility for the design and conduct of the case series, had access to the data, controlled the decision to publish and have no conflict of interest to declare.

M. Mallaret: acquisition and analysis of data, conception, organisation and execution of the research project, writing of the first draft, review and critique of the manuscript.

M. Renaud: acquisition and analysis of data, conception of the research project, review and critique of the manuscript.

C. Redin: conception, organization and execution of the research project

N. Drouot: conception, organization and execution of the research project, analysis of data

J. Muller: conception and organization of the research project, review and critique of the manuscript

F. Severac: design and execution of statistical analysis, review and critique of the manuscript

JL Mandel: conception and organization of the research project, review and critique of the manuscript

W. Hamza: acquisition and analysis of data, execution of the research project, review and critique of the manuscript

L. Ali-Pacha, T. Benhassine, L. Burglen, P. Calvas, L. Chamard, P. Charles , A. Durr, M.C. Fleury, V. Laugel, C. Mignot, M.L. Monin, M. Tazir, C. Thauvin-Robinet, L. Van Maldergem : acquisition of data, review and critique of the manuscript

C. Tranchant: execution of the research project, acquisition and analysis of data, review and critique of the manuscript.

M. Anheim: conception, organization and execution of the research project, acquisition and analysis of data, review and critique of the manuscript.

M. Koenig: conception, organisation and execution of the research project, analysis of data, review and critique of the manuscript.

Web resources

UCSC Genome Browser: <http://genome.ucsc.edu/index.html>

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

Exome Variant Server (EVS), NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA:
<http://evs.gs.washington.edu/EVS> [June, 2013]

<http://www.lbgi.fr/VaRank/>.

REFERENCES

1. Anheim M, Fleury M, Monga B, Laugel V, Chaigne D, Rodier G, Ginglinger E, Boulay C, Courtois S, Drouot N, Fritsch M, Delaunoy JP, Stoppa-Lyonnet D, Tranchant C, Koenig M (2010) Epidemiological, clinical, paraclinical and molecular study of a cohort of 102 patients affected with autosomal recessive progressive cerebellar ataxia from Alsace, Eastern France: implications for clinical management *Neurogenetics* 11:1-12.
2. Németh AH, Kwasniewska AC, Lise S, Parolin Schnekenberg R, Becker EB, Bera KD, Shanks ME, Gregory L, Buck D, Zameel Cader M, Talbot K, de Silva R, Fletcher N, Hastings R, Jayawant S, Morrison PJ, Worth P, Taylor M, Tolmie J, O'Regan M; UK Ataxia Consortium, Valentine R, Packham E, Evans J, Seller A, Ragoussis J (2013) Next generation sequencing for molecular diagnosis of neurological disorders using ataxias as a model. *Brain* 136:3106-3118.
3. Anheim M, Tranchant C, Koenig M (2012) The autosomal recessive cerebellar ataxias. *N Engl J Med* 366:636-646.

4. Redin C, Le Gras S, Mhamdi O, Geoffroy V, Stoetzel C, Vincent MC, Chiurazzi P, Lacombe D, Ouertani I, Petit F, Till M, Verloes A, Jost B, Chaabouni HB, Dollfus H, Mandel JL, Muller J (2012) Targeted high-throughput sequencing for diagnosis of genetically heterogeneous diseases: efficient mutation detection in Bardet-Biedl and Alström syndromes. *J Med Genet* 49:502-512.
5. Geoffroy V, Pizot C, Redin C, Piton A, Vasli N, Stoetzel C, Blavier A, Laporte J, Muller J (2015) VaRank: a simple and powerful tool for ranking genetic variants. *PeerJ* 3:e796. doi: 10.7717
6. Hamza W, Ali Pacha L, Hamadouche T, Muller J, Drouot N, Ferrat F, Makri S, Chaouch M, Tazir M, Koenig M, Benhassine T (2015) Molecular and clinical study of a cohort of 110 Algerian patients with autosomal recessive ataxia. *BMC Med Genet* 16:36.
7. Schmitz-Hübsch T, du Montcel ST, Baliko L, Berciano J, Boesch S, Depondt C, Giunti P, Globas C, Infante J, Kang JS, Kremer B, Mariotti C, Melegh B, Pandolfo M, Rakowicz M, Ribai P, Rola R, Schöls L, Szymanski S, van de Warrenburg BP, Dürr A, Klockgether T, Fancellu R (2006) Scale for the assessment and rating of ataxia: development of a new clinical scale. *Neurology* 66:1717-1720.
8. Renaud M, Anheim M, Kamsteeg EJ, Mallaret M, Mochel F, Vermeer S, Drouot N, Pouget J, Redin C, Salort-Campana E, Kremer HP, Verschuuren-Bemelmans CC, Muller J, Scheffer H, Dürr A, Tranchant C, Koenig M (2014) Autosomal recessive cerebellar ataxia type 3 due to ANO10 mutations: delineation and genotype-phenotype correlation study. *JAMA Neurol* 71:1305-1310.

9. Gros-Louis F, Dupré N, Dion P, Fox MA, Laurent S, Verreault S, Sanes JR, Bouchard JP, Rouleau GA (2007) Mutations in SYNE1 lead to a newly discovered form of autosomal recessive cerebellar ataxia. *Nat Genet* 39:80-85.
10. Synofzik M, Soehn AS, Gburek-Augustat J, Schicks J, Karle KN, Schüle R, Haack TB, Schöning M, Biskup S, Rudnik-Schöneborn S, Senderek J, Hoffmann KT, MacLeod P, Schwarz J, Bender B, Krüger S, Kreuz F, Bauer P, Schöls L (2013) Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix Saguenay (ARSACS): expanding the genetic, clinical and imaging spectrum. *Orphanet J Rare Dis* 8:41.
11. Anheim M, Monga B, Fleury M, Charles P, Barbot C, Salih M, Delaunoy JP, Fritsch M, Arning L, Synofzik M, Schöls L, Sequeiros J, Goizet C, Marelli C, Le Ber I, Koht J, Gazulla J, De Bleecker J, Mukhtar M, Drouot N, Ali-Pacha L, Benhassine T, Chbicheb M, M'Zahem A, Hamri A, Chabrol B, Pouget J, Murphy R, Watanabe M, Coutinho P, Tazir M, Durr A, Brice A, Tranchant C, Koenig M (2009) Ataxia with oculomotor apraxia type 2: clinical, biological and genotype/phenotype correlation study of a cohort of 90 patients. *Brain* 132:2688-2698.
12. Lagier-Tourenne C, Tazir M, López LC, Quinzii CM, Assoum M, Drouot N, Busso C, Makri S, Ali-Pacha L, Benhassine T, Anheim M, Lynch DR, Thibault C, Plewniak F, Bianchetti L, Tranchant C, Poch O, DiMauro S, Mandel JL, Barros MH, Hirano M, Koenig M (2008) ADCK3, an ancestral kinase, is mutated in a form of recessive ataxia associated with coenzyme Q10 deficiency. *Am J Hum Genet* 82:661-672.
13. Mollet J, Delahodde A, Serre V, Chretien D, Schlemmer D, Lombes A, Boddaert N, Desguerre I, de Lonlay P, de Baulny HO, Munnich A, Rötig A (2008) CABP1 gene

- mutations cause ubiquinone deficiency with cerebellar ataxia and seizures. *Am J Hum Genet* 82:623-630.
14. Gerards M, van den Bosch B, Calis C Schoonderwoerd K, van Engelen K, Tijssen M, de Coo R, van der Kooi A, Smeets H (2010) Nonsense mutations in *CABC1/ADCK3* cause progressive cerebellar ataxia and atrophy. *Mitochondrion*. 10: 510-515.
 15. Horvath R, Czermin B, Gulati S Demuth S, Houge G, Pyle A, Dineiger C, Blakely EL, Hassani A, Foley C, Brodhun M, Storm K, Kirschner J, Gorman GS, Lochmüller H, Holinski-Feder E, Taylor RW, Chinnery PF (2012) Adult-onset cerebellar ataxia due to mutations in *CABC1/ADCK3*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83: 174-178.
 16. Blumkin L, Leshinsky-Silver E, Zerem A, Yosovich K, Lerman-Sagie T, Lev D (2014) Heterozygous Mutations in the *ADCK3* Gene in Siblings with Cerebellar Atrophy and Extreme Phenotypic Variability. *JIMD Rep* 12:103-107.
 17. Mignot C, Apartis E, Durr A Marques Lourenço C, Charles P, Devos D, Moreau C, de Lonlay P, Drouot N, Burglen L, Kempf N, Nourisson E, Chantot-Bastaraud S, Lebre AS, Rio M, Chaix Y, Bieth E, Roze E, Bonnet I, Canaple S, Rastel C, Brice A, Rötig A, Desguerre I, Tranchant C, Koenig M, Anheim M (2013) Phenotypic variability in *ARCA2* and identification of a core ataxic phenotype with slow progression. *Orphanet J Rare Dis* 8: 173.
 18. Liu YT, Hersheson J, Plagnol V Fawcett K, Duberley KE, Preza E, Hargreaves IP, Chalasani A, Laurá M, Wood NW, Reilly MM, Houlden H (2014) Autosomal-recessive cerebellar ataxia caused by a novel *ADCK3* mutation that elongates the protein: clinical, genetic and biochemical characterisation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 85: 493-498.

19. Méneret A, Ahmar-Beaugendre Y, Rieunier G, Mahlaoui N, Gaymard B, Apartis E, Tranchant C, Rivaud-Péchoux S, Degos B, Benyahia B, Suarez F, Maisonobe T, Koenig M, Durr A, Stern MH, Dubois d'Enghien C, Fischer A, Vidailhet M, Stoppa-Lyonnet D, Grabli D, Anheim M (2014) The pleiotropic movement disorders phenotype of adult ataxia-telangiectasia. *Neurology* 83:1087-1095.
20. H'mida-Ben Brahim D, M'zahem A, Assoum M, Bouhlal Y, Fattori F, Anheim M, Ali-Pacha L, Ferrat F, Chaouch M, Lagier-Tourenne C, Drouot N, Thibaut C, Benhassine T, Sifi Y, Stoppa-Lyonnet D, N'Guyen K, Poujet J, Hamri A, Hentati F, Amouri R, Santorelli FM, Tazir M, Koenig M (2011) Molecular diagnosis of known recessive ataxias by homozygosity mapping with SNP arrays. *J Neurol* 258:56-67.
21. Lionnet C, Carra C, Ayrignac X, Levade T, Gayraud D, Castelnovo G, Besson G, Androdias G, Vukusic S, Confavreux C, Zaenker C, De Seze J, Collongues N, Blanc F, Tranchant C, Wallon D, Hannequin D, Gerdelat-Mas A, Brassat D, Clanet M, Zephir H, Outteryck O, Vermersch P, Labauge P (2014) Cerebrotendinous xanthomatosis: a multicentric retrospective study of 15 adults, clinical and paraclinical typical and atypical aspects. *Rev Neurol (Paris)* 170:445-453.

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7	Patient 8	Patient 9	Patient 10	Patient 11	Patient 12	
Geographical origin	French	French	Algerian	French	French	Portuguese	French	French	French	French	French	French	
Gender	F	M	F	M	M	M	M	F	F	F	F	M	
Age of onset (years)	27	27	7	10	5	15	33	37	30	32	32	30	
Age (years)	62	43	32	41	18	46	44	44	33	61	37	34	
SDFS (/7)	3	3	3	2	2	3	3	3	3	4	3	4	
SARA (/40)	18	13	21	12	ND	10	14	6,5	10	ND	10,5	16	
Upper motor neuron dysfunction	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	
Others symptoms	scoliosis	square wave jerks, horizontal ophthalmoparesis, unilateral ptosis	slow evolution, pes cavus	mild developmental delay	dysarthria, seizures, delayed growth	mild developmental delay	left hypoaacusia	tongue fasciculations, gaze evoked nystagmus	hypermetric saccades, ankle clonus	diplopia, dysphagia, gaze evoked nystagmus, increased reflexes	-	focal epilepsy since 18 with secondary generalization, mild dyscalculative syndrome	
Others individual affected in the family	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	
Reference			[6]			[17]	[8]	[8]	[8]	[8]	[8]		
Nerve conduction studies	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	normal	NID, no clinical signs of neuropathy	normal	normal	normal	
Cerebellar atrophy	+	NA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Other MRI findings	-	NA	-	global Brain atrophy	-	-	-	-	-	-	-	left parieto-occipital porencephalic cyst	
Biomarkers	-	-	-	-	lactate, pyruvate, CK, AFP normal	-	-	-	-	AFP: 12ng/ml	-	-	
Mutated gene	<i>SYNE1</i>	<i>SYNE1</i>	<i>SYNE1</i>	<i>ADCK3</i>	<i>ADCK3</i>	<i>ADCK3</i>	<i>ANO10</i>	<i>ANO10</i>	<i>ANO10</i>	<i>ANO10</i>	<i>ANO10</i>	<i>ANO10</i>	
Zigosity	homo	homo	homo	homo	het	het	het	het	homo	het	het	het	
Variant n°1/ cDNA variant / protein change	nonsense c.6978G>A p.L1p.2326* [exon 47]	donor splice site c.12315+1G>A p.Lle4047_Lys 4103del59 (predicted) [intron 76]	nonsense c.3736G>T p.Gln1246* [exon 30]	missense c.911C>T p.Ala304Val [exon 7]	missense c.895C>T p.Asp299Tyr [exon 7]	missense c.895C>T p.Asp299Tyr [exon 7]	missense c.685G>T p.Gly229Tyr [exon 6]	missense c.1214delT p.Lact405* [exon 7]	deletion of exon 12	missense c.1009T>G p.Phe337Val [exon 6]	missense c.512T>C p.Phe171Ser [exon 5]	missense c.1009T>G p.Phe337Val [exon 6]	missense c.132dupA, p.Asp45Argfs*9 [exon 2]
Variant n°2/ cDNA variant / protein change					missense c.1651G>A p.Gln51Lys [exon 14]	frameshift c.1358delT p.Leu453Arg (fs*24 [exon 11])	nonsense c.1291C>T p.Gln431* [exon 8]	donor splice site c.1476+1G>T; p.Ser432_Lent9 2del61 [exon 9]	frameshift c.132dupA, p.Asp45Argfs*9 [exon 2]	frameshift c.132dupA, p.Asp45Argfs*9 [exon 2]	frameshift c.132dupA, p.Asp45Argfs*9 [exon 2]	frameshift c.132dupA, p.Asp45Argfs*9 [exon 2]	
Results first assessor/gene n°1	<i>SYNE1</i>	<i>SYNE1</i>	<i>ADCK3</i>	<i>SYNE1</i>	<i>ANO10</i>	<i>SYNE1</i>	<i>ANO10</i>	<i>ANO10</i>	<i>ANO10</i>	<i>ATM</i>	<i>SYNE1</i>	<i>POLG</i>	
Results second assessor/gene n°1	<i>SYNE1</i>	<i>SYNE1</i>	<i>ADCK3</i>	<i>ANO10</i>	<i>ADCK3</i>	<i>SYNE1</i>	<i>ANO10</i>	<i>ANO10</i>	<i>SYNE1</i>	<i>ANO10</i>	<i>SYNE1</i>	<i>ADCK3</i>	
Results second assessor/gene n°2	<i>ANO10</i>	<i>ANO10</i>	<i>ANO10</i>	<i>ADCK3</i>	<i>ANO10</i>	<i>ANO10</i>	<i>SYNE1</i>	<i>SYNE1</i>	<i>SYNE1</i>	<i>SYNE1</i>	<i>SYNE1</i>	<i>ANO10</i>	

	Patient 13	Patient 14	Patient 15	Patient 16	Patient 17	Patient 18	Patient 19	Patient 20	Patient 21	Patient 22	Patient 23
Geographical origin	Algerian	French	Lebanese	Algerian	French	French	French	French	French	French	Algerian
Gender	M	M	M	M	M	M	M	M	M	F	F
Age of onset (years)	17	47	16	7	15	13	adulthood	12	29	1	3
Age (years)	23	60	51	15	25	26	67	33	33	42	39
SDHS (/7)	3	3	5	4	4	4	6	3	5	5	4
SARA (/40)	NID	11.5	NID	NID	NID	21.5	NID	NID	7.5	NID	12
Upper motor neuron dysfunction	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Others symptoms	head tremor, cerebellar and proprioceptive ataxia, abolished reflexes	cerebellar and proprioceptive ataxia, external ophthalmoplegia, abolished reflexes, absence of vibration sense	decreased vibration sense, abolished reflexes, intellectual deterioration, abnormal ocular movements	oculomotor apraxia	oculomotor apraxia	oculomotor apraxia	-	oculomotor apraxia	developmental delay, epilepsy since early childhood	-	cataract at 37, spasticity in lower limbs
Others individual affected in the family	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
Reference	[6]		[20]	[6]					[21]		
Nerve conduction studies	normal	axonal sensory neuropathy	mild axonal sensorimotor neuropathy with sensory predominance	axonal sensory neuropathy	axonal sensorimotor neuropathy with sensory predominance	axonal sensorimotor neuropathy	axonal sensorimotor neuropathy	axono-myelinate sensorimotor neuropathy	axonal sensorimotor neuropathy	axonal sensorimotor neuropathy	demyelinating sensorimotor neuropathy
Cerebellar atrophy	-	+	+	NA	-	+	NA	+	-	+	NA
Other MRI Findings	-	-	vermis atrophy	-	-	-	NA	-	-	-	NA
Biomarkers	NA	-	hypercholesterolemia	-	AFP: 50ng/ml	AFP: 13ng/ml	AFP: 32ng/ml	AFP: 90ng/ml	increased cholestanol	-	-
Mutated gene	<i>TTP4</i>	<i>POLG</i>	<i>APTX</i>	<i>APTX</i>	<i>SETX</i>	<i>SETX</i>	<i>SETX</i>	<i>SETX</i>	<i>CYP27A1</i>	<i>SACS</i>	<i>SACS</i>
zignosity	homo	het	homo	homo	het	het	homo	het	homo	het	homo
variant n°1/ cDNA variant / protein change	frameshift c.744delA	missense c.1880G>A	missense c.781C>T	nonense c.837G>A	nonense c.4075C>T	missense c.986G>C	frameshift c.5075delT	nonense c.4087C>T	missense c.1016C>T	nonense c.12973C>T	missense c.12220G>C
	p.Gli(249)Asnfs*	p.Ang(27)Gln	p.Leu(261)Phe	p.Trp(279)*	p.Gln(1359)*	p.Ang(320)Pro	p.Leu(692C)Gfs*	p.Ang(1363)*	p.Trh(339)Val	p.Ang(45325)*	p.Ah(4074)Pro
	15 [exon 5]	[exon 10]	[exon 6]	[exon 6]	[exon 10]	[exon 6]	15 [exon 8]	[exon 8]	[exon 5]	[exon 10]	[exon 10]
variant n°2/ cDNA variant / protein change		missense c.2243G>C p.Trp(748)Ser			missense c.6694C>T p.Ang(2232C)Gfs	missense c.7331G>A p.Ang(2444)His		nonense c.5617G>T p.Gln(1873)*		frameshift c.1358delG p.Gly(453)Valfs*	
		p.Trp(748)Ser			[exon 21]	[exon 24]		[exon 11]		25 [exon 8]	
Results first assessor/ gene n°1	<i>TTP4</i>	<i>POLG</i>	<i>POLG</i>	<i>ATM</i>	<i>SETX</i>	<i>SETX</i>	<i>SETX</i>	<i>SETX</i>	<i>CYP27A1</i>	<i>SACS</i>	<i>SACS</i>
Results first assessor/ gene n°2	<i>POLG</i>	<i>AVED</i>	<i>ANO10</i>	<i>APTX</i>	<i>ATM</i>	<i>ATM</i>	<i>ATM</i>	<i>ATM</i>	<i>POLG</i>	<i>SACS</i>	<i>CYP27A1</i>
Results second assessor/ gene n°1	<i>TTP4</i>	<i>POLG</i>	<i>POLG</i>	<i>APTX</i>	<i>SETX</i>	<i>SETX</i>	<i>SETX</i>	<i>SETX</i>	<i>POLG</i>	<i>SACS</i>	<i>SACS</i>
Results second assessor/ gene n°2	<i>POLG</i>	<i>SETX</i>	<i>APTX</i>	<i>ATM</i>	<i>ATM</i>	<i>ATM</i>	<i>ATM</i>	<i>ATM</i>	<i>APTX</i>	<i>CYP27A1</i>	<i>CYP27A1</i>

Table 1: Gene ranking based on the clinical practice-based algorithm.

The clinical features of the 23 ataxic patients presented in table 1 were available for the two assessors for a blinded study, in a random way. The first selected gene is bolded when correctly ranked by the assessor. Some patients were already published: patients 3, 13 and 16 [6], patient 6 (patient 4 [17]), patients 7-8-9-10-11 (case 2, 4, 5, 6, 9 respectively [8]), patient 15 (case 28 [20]) and patient 21 (case 13 [21]). het : compound heterozygous; homo : homozygous; M: male; F: female; SARA : scale for the assessment and rating of ataxia; SDFS : spinocerebellar degeneration functional score; AFP : alpha fetoprotein (normal range is less than 7ng/ml); NA : not available. In biomarkers section, “–“ means no abnormalities in biomarkers tested. Biochemical tests were performed prior to NGS analysis.

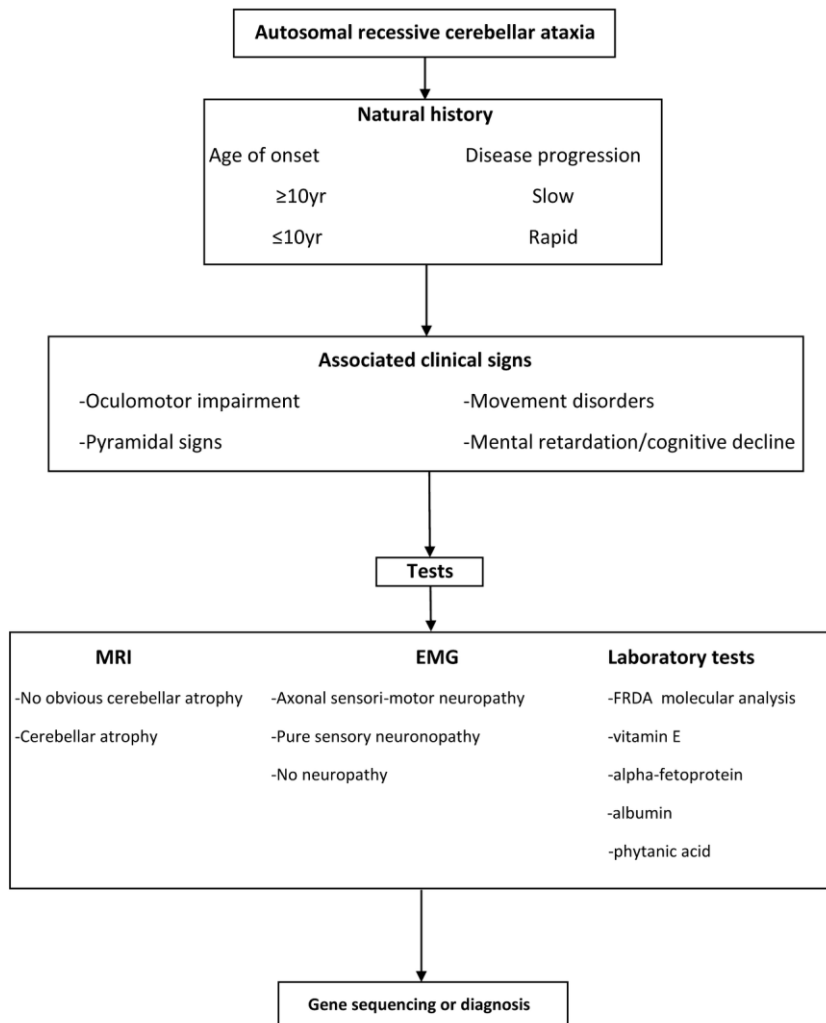


Figure 1 : Algorithm for the diagnosis of autosomal recessive cerebellar ataxias (simplified and adapted[3]). Combination of natural history, associated clinical signs and paraclinical data (such as brain MRI, electroneuromyography and biomarkers) leads to one or a few diagnosis. Abbreviations: yr: years ; EMG: electroneuromyography; FRDA: Friedreich's ataxia.

Figure 1: Algorithm for the diagnosis of autosomal recessive cerebellar ataxias (simplified and adapted [3]). The combination of natural history, associated clinical signs and paraclinical data (such as brain MRI, nerve conduction studies and several biomarkers) leads to one or a few diagnosis. Abbreviations: yr: years; EMG: electroneuromyography.

Supplementary file:

Supplementary file-A: Panel of 57 ataxia mutated genes

<i>ABCB7</i>	
<i>ABHD12</i>	<i>NPC1</i>
<i>ADCK3</i>	<i>NPC2</i>
<i>AFG3L2</i>	<i>OFD1</i>
<i>AHII</i>	<i>PDYN</i>
<i>AMACR</i>	<i>PEX2</i>
<i>AN010</i>	<i>PEX7</i>
<i>APTX</i>	<i>PHYH</i>
<i>ARL13B</i>	<i>PLA2G6</i>
<i>ATCAY</i>	<i>PMM2</i>
<i>ATM</i>	<i>POLG</i>
<i>C10ORF2</i>	<i>PRICKLE1</i>
<i>CA8</i>	<i>PRKCG</i>
<i>CC2D2A</i>	<i>SACS</i>
<i>CSTB</i>	<i>SETX</i>
<i>CYP27A1</i>	<i>SIL1</i>
<i>FGF14</i>	<i>SPTBN2</i>
<i>FLVCR1</i>	<i>SYNE1</i>
<i>FXN</i>	<i>SYT14</i>
<i>GALC</i>	<i>TCTN1</i>
<i>GLB1</i>	<i>TDPI</i>
<i>HEXA</i>	<i>TMEM67</i>
<i>HEXB</i>	<i>TTBK2</i>
<i>INPP5E</i>	<i>TTPA</i>
<i>ITPR1</i>	<i>VLDLR</i>
<i>KCNC3</i>	<i>WWOX</i>
<i>KIAA0226</i>	
<i>KIF7</i>	
<i>L2HGDH</i>	
<i>MTPAP</i>	
<i>MTTP</i>	
<i>MRE11A</i>	

Supplementary file-B: Variants Analysis of NGS data

Variant nucleotides were evaluated with the Varank program [5]. Splice site mutations were further evaluated with the SplicePort program (<http://spliceport.cbc.umd.edu/>). Mutations were confirmed by conventional Sanger sequencing and segregation studies were done whenever possible to confirm or exclude a variant. The sequencing data led to the identification of 2724 non redundant variations, including 48 frameshifts, 15 nonsenses, 474 missenses, 363 synonymous, 23 in-frame, 140 in 3' or 5' UTR and 1661 intronic variants. Each patient had on average 331 variants (+/-51).

Supplementary file-C: Clinical and molecular data of the patients without evaluation by the clinical practice-based algorithm, due to lack of clinical (SDFS score) and paraclinical (nerve conduction studies, biomarkers) data.

	Patient24 (already published[6])	patient 25	patient 26	patient 27
Age of Birth onset		24	3	unknown
Age	15	70	24	51
Cerebellar ataxia	Yes	Yes	Yes	yes
Other clinical features	spastic psychomotor delay	gait writer's decreased sense	cramp vibration myoclonus	foot dystonia dystonia polyneuropathy (diabetes)
SDFS	6	5	ND	ND
Other affected in the family	No	Yes	No	no
Biomarkers	ND	ND	severe decrease in A/total hexosaminidase	AFP 17ng/ml
Gene	<i>SIL1</i>	<i>SYNE1</i>	<i>HEXB</i>	<i>ATM</i>
Zygoty	Homozygous	compound heterozygous	compound heterozygous	compound heterozygous
Mutations	c.1285T>G [exon 11], p.Tyr429Asp	c.2776A>T [exon 24], p.Lys926* c.659T>C [exon 9], p.Phe220Ser	deletion of exons 1-5 c.1367A>C [exon11], p.Tyr456Ser	c.2921+1G>A [intron 19] c.6115G>A [exon42], p.Glu2039Lys
Affected domain (for missense mutations)	near ER retrieval sequence	actin domain	binding chain A domain	FAT domain

Supplementary file-D: Comparative clinical data from patients with a molecular diagnosis (positive patients) and without (negative patients) in our series.

	positive patients	negative patients
Number	23	118
age of onset (median)	16	13
cerebellar atrophy	16/19 (84%)	63/81 (77%)
Polyneuropathy	10/22 (45%)	23/60 (38%)

2.3.2. Manuscrit 4

Renaud M, Anheim M, Kamsteeg EJ, **Mallaret M**, Mochel F, Vermeer S, Drouot N, Pouget J, Redin C, Salort-Campana E, Kremer HP, Verschuuren-Bemelmans CC, Muller J, Scheffer H, Durr A, Tranchant C, Koenig M. Autosomal recessive cerebellar ataxia type 3 due to ANO10 mutations: delineation and genotype-phenotype correlation study. *JAMA Neurol.* 2014 Oct;71(10):1305-10.

Autosomal recessive cerebellar ataxia type 3 due to *ANO10* mutations: delineation and genotype-phenotype correlation study

Mathilde Renaud^{1,2,9*}, Mathieu Anheim^{1,2,9*}, Erik-Jan Kamsteeg³, Martial Mallaret^{1,2,9}, Fanny Mochel^{4,5}, Sascha Vermeer³, Nathalie Drouot², Jean Pouget⁶, Claire Redin², Emmanuelle Salort-Campana⁶, Hubertus PH Kremer⁷, Corien C Verschuuren-Bemelmans⁷, Jean Muller², Hans Scheffer³, Alexandra Durr^{4,5}, Christine Tranchant^{1,2,9**}, Michel Koenig^{2,8**}

*M.R. and M.A. contributed equally to this manuscript as first author

**C.T. and M.K. contributed equally to this manuscript as last author

¹Département de neurologie, hôpitaux universitaires de Strasbourg, hôpital de Hautepierre, 67098 Strasbourg cedex, France

²Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), INSERM-U964/CNRS-UMR7104/Université de Strasbourg, 67404 Illkirch, France

³Department of Human Genetics, Radboud University Medical Centre, 6500 HB Nijmegen, The Netherlands

⁴Université Pierre et Marie Curie Paris 6, Centre de recherche de l'institut du cerveau et de la moelle épinière, UMR-S975, 75005 Paris, France

⁵AP-HP, Hôpital de la Salpêtrière, Département de Génétique et Cytogénétique, 75013 Paris, France

⁶Département de neurologie, hôpitaux universitaires de Marseille, hôpital de la Timone, 13385 Marseille cedex 5, France

⁷Department of Neurology, Radboud University Medical Centre, Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour, 6500 HB Nijmegen, The Netherlands

⁸Laboratoire de Génétique des Maladies Rares, INSERM UMR_S 827, Institut Universitaire de Recherche Clinique, 34093 Montpellier, France

⁹Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

Corresponding author: Michel Koenig

Postal address: Laboratoire de Génétique des Maladies Rares, INSERM UMR_S 827, Institut Universitaire de Recherche Clinique, 641 Avenue du Doyen Gaston Giraud, 34093 Montpellier cedex5, France (present address).

E-mail: michel.koenig@inserm.fr

Word count: 2392

Abstract

Importance: *ANO10* mutations have been reported to cause a novel form of autosomal recessive cerebellar ataxia (ARCA). Our objective was to report 9 ataxic patients carrying 8 novel *ANO10* mutations to improve the delineation of this form of ARCA and provide genotype/phenotype correlation.

Observations: *ANO10* has been sequenced in 186 consecutive ARCA patients. Detailed phenotype of patients with *ANO10* mutations was investigated and compared to the 12 previously reported cases. Mean age at onset was 33 (17-43) and disease progression was slow. Cortico-spinal tract signs were frequent including extensor plantar reflexes and/or diffuse tendon reflexes and/or spasticity. No patient of our series had peripheral neuropathy. Brain MRI showed marked cerebellar atrophy. The most frequent mutation, a mononucleotide expansion from a polyA repeat tract (c.132dupA) and causing protein truncation, was never observed in homozygosity. Only two truncating mutations were reported in homozygosity, one of which (c.1150-1151del) was associated with juvenile/adolescent onset and mental retardation while we show that the presence of at least one missense or also in-frame mutation is associated with adult onset and slow progression.

Conclusions and relevance: *ANO10* defect is responsible for ARCA mainly characterized by cerebellar atrophy and lack of peripheral neuropathy. We therefore suggest naming this entity ARCA3.

Autosomal recessive cerebellar ataxias (ARCAs) correspond to a heterogeneous group of inherited neurodegenerative disorders that affect the cerebellum and/or the peripheral nerves¹. A new classification of ARCA has been proposed including 3 groups: ARCA with pure sensory neuropathy, ARCA with sensorimotor axonal neuropathy and ARCA without neuropathy². Recently, a new form of ARCA due to mutations in *ANO10* has been reported³. To which group of the classification does this new entity belong and whether genotype/phenotype correlation may be proposed has not yet been elucidated. We report 9 unrelated patients carrying 8 novel *ANO10* mutations, and we compared these patients with the 12 previously reported cases in order to provide the delineation of the disease and to provide genotype/phenotype correlations.

Patients and Methods

Between 2010 and 2013, 186 unrelated index patients were consecutively recruited in 4 tertiary centers for inherited neurodegenerative disorders. Inclusion criteria were the combination of 1) sporadic or recessive progressive cerebellar ataxia; 2) age at onset before 50 years; 3) unknown aetiology despite extensive investigations including molecular analysis for Friedreich ataxia and obvious forms of recessive ataxias. Written informed consent was obtained from all participants. Participants were not financially compensated. The recessive ataxia research project was approved by the Strasbourg ethics committee. A detailed neurological examination including scales of severity and brain MRI were done in all patients.

Genetic analysis of *ANO10* was performed in 44 patients by conventional Sanger sequencing. Hundred and forty-two additional patients were directly analyzed by a targeted exon-capture strategy coupled with multiplexing and high-throughput sequencing of 57 genes causing ataxia when mutated, including *ANO10*. Splice sites mutations were evaluated with the SplicePort

program (<http://spliceport.cbcb.umd.edu/>) and were analyzed by reverse transcription of RNA from patients' fibroblasts followed by PCR from exons 8 to 11 (520 bp fragment) and from exons 6 to 12 (809 bp fragment). PCR fragments were visualized on agarose gels and sequenced by the Sanger method.

The patients from this and previous studies were divided into 2 groups according to the type of the *ANO10* mutation: 1) at least one missense or in-frame mutation, 2) truncating mutations. The 2 groups were compared with the Student's t test.

Results

The clinical, radiological and biological findings of the nine patients are shown in Table 1 and Figure 1.

Among the 186 patients, nine (5%) had *ANO10* mutations. All nine *ANO10* patients had obvious cerebellar atrophy on brain MRI and the lack of peripheral neuropathy. From a subgroup of 56 patients (19 recessive and 37 sporadic, mean age at onset 23 years, range 2-50 years) for whom cerebellar atrophy and lack of peripheral neuropathy were documented, six (11%) had *ANO10* mutations.

***ANO10* Mutations**

The nine patients carried eight novel and one previously reported *ANO10* mutations (Table 1). The c.132dupA mutation was identified in four unrelated patients. The mutation is an insertion of an A (adenine nucleotide) following a homopolymer of 9 As and can be considered as a mononucleotide expansion of a mononucleotide repeat tract. Indeed, the c.132dupA mutation is a frequent mutation with a heterozygous carrier frequency of 1/184 in different ethnic groups

(Exome Variant Server; <http://evs.gs.washington.edu/EVS>) and probably arose by multiple homopolymer instability events. The c.132dupA mutation leads to early protein truncation (p.Asp45Argfs*9). Surprisingly, all four patients with this mutation were compound heterozygous and no homozygous c.132dupA patient was identified. The three identified missense mutations, p.Phe171Ser, p.Gly229Trp and p.Phe337Val, are likely pathogenic because they affect amino acid positions that are conserved in the orthologous sequences of almost all metazoan species (Figure 2A). The p.Gly229Trp mutation is located at the C-terminal border of the first alpha-helical transmembrane segment and the p.Phe337Val mutation is located at the C-terminal border of the third transmembrane segment. RT-PCR analysis of the two donor splice site mutations (Figure 2B and C) revealed complete alteration of the splice sites. Surprisingly, skipping of the mutated exon or usage of cryptic splice sites resulted in all cases in in-frame transcripts. The deletion mutation (deletion of exon 12), identified in three unrelated patients, is also in frame.

Phenotype/genotype comparison with published patients (Figure 2D), revealed that the age at onset was higher in patients with at least one missense or in-frame exon skipping mutation than in patients with two truncating mutations (homozygous c.1050_1051del and homozygous p.Tyr203*) ($p < 0.01$).

Comments

Although electrophysiological signs of lower motor neuron involvement in lower limbs were found in a few patients^{3,4} and case 3, none of the 21 reported patients had polyneuropathy, which classifies *ANO10*-linked ataxia among the group of cerebellar ataxias without

neuropathy³. Since ARCA1^{5,6} and ARCA2⁷ are already representatives of this group, we propose to name this new entity ARCA3 (autosomal recessive cerebellar ataxia type 3) (Table 2).

Mean age at onset is late in our series (including 8 patients with onset > 25), but overall, age at onset in ARCA3 appears highly variable, ranging from 6 to 43 years. Disease progression is slow with patients remaining ambulatory up to 25 years after the onset of the disease. However it may be more severe as in our patient 4 who needed one stick for walking after 7 years of disease duration. Lower limb reflexes appeared to be always increased, but extensor plantar reflexes, mental retardation or cognitive decline were variably present (see ^{3, 4, 8}, and Table 1). Two patients exhibited spasticity, therefore ARCA3 should also be considered in case of spastic ataxia. One patient (case 9) reported paroxysmal episodes of ataxia and vertigo, which could be explained by the abnormal function of mutated ANO10 which is a putative calcium-activated chloride channel⁹. No extra-neurological signs were found in our series.

Alpha-fetoprotein serum level, which is known to be a reliable biomarker for AOA2¹⁰ and ataxia telangiectasia, was mildly increased in two cases. Whether alpha-fetoprotein could be a biomarker for ARCA3 remains to be elucidated by further large studies.

Overall, we report an ARCA3 phenotype in accordance with previous reports, and more precisely define a core picture that should be kept in mind when facing a patient with recessive/sporadic ataxia. ARCA3 appears to be a common cause of recessive ataxias. While the frequency is accounted in part by the high frequency of the major mutation, c.132dupA, which belongs to the group of unstable sequences, this mutation is under-represented in ARCA3 patients with respect to the other mutations that are at least 10 fold less frequent (<http://evs.gs.washington.edu/EVS>). The fact that all patients with this mutation were compound heterozygotes and that no homozygous c.132dupA patient was identified suggests that

c.132dupA homozygotes are either not viable or have a more severe phenotype, similar to the p.Arg141His mutation of phosphomannomutase 2 in the congenital disorder of glycosylation type Ia¹¹. In accordance with this correlation is the fact that all six previously reported patients with the homozygous truncating mutation c.1150-1151del^{3,4} have a significantly earlier age of onset (juvenile/adolescent onset associated with mental retardation) compared to the patients with at least one missense or one in-frame mutation (Figure 2D), and who have adult onset, slow progression and persistence of ambulation over a long disease duration. However, the recently reported patient⁸, homozygous for the truncating non-sense mutation p.Tyr203*, does not fit with this correlation since he had onset at 42/46 years of age. It is nevertheless interesting to note that the only two reported homozygous truncating mutations (p.Tyr203* and c.1150-1151del) both lie in exon 6, which is in-frame and differentially spliced *in vivo* (absent from isoform 2 of ANO10; <http://www.uniprot.org/uniprot/>). It is possible that these two mutations variably affect differential splicing (or cryptic splice site activation, as in patient 1 of this study) of exon 6 and result in production of in-frame transcripts, since the two mutations are located close the acceptor and donor splice sites, respectively, of exon 6. Such a mechanism would explain the differential consequence of homozygous truncating mutations p.Tyr203* and c.1150-1151del and the absence of homozygous truncating mutations c.132dupA, despite the high frequency of heterozygote carriers (1/184). RNA studies of the p.Tyr203* and c.1150-1151del homozygous patients are warranted to solve this issue.

In conclusion, ARCA3, which major mutation is a mononucleotide expansion from a mononucleotide repeat tract, is not a rare form of recessive cerebellar ataxia. It should be considered in case of progressive cerebellar ataxia with cerebellar atrophy but without peripheral neuropathy even in sporadic cases and whatever the age of onset.

Acknowledgments:

The final manuscript has been seen and approved by all authors, and all authors accepted full responsibility for the design and conduct of the case series, had access to the data, controlled the decision to publish and have no conflict of interest to declare. This study was supported by funds from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Agence Nationale pour la Recherche-Maladies Rares and Maladies Neurologiques et Psychiatriques (ANR-09-MNPS-001-01 to M.K.), the ANR/E-rare JTC 2011 “Euro-SCAR” (2011-RARE-004-01 to M.K.). M.R. was supported by a fellowship from the “Journées de Neurologie de Langue Française”.

References

1. 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*. 2010; 11(1):1-12.
2. Anheim M, Tranchant C, Koenig M. The autosomal recessive cerebellar ataxias. *N Engl J Med*. 2012; 366(7):636-46.
3. Vermeer S, Hoischen A, Meijer RP, et al. Targeted next-generation sequencing of a 12.5 Mb homozygous region reveals ANO10 mutations in patients with autosomal-recessive cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet*. 2010; 87(6):813–819.
4. Chamova T, Florez L, Guergueltcheva V, et al. ANO10 c.1150_1151del is a founder mutation causing autosomal recessive cerebellar ataxia in Roma/Gypsies. *J Neurol*.

2012 ; 259(5):906-11.

5. Gros-Louis F, Dupré N, Dion P, et al. Mutations in SYNE1 lead to a newly discovered form of autosomal recessive cerebellar ataxia. *Nat Genet.* 2007; 39(1):80-5.
6. Izumi Y, Miyamoto R, Morino H, et al. Cerebellar ataxia with SYNE1 mutation accompanying motor neuron disease. *Neurology.* 2013; 80(6):600-1.
7. Lagier-Tourenne C, Tazir M, López 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(3):661-72.
8. Maruyama H, Morino H, Miyamoto R, et al. Exome sequencing reveals a novel ANO10 mutation in a Japanese patient with autosomal recessive spinocerebellar ataxia. *Clin Genet.* 2013; 10.1111/cge.12140.
9. Duran C, Hartzell HC. Physiological roles and diseases of Tmem16/Anoctamin proteins: are they all chloride channels? *Acta Pharmacol Sin.* 2011; 32(6):685-92.
10. Anheim M, Monga B, Fleury M, et al. Ataxia with oculomotor apraxia type 2: clinical, biological and genotype/phenotype correlation study of a cohort of 90 patients. *Brain* 2009; 132:2688-98.
11. Matthijs G, Schollen E, Van Schaftingen E, et al. Lack of homozygotes for the most frequent disease allele in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1A. *Am. J. Hum. Genet.* 1998; 62:542-50.

Table 1. Main clinical, molecular, morphologic and electrophysiologic features of nine patients carrying 8 novel *ANO10* mutations.

	Case 1	Case 2	Case 3	Case4	Case 5	Case 6	Case 7	Case 8	Case 9
Age at onset	17	33	40	37	30	32	43	33	32
Age at examination	23	44	47	43	33	59	68	52	37
Sex	F	M	M	F	F	F	M	F	F
Ethnic origin	Caucasian (Turkish)	Caucasian (French)	Caucasian (French)	West Indies	West Indies	Caucasian (French)	Caucasian (Dutch)	Caucasian (Dutch)	Caucasian (French)
First sign	Cerebellar dysarthria	Gait ataxia	Gait ataxia	Gait ataxia	Gait ataxia	Diplopia	Ataxia with vertigo	Ataxia	Ataxia, vertigo, cephalalgia
Ataxia	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tendon reflexes	Increased	Increased	Increased	Increased	Increased	Increased	Normal	Increased	Increased
Plantar reflexes	Flexor	Extensor	Flexor	Flexor	Flexor	Flexor	Flexor	Extensor	Extensor
Ocular motor findings	Gaze evoked nystagmus and hypermetric saccades	Gaze evoked nystagmus	Vertical nystagmus	Gaze evoked nystagmus	Hypermetric saccades	Gaze evoked nystagmus	Downbeat nystagmus, slow saccades	Vertical and horizontal nystagmus	Saccadic pursuit
Other	Linguistic difficulties in French	Left hypoacusia since age 20	Lower limb spasticity	Tongue fasciculations	Ankle clonus	Diplopia, dysphagia	Stridor, anxiety		Lower limb spasticity, paroxysmal limb weakness
Cognitive status	Normal	normal	Normal	Normal	normal	normal	MMS 19/29	Mild intellectual disabilities	normal
SARA	11	14	ND	6.5	10	ND	ND	ND	10.5
ICARS	27	44	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SDFS	3	4	4	3	3	4	ND	ND	3

Table 1 continued

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5	Case 6	Case 7	Case 8	Case 9
EMG	Normal	Normal	Motor neuron involvement in tibialis anterior	Normal	ND	Normal	ND	ND	Normal
Ophthalmic examination with fundus	Normal	Normal	Normal	ND	Normal	ND	Normal	Normal	Normal
MRI	Diffuse cerebellar atrophy at age 23	Diffuse cerebellar atrophy at age 43	Diffuse cerebellar atrophy at age 47	Cerebellar atrophy at age 43	Moderate cerebellar atrophy at 33	Cerebellar atrophy at 59	Cerebellar atrophy at 40	Cerebellar atrophy at 34	Cerebellar atrophy at 34
Alpha fetoprotein (n<7 µg/l)	Normal	Normal	Increased (16.6 µg/l)	Normal	Normal	Increased (11.8 µg/l)	ND	Normal	Normal
Mutations	Homozygous: donor splice site: c.1668+1G>A (exon 10)	Compound heterozygous: -missense :c.685G>T, p.Gly229Trp (exon 6) -non sense c.1291C>T, p.Gln431* (exon 8)	Compound heterozygous: -missense c.1009T>G, p.Phe337Val (exon 6) -frameshift c.132dupA, p.Asp45Argfs*9 (exon 2)	Compound heterozygous: -frameshift c.1214delT, p.Leu405* (exon 7) -donor splice site c.1476+1G>T (exon 9)	Homozygous deletion exon 12	Compound heterozygous: -missense c.1009T>G, p.Phe337Val (exon 6) -frameshift c.132dupA, p.Asp45Argfs*9 (exon 2)	Homozygous deletion exon 12	Compound heterozygous: -deletion exon 12 -frameshift c.132dupA, p.Asp45Argfs*9 (exon 2)	Compound heterozygous: -missense : c.512T>A, p.Phe171Ser (exon 5) -frameshift c.132dupA, p.Asp45Argfs*9 (exon 2)

EMG, electroneuromyography; ICARS, International Cooperative Ataxia Rating Scale; ND, not done; SARA, Scale for the Assessment and Rating of Ataxia; SDFS, Spinocerebellar Degeneration Functional Score.

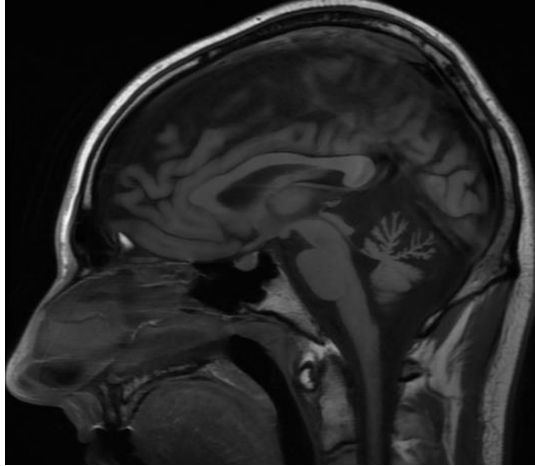
Table 2. Clinical and genetic characteristics of ARCA1, ARCA2 and ARCA3.

	ARCA1	ARCA2	ARCA3
Age at onset	17-45 (mean 32)	1-11 (mean 4)	6-45 (mean 21)
Cerebellar ataxia	Always present	Always present	Always present
Other optional clinical features	Enhanced tendon reflexes	Mental retardation, myoclonus, epilepsy stroke like episodes, exercise intolerance	Cortico-spinal tract signs
Progression	Very slow	Variable but mostly very slow	Slow
EMG	No polyneuropathy Motor neuron involvement in 1 patient (Izumi et al)	No polyneuropathy	No polyneuropathy Occasional motor neuron involvement
Biomarker	None	Variable elevation of serum lactic acid levels Variable decrease of coQ10	None ? (Increased AFP in 2 patients)
Brain MRI findings	Cerebellar atrophy	Cerebellar atrophy, variable cortical hyperintensities	Cerebellar atrophy
Gene and protein	<i>SYNE1</i> , nesprin 1 (nuclear envelope and spectrin-like repeats 1)	<i>ADKC3</i> , aarf domain containing kinase 3	<i>ANO10</i> , anoctamin 10

Abbreviations: ARCA, Autosomal recessive cerebellar ataxias; EMG: electromyography.

Legend of Figures

A



B

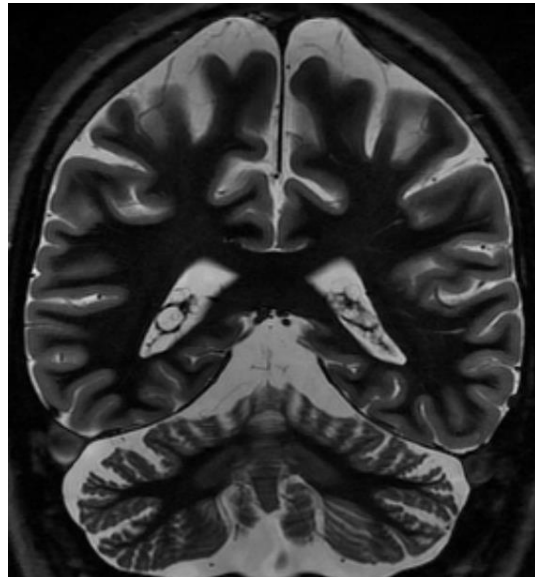


Figure 1. Brain MRI of patient 2: marked cerebellar atrophy with normal supratentorial structures at age 43 years.

A. Sagittal T1-weighted sequence.

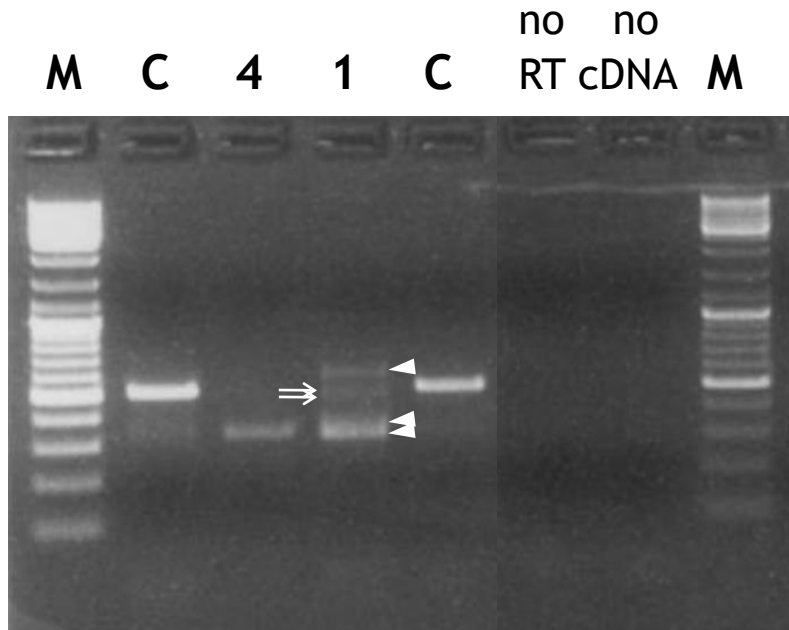
B. Coronal T1-weighted inversion recovery sequence.

Figure 2

A

	S	W	V
hs	GIVIQV FLPHDSEALKKLED TWYTR	ETIALY FGFLEYFTF ALIPMAVIGLPYYLF	YL VS LP FFVCLCLYF SLSYVMMI YFD MEVW
gg	GILVQI FLPHDREELK LRHTWYGR	ETIALY FGFLEYFTF ALIPMAVIGIPYYVF	YL VS VP FFVCLCLYF SLSYVMMI YFD LEHW
xl	GIMI QVFLPHDKEELK RLRHQWYLR	DTLGLY FAFLEYFTM ALIPMALIGIPYYFF	YL VS VP FFVCLCLYF SLSYVMMI YFD LEHW
tr	GILIQI FLPHEQEDL KRLSFTWYKR	EGQALY FGFLEFFTF ALVPMALVGVYYLF	YL VS LP FFVLLCLY LSLYVMMI YFQ MEGW
dr	GVLVQY FLPHNKEDL KRLSFSWYKK	EGLGLY FGFLEYFTF ALIPMALIGIPYYLF	YL VS VP FFVLLCLY LFSYVMMV YFD MEFW
bf	HLLEKMY PVHNPEQL KRLQHDWYHL	ESVAMY FSFLGHYTK ALLVPTVIGVLYYLF	Y CVS F P IVILCMLVAVVMMI YF WAENI
sp	GLIDGI YPLHTPTEL VLSLENHWYNH	EKIGI YFSFLGFYTK ALFLPAAFGLLYFLL	Y CVS AP I ILVFLCLAF LM MLG FF WFEDY
cg	DIITKMY PLHEPEDL KKLGADWYQI	EKIALY FAFLGYTTI ALIPPAFIGIYYFIT	Y CV TV P IVSVALGI AFY IML GYF VMQEW
ct	GIIAQ LFPLHDKRSL KTLSFDWYQS	GTVAMY FAFLGFYTM ALIPPA LIG VI SE YG	Y GV SL PV VLL CLF GAFYIML VYF WSEDL
phc	GYVEK CFPLHEIEY LKKFSQ TWY LT	ENIALY FI FLGY YTCAL VPPMILGLIEALI	Y CV SL P IV FLCL TGAF FF F ML FS FY MENM
ag	ELITNLY SLHDKRTL KELRHRWIKP	ESVGM YFSFLGFY TYALVVPTV FG FLQ LGL	Y CV TAP I IM LC MGI AAF VT IF Q FY VEAY
nv	GVVSS IYPLHEAQK LKLEKKWFLN	ETMAMY FAFLQF YSMTLIP PV LLIV FALS	Y G IS Y P IV LL CM KVAT VV ML LYF KLQFY
hm	HKIVQ IYPLHHI ESLKSLENQWYLG	ESIALY FTFLGFYTK FLLPTAV IG ILHYFF	Y F IS Y PL LL LIS LL LV TV G MLF Y F HLNEK

B



C

CTGAAAAAGAAATGGGAACTTATTTGGGCACCTTTGATGATTACTTGGAGTTATTCCTGCAGTT
TGGTTATGTGAGCCTTTTCTCCTGTGTTTACCCATTAGCAGCTGCCTTTGCTGTGTAAATAACT
TCACTGAAGTAAATTCAGATGCCTTAAAAATGTGCAGGGTCTTCAAACGTCCATTCTCAGAACCT
TCAGCCAATATTGGTGTAAGAGAGGGGCTGAATTGCAAGGTCATGAGGAATCTTTTGGGGGAAAT
 GAAATGTCCTGTGTCTTGTGGTGGTGGTGGTTCACAGTTGGCTTTTGAACGATGAGTG
 TTATATCTGTGGTCACTAACTGTGCGCTGATTGGAATGTCACCACAAGTGAATGCA

CTGAAAAAGAAATGGGAACTTATTTGGGCACCTTTGATGATTACTTGGAGTTATTCCTGCAGTT
TGGTTATTTGGCTTTTGAACGATGAGTGTTATATCTGTGGTCACTAACTGTGCGCTGATTGGAA
 TGTACCACAAGTGAATGCA

CTGAAAAAGAAATGGGAACTTATTTGTTGGCTTTTGAACGATGAGTGTTATATCTGTGGTCACT
 TAACTGTGCGCTGATTGGAATGTCACCACAAGTGAATGCA

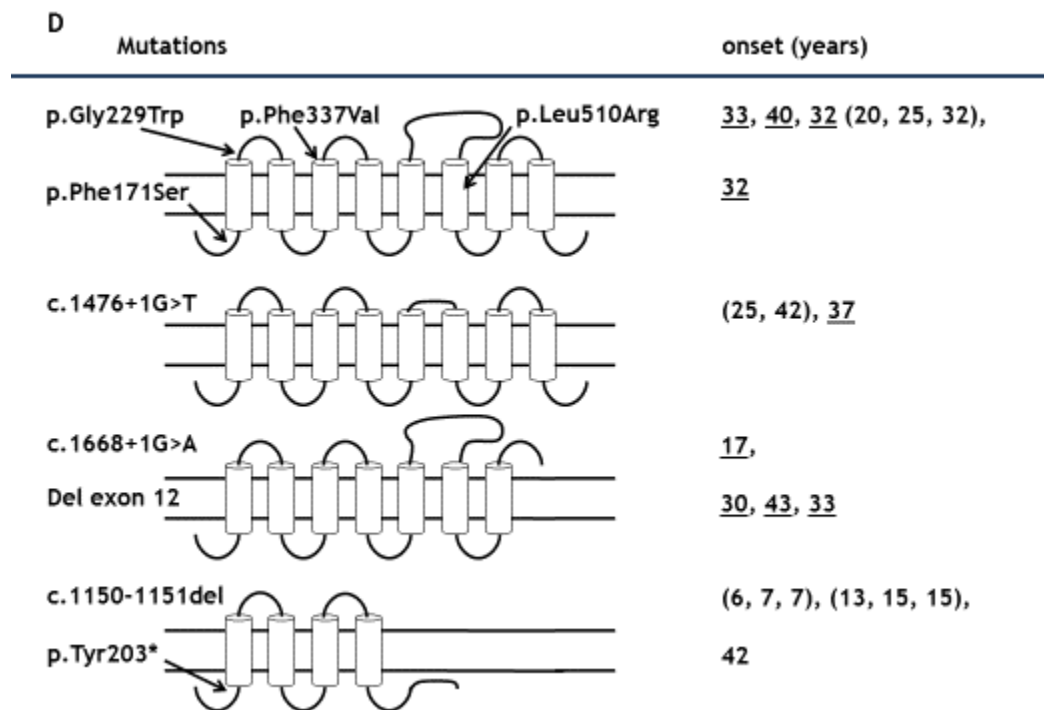


Figure 2. Position and consequences of *ANO10* mutations.

A. Conservation of amino-acids altered by missense mutation. Alignment of the surrounding sequence of ANO10 orthologues from 13 metazoan species is shown. The transmembrane sequences are underlined. Mutant amino-acids (one letter code) are indicated on top of the corresponding mutated amino-acids. Conserved amino-acids are indicated in bold. hs, Homo sapiens; gg, Gallus gallus; xl, Xenope laevis; tr, Tachifugu rubripes; dr, Danio rerio; bf, Branchiostoma floridae; sp, Strongylocentrotus purpuratus; cg; Crassostrea gigas; ct, Capitella teleta, phc, Pediculus humanus corporis; ag, Anopheles gambiae; nv, Nematostella vectensis, hm, Hydra magnapapillata.

B. Reverse transcriptase-PCR analysis of exons 8 to 11 of *ANO10* transcripts of patients with splice site mutation. RT-PCR fragments were run on agarose gel and visualized with ethidium bromide. M, size markers, C, control individual (520 bp normal fragment), 4, patient 4 (compound heterozygous c.1476+1G>T, exon 9 and p.Leu405*, exon 7), sequence of the fragment revealed complete skipping of exon 9 (in-frame deletion from codons 432 to 492, which includes part of the coding sequence of the large 3rd extracellular loop, panel D.), absence of the normal fragment indicates degradation of the p.Leu405* allele by non-sense mediated RNA decay; 1, patient 1 (homozygous c.1668+1G>A, exon 10) abnormal fragments are indicated by arrowheads (sequence in panel C.), heteroduplexes are indicated by arrows; no RT, negative control with no reverse transcriptase; no cDNA, negative control with no cDNA.

C. Sequence of the RT-PCR of the fragments of patient 1 (homozygous c.1668+1G>A, exon 10, panel B.). Part of exon 9 and of a cryptic exon in intron 10 have single underline. Parts of exon 10 have double underline. Part of exon 11 has no underline. Strikingly, all three identified fragments are in-frame. The two larger fragments result from the usage of cryptic splice sites within exon 10. The largest fragment includes most of exon 10 and a cryptic exon, resulting in the replacement of tryptophane 555 by 29 novel amino-acids. The smallest fragment (the most abundant) corresponds to complete skipping of exon 10, which results in in-frame deletion from codons 493 to 556, including the coding sequence of the 6th transmembrane segment.

D. Correlation between the predicted consequences of the mutations (missense, in-frame exon skipping, in-frame exon deletion and truncation) and age of onset of the disease. Ages of onset of patients from the same family are indicated in brackets. Ages of onset of patients reported in this study are underlined. Previously reported patients were either homozygous for the p.Leu510Arg missense mutation (affecting the 6th transmembrane segment of ANO10), homozygous for the

c.1050_1051del or p.Tyr203* truncating mutations, or compound heterozygous for a nonsense mutation and the same exon 9 splice site mutation reported here for patient 4. The correlations imply that homozygous or compound heterozygous mutations that cause a partial loss of function (missense or in-frame mutation) will be associated with a milder phenotype, even if associated with a truncating mutation on the other allele.

2.3.3. Manuscrit 5 (accepté Brain)

Synofzik M*, Smets K*, **Mallaret M***, Di Bella D, Gallenmüller C, Baets J, Schulze M, Magri S, Mustafa M, Deconinck T, Haack T, Züchner S, Timmann-Braun D, Klopstock T, Mariotti C, Koenig M, Schöls L, Schüle R, de Jonghe P I, Anheim M I, Taroni F I, Bauer P I. SYNE1 ataxia is a common recessive ataxia with major non-cerebellar features: a large scale multi-centre study.

*these authors contributed equally (joint first authors)

I joint last authors

***SYNE1* ataxia is a common recessive ataxia with major non-cerebellar features: a large scale multi-centre study.**

Matthis Synofzik, MD^{1, 2, *, #}, Katrien Smets, MD^{3,4,*}, Martial Mallaret, MD^{5,6,*}, Daniela Di Bella, MD^{7,*}, Constanze Gallenmüller, MD^{8,9,10}, Jonathan Baets, MD, PhD^{3,4}, Martin Schulze, PhD¹¹, Stefania Magri⁷, Mona Mustafa, MD¹²; Tine Deconinck, MSc^{3,4}, Tobias Haack, MD^{13,14}, Stephan Züchner, MD, PhD¹⁵, Dagmar Timmann-Braun, MD¹⁷, Thomas Klopstock, MD^{8,9,10}, Caterina Mariotti, MD⁷, Michel Koenig, MD^{6,16}, Ludger Schöls, MD^{1,2}, Rebecca Schüle, MD^{1, 2,15}, Peter de Jonghe, MD, PhD^{3,4,†}, Mathieu Anheim, MD^{5,6,†}, Franco Taroni, MD^{7,†}, Peter Bauer, MD^{11,†}

¹ Department of Neurodegenerative Diseases, Hertie-Institute for Clinical Brain Research, University of Tübingen, Germany

² German Research Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), University of Tübingen, Germany

³ Neurogenetics Group, VIB–Department of Molecular Genetics, University of Antwerp, Belgium

⁴ Departments of Neurology, Antwerp University Hospital, Belgium

⁵ Department of Neurology, Hôpital de Hautepierre, Strasbourg, France

⁶ Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), INSERM-U964/CNRS-UMR7104/Université de Strasbourg, Collège de France, 67404 Illkirch, France

⁷ Unit of Genetics of Neurodegenerative and Metabolic Diseases, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milan, Italy

⁸ Department of Neurology with Friedrich-Baur-Institute, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany

⁹ German Research Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Munich, Germany

¹⁰ Munich Cluster for Systems Neurology (SyNergy), Munich, Germany

¹¹ Institute of Medical Genetics and Applied Genomics, University of Tübingen, Germany

¹² Department of Nuclear Medicine, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany

¹³ Institute of Human Genetics, Technische Universität München, 81675 Munich, Germany;

¹⁴ Institute of Human Genetics, Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health, 85764 Neuherberg, Germany;

¹⁵ Dr. John T. Macdonald Foundation Department of Human Genetics and John P. Hussman Institute for Human Genomics, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, USA

¹⁶ Laboratoire de Génétique Moléculaire, IURC (Institut Universitaire de Recherche Clinique), 641 avenue du Doyen Gaston Giraud, 34093 Montpellier Cedex 5, France

¹⁷ Department of Neurology, University of Duisburg-Essen, Essen, Germany

*these authors contributed equally (joint first authors)

[†] joint last authors

Correspondence should be addressed to:

Dr. Matthis Synofzik

Department of Neurodegenerative Diseases, University of Tübingen

Hoppe-Seyler-Str. 3

72076 Tübingen, Germany

phone: +49-7071-2982060

fax: +49-7071-294254

e-mail: matthis.synofzik@uni-tuebingen.de

Word count abstract : 286

Keywords: ataxia; recessive ataxia; spastic ataxia; early onset ataxia; motor neuron disease; hereditary spastic paraplegia; genetics; neuromuscular; magnetic resonance imaging; electrophysiology; positron emissions tomography; muscle; SCAR8; ARCA1.

Abbreviations:

ARCA, autosomal recessive cerebellar ataxia; HSP, hereditary spastic paraplegia; WES, whole exome sequencing, TPR, tetratricopeptide-repeat

Acknowledgements

We are grateful to Jennifer Reichbauer (Hertie-Institute for Clinical Brain Research, Tübingen) for performing the Sanger sequencing in some of the subjects. This study was supported by the Interdisciplinary Center for Clinical Research IZKF Tübingen (grant 2191-0-0 to MS, grant 1970-0-0 to RS), the European Union (grant F5-2012-305121 “NEUROMICS” to LS and grant

PIOF-GA-2012-326681 “HSP/CMT genetics” and “NEUROLIPID” (01GM1408B) to RS), E-RARE grants of the German Ministry for Education and Research (BMBF) to the EUROSCAR project (grant 01GM1206), the EUROSPA project (grant 01GM0807) (to LS and PB), and the National Institute of Health (NIH) (grants 5R01NS072248 to SZ, 1R01NS075764 to SZ, 5R01NS054132 to SZ).

Abstract

Mutations in the synaptic nuclear envelope protein 1 (*SYNE1*) gene have been reported to cause a relatively pure cerebellar recessive ataxia that seemed to be largely limited to Quebec, Canada. Combining next-generation sequencing techniques and deep-phenotyping (clinics, MRI, PET, muscle histology), we here established the frequency, phenotypic spectrum and genetic spectrum of *SYNE1* in a screening of 439 non-Canadian index patients from 6 centers across Europe. Patients were screened by whole-exome sequencing or targeted panel sequencing, yielding 23 unrelated families with recessive truncating *SYNE1* mutations (23/439=5.2%). In these families, a total of 35 different mutations were identified, none of them previously linked to human disease. While only 5/26 patients (19%) showed the classical *SYNE1* phenotype of mildly progressive pure cerebellar ataxia, 21/26 (81%) exhibited additional complicating features, including motor neuron features in 15/26 (58%). In three patients, respiratory dysfunction was part of an early-onset multisystemic neuromuscular phenotype with mental retardation, leading to premature death at age 36 years in one of them. PET imaging confirmed hypometabolism in extra-cerebellar regions like e.g. the brainstem. Muscle biopsy reliably showed severely reduced or absent *SYNE1* staining, indicating its potential use as a non-genetic indicator for underlying *SYNE1* mutations.

Our findings, which present the largest systematic series of SYNE1 outside Canada, revise the classic notions that SYNE1 ataxia causes mainly a relatively pure cerebellar recessive ataxia and that it is largely limited to Quebec. Instead, complex phenotypes with a wide range of extra-cerebellar neurological and non-neurological dysfunctions are frequent, including in particular motor neuron and brainstem dysfunction. The disease course in this multisystemic neurodegenerative disease can be fatal, including premature death due to respiratory dysfunction. With a prevalence of ~5%, SYNE1 is one of the more common recessive ataxias worldwide.

Introduction

SYNE1 (OMIM 608441) is one of the largest genes in the human genome, with the longest isoform comprising 147 exons that encode the 8797 amino-acid *synaptic nuclear envelope protein 1* (Gros-Louis et al., 2007). This protein, also known as Nesprin 1 (Nuclear envelope spectrin 1), is part of the spectrin family of structural proteins that share a common function of linking the plasma membrane to the actin cytoskeleton (Gros-Louis et al., 2007). Truncating recessive mutations in *SYNE1* have been reported to cause a mildly progressive, relatively pure and homogenous cerebellar ataxia (spinocerebellar ataxia, autosomal-recessive 8; SCAR8/autosomal-recessive cerebellar ataxia type 1, ARCA1) (Dupre et al., 1993/2012, Dupre et al., 2007, Gros-Louis et al., 2007, Noreau et al., 2013, Fogel et al., 2014). This ataxia appears to be largely limited to Quebec, Canada: while it presents the third most common hereditary ataxia in Quebec (after ARSACS and Friedreich ataxia)(Dupre et al., 1993/2012, Gros-Louis et al., 2007), only few families have been identified outside French Canadian populations (Izumi et al., 2013, Noreau et al., 2013). These notions on the phenotype and geographic distribution of *SYNE1* ataxia, however, might be rather preliminary, given that systematic screenings outside this

founder population were confined to highly selected individual cases (Izumi *et al.*, 2013, Noreau *et al.*, 2013). A systematic characterization of the clinico-genetic spectrum of a larger non-French Canadian subject group is missing. We here hypothesized that (i) *SYNE1* is a recurrent cause of recessive ataxia also outside French-Canadian populations, and that (ii) dysfunction in extra-cerebellar systems is not the exception but the rule.

To test these hypotheses, we aggregated the genetic and deep-phenotypic findings of a screening of 439 ataxia patients compiled by 6 different European centers, unravelling 23 novel index patients with truncating *SYNE1* mutations, including 35 mutations not previously linked to human disease. This large collection of *SYNE1* patients demonstrates that *SYNE1* ataxia is a common recessive ataxia also outside French-Canadian founder population, and that it commonly presents with multisystemic neurodegenerative disease. This includes in particular motor neuron and brainstem features and even complex neuromuscular syndromes, where respiratory dysfunction can lead to premature death.

Methods

Patients.

N=439 index subjects with unexplained early-onset degenerative ataxia (age of onset <40 years) compatible with autosomal recessive inheritance (no ataxia in the parental generation), negative for trinucleotide repeat expansions causing Friedreich's ataxia (FRDA) and for spinocerebellar ataxia (SCA) type 1, 2, 3, 6, 7, and 17 were compiled from 6 different European ataxia centers (n=116 Tübingen, Germany; n=16 Essen, Germany; n=13 Munich, Germany; n=109 Milano, Italy; n=144 Strasbourg, France; n=41, Antwerp, Belgium).

Genetic screening by next-generation sequencing methods.

Subjects were screened for *SYNE1* mutations by one of the following five next-generation sequencing methods: 1. as part of a high coverage HaloPlex gene panel kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA) which included >120 known ataxia genes (n=179) (Supplement 1A); 2. as part of a targeted exon-capture sequencing strategy (Agilent Sureselect kit) which included 57 known ataxia genes (n=144) (Supplement 1B); 3. as part of an amplicon-based customized panel (Illumina TrueSeq Custom Amplicon, TSCA) run on an Illumina MiSeq apparatus covering 76 known ataxia genes (n=21) (Supplement 1C); 4. as part of a targeted exon-capture sequencing strategy (Illumina Nextera Rapid Capture Custom kit) which included 107 known ataxia genes (n=54) (Supplement 1D). 5. as part of whole-exome sequencing using the SureSelect Human All Exon 50Mb kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA) (n=41) (Supplement 1E). Variants were filtered for (i) non-synonymous homozygous or compound truncating mutations in *SYNE1* (frameshift insertions or deletions, splice mutations, and stop-gain mutations) that were (ii) absent or extremely rare (minor allele frequency <0.5%) in the public databases GEM.app (5992 exomes from 4279 families), dbSNP137, NHLBI ESP6500, 1000Genomes project, and ExAc (60706 exomes; Exome Aggregation Consortium; Cambridge, MA <http://exac.broadinstitute.org>, accessed 06/2015) (for further details on the next-generation sequencing bioinformatics and filter criteria, see Supplement 1A-E).

Inclusion of SYNE1 missense variants.

Due the high number of private missense variants in the large *SYNE1* gene (often located in the numerous, modestly conserved spectrin repeats of the gene) and given the fact that only *truncating SYNE1* variants have been established as a cause of *SYNE1* ataxia, we did not include

cases carrying only *SYNE1* missense variants. Following a conservative approach towards *SYNE1* missense variants, subjects carrying a missense variant were only included if the respective missense variant (i) segregated *in trans* with a *truncating SYNE1* variant, (ii) was absent or rare in public exome databases (same criteria as above), (iii) located in highly conserved positions of the N-terminal actin-binding domain (codon 1 – 289), and (iv) predicted to be damaging by at least two out of three *in silico* algorithms. These criteria lead to the inclusion of 1 *SYNE1* missense mutation in the final cohort.

mRNA analysis

mRNA analysis was performed for selected mutations (mutations of families #6 and #7) to confirm the effect of the only *non-canonical* splice mutation identified in this study (family #6), and to exemplarily confirm the *loss-of-function* mechanism of truncating *SYNE1* mutations (family #7). Total RNA was extracted from lymphocytes using a Maxwell® Extractor (Promega) with the Maxwell® 16 LEV simply RNA Cells kit. cDNA synthesis was carried out using Transcriptor FirstStrand cDNA synthesis kit (Roche) with random primers. PCR was carried out in 20 µL with an annealing temperature of 58°C and specific primer pairs designed to amplify cDNA fragments encompassing the different mutations of families #6 and #7. The amplified fragments were directly sequenced on an automated sequencer (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) using the BigDyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's recommendations.

Histological analysis and immunohistochemistry of muscle tissue

Biopsies of the quadriceps muscle were available from three *SYNE1* subjects and compared to a healthy age-matched control. The samples were analysed by classical histological, histochemical, histoenzymatic and immunohistochemical techniques, as described previously (Martin *et al.*, 1997). The antibodies used were mouse monoclonal anti-emerin (NCL-emerin, 1/100, acetone fixation - Novocastra, Newcastle-on-Tyne, UK); mouse monoclonal anti-lamin A/C (NCL-LAM-A/C, 1/1000, acetone/methanol fixation - Novocastra, Newcastle-on-Tyne, UK) and rabbit polyclonal anti-nesprin-1 (PRB-439P, 1/2000, unfixated – Covance, Princeton, New Jersey, USA). The avidin-biotin complex technique for the monoclonal antibodies and the peroxidase-antiperoxidase technique were used for the polyclonal antibody.

Clinical and electrophysiological assessments

All index patients carrying two pathogenic *SYNE1* variants as well as their affected siblings received a systematic clinical assessment for disturbances in multiple neurological systems (Table 2) by a movement disorder specialist. Nerve conduction studies (NCS) and electromyography (EMG) investigations were performed in all patients available for these investigations. Patients were classified into two phenotypic categories: i) *pure cerebellar ataxia (pure CA)* = pure ataxia features without any evidence of non-ataxia features; ii) *cerebellar ataxia plus (CA plus)* = ataxia plus clinical evidence for damage of at least one additional neurological system, such as e.g. upper and/or lower motor neuron disease. Disease severity was rated by the Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA) (Schmitz-Hubsch *et al.*, 2006).

MRI and PET imaging

Routine brain magnetic resonance imaging (MRI) including T1-, T2-, diffusion-weighted images (DWI) and fluid attenuated inversion recovery T2 (FLAIR) images were performed for at least one patient per family and were reviewed by both neuroradiologists and a neurologist. ¹⁸F- FDG positron emission tomography (PET) imaging was performed for two exemplary subjects with ataxia-motor neuron disease on a Siemens ECAT HR+ scanner (CTI, Knoxville, TN, USA) with a 128 × 128 voxel matrix (voxel size 2 mm), an axial field of view of 15.5 mm and a full-width-at-half-maximal resolution of 5 mm, according to previously published tracer-specific protocols (Forster *et al.*, 2010). Resting-state PET recordings were obtained in the interval 30–50 min after iv application of 200 MBq 18-Fluoro-2-deoxyglucose (¹⁸F-FDG), a brief attenuation scan was obtained with integrated ⁶⁸Ge rod sources (for details of image analysis, see Supplement 2).

Results

A large cohort of novel SYNE1 index families and mutations from European populations

We identified 22 index patients carrying two truncating *SYNE1* mutations and 1 index patient carrying one truncating plus one missense *SYNE1* mutation, thus yielding a total of 23 index patients out of 439 early-onset ataxia patients (5.2%). 5 index patients were from multiplex families, the remaining 18 index patients were simplex cases. 6/23 index patients had consanguineous parents. We observed a total of 35 different mutations, consisting of 7 frameshift, 20 nonsense mutations, 6 nucleotide changes affecting canonical splice sites, 1 nucleotide change affecting a cryptic exonic splice site, and 1 missense mutation in the actin binding domain. (Table 1; for a discussion of the cryptic exonic splice site and the missense mutation, see below). The mutations were spread across the giant *SYNE1* gene, including the acting binding domain (also called “Calponin homology domain containing actin binding site”)

and the spectrin repeat domains (Figure 1A). 5 mutations (mutations 1-5) also affect the coding sequence of the SYNE1 isoform Nesprin 1 α , a region where no mutations have been previously found (Razafsky and Hodzic, 2015). None of the 35 mutations has been reported in association with human disease before, thus more than doubling the total amount of all SYNE1 truncating mutations that have been published so far (for overview of all novel and publishes mutations, see Figure 1B). Two mutations were listed in the 1000 Genomes database, but also not yet linked with human disease. All 35 mutations were absent or had extremely low minor allele frequency (<0.001%) in GEM.app (5992 exomes from 4279 families), dbSNP137, 1000 Genomes database, NHLBI ESP (6500 exomes), ExAc (60706 exomes) (table 1). Moreover, all 35 mutations yielded a scaled CADD score (Combined Annotation Dependent Depletion) of ≥ 19 (table 1), ranking the predicted pathogenicity of each mutation among the top 1% of all 8.6 billion SNVs in the GRCh37/hg19 (Kircher *et al.*, 2014). All mutations were confirmed by Sanger sequencing. In all families where DNA of the siblings was available (10/23), the variants cosegregated with disease in affected siblings, and were absent or present only in a heterozygous state in unaffected siblings. For all families where DNA of at least one parent was available (12/23 families) we were able to show that the respective parent carried only one of the respective two SYNE1 variants, indicating a biallelic localization of the variants in the index child. In 4 of the remaining 11 families consanguinity was also suggestive of a biallelic location of the observed mutation. No other significant variants in known ataxia genes were identified in any of the 23 index subjects, as demonstrated by screening through whole exome sequencing and targeted panel sequencing, respectively.

Pathogenicity of selected base exchanges and the high genetic variability of SYNE1

Cryptic splice mutation. While 6 out of 7 splice mutations affected canonical splice sites (see Table1), the base exchange c.A15419G; p.D5140G (mutation #18, observed in family #7) was predicted by *in silico* analysis (NNSplice; (Reese *et al.*, 1997)) to act as a cryptic exonic splice mutation, namely by creating a new donor site 26 bp upstream of the 5' donor splice site of intron 80. To confirm this prediction we performed RT-PCR analysis of the *SYNE1* transcript, revealing a heterozygous deletion of the last 26 nucleotides of exon 80 (r.15419_15444del26) (Figure 2A) which results in a protein truncated at residue 5140 (p.D5140Gfs1*). This variant occurred in *trans* with the frameshift mutation p.C7895fs.

Missense mutation. The missense variant c.T659C, p.F220S (observed in family #20) (i) segregated in *trans* with the nonsense variant c.A2776T, p.K926*, (ii) was absent in all public databases described above, (iii) predicted to be damaging by three out of three *in silico* algorithms (Mutation Taster (Schwarz *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2010); SIFT (Sim *et al.*, 2012), and PolyPhen2 (Adzhubei *et al.*, 2010)), (iv) ranked among the top 1% of all 8.6 billion SNVs in the GRCh37/hg19 (CADD score: 28.8) (Kircher *et al.*, 2014), and (v) located at a highly conserved position in the actin-binding domain of SYNE1 (Supplement 3). This domain is conserved even in non-metazoan species (paralogues in ichthyospora, fungi and slime mold, E-values in the range of 5×10^{-40} to 10^{-50}), whereas the spectrin domains of SYNE1 provide no significant alignment with paralogues of the same non-metazoan species (E-values above 10). The p.F220S mutation affects one of the 6 invariant amino-acid positions of the second calponin-homology domain in nesprin, spectrin and alpha-actinin homologues (for figure, see Supplement 3). The biallelic truncating and the missense *SYNE1* variants were also found in the affected sibling of the index patient in family #20, indicating segregation with disease.

In general, these results from the cryptic splice and the missense mutation indicate that careful interpretation of apparent single nucleotide variants is necessary to evaluate possible effects detrimental to SYNE1 function. Such a critical one-by-one debate of *SYNE1* single nucleotide variants is of particular relevance in the future, given the large size of *SYNE1* with its substantial variability.

Absence of SYNE1 transcript adds support for a loss-of-function mechanism

Truncation of proteins can lead to either toxic gain of function (exerted by the residual protein) or to loss-of-function. To exemplarily investigate the mechanism of action for truncating *SYNE1* mutations, we investigated the pathomechanism of the variants p.L132* and p.G4752fs (observed in family #6). No *SYNE1* transcript was amplified by RT-PCR in patient's cells (Figure 2B), suggesting that both the early nonsense mutation p.L132* and the later frameshift mutation p.G4752fs cause nonsense-mediated decay of mutant mRNA. The absence of the transcript adds support for a loss-of-function mechanism underlying the detrimental effect of truncating SYNE1 mutations in human SYNE1 disease, as hypothesized earlier (Gros-Louis *et al.*, 2007, Attali *et al.*, 2009).

Severely reduced to absent SYNE1 staining in muscle tissue

Muscle biopsy (available for 3 different SYNE1 index patients from 3 different countries;) showed neurogenic changes in all patients without evidence of myopathy, thus corresponding to the clinical/EMG finding of frequent lower motor damage in SYNE1 disease (see below). In line with the suggested loss of protein in SYNE1 patients with truncating mutations, staining of

SYNE1 was severely reduced in two patients and absent in one patient (Figure 3). To control for the possibility that this lack of SYNE1 staining might be an unspecific result or artefact in the SYNE1 samples, control stainings were performed. Control immunolabelling showed normal results for emerin at the inner nuclear membrane and of lamin A/C also in the SYNE1 muscle samples (Figure 3).

A broad range of non-cerebellar features, including severe and complex early-onset syndromes

We aggregated clinical data from 26 affected subjects belonging to 23 families (median age of disease onset: 22 years, range: 6-40 years; last examination in each individual performed after a median of 25 years of disease duration). Disease started with gait coordination disturbances in 24/26 subjects; in two subjects it began with focal upper limb dystonia (writer's cramp) (patient 20-1) and lower limb weakness (patient 23-1), respectively. 5/26 patients (19%) showed the classical *SYNE1* phenotype of pure cerebellar ataxia that was mildly progressive and started in adulthood (range: 19-36 years) (*pure cerebellar ataxia, pCA*). However, the large majority of patients (21/26 =81%) exhibited at least one additional complicating feature from a large range of non-cerebellar features, both in neurological and non-neurological domains (*cerebellar ataxia plus, CA plus*) (see Table 2 and Figure 4A and 4B).

The most frequent complicating finding was motor neuron dysfunction, observed in 15/26 (58%) of the total cohort (Figure 4A). This comprised a combination of upper motor neuron dysfunction (bilateral positive extensor reflex and/or spasticity) and lower motor neuron dysfunction (muscle atrophy combined with reduced reflexes; fasciculations clinically or on EMG; or chronic and/or acute neurogenic changes on EMG) in 5/26 patients (19%), only upper

motor neuron dysfunction in 8/26 patients (31%), and only lower motor neuron dysfunction in 2/26 (8%) patients. Other frequent complicating features across the cohort included: scoliosis (5/26; 19%), sometimes combined with kyphosis, indicative of skeletal abnormalities in SYNE1; slowing of saccades (4/26; 15%), indicative of brainstem dysfunction in SYNE1; and reduced vibration sense of the lower limbs (3/26; 12%), indicative of peripheral nerve and/or dorsal column dysfunction in SYNE1 (for a relative frequency of all main features, see Figure 4A). A broad range of non-cerebellar oculomotor deficits was seen in single patients across the cohort: square wave jerks, ophthalmoparesis, esotropia, and strabism (see Table 2 and Figure 4A). One patient exhibited mild macroglossia in addition to esotropia, that could not be related to any other disease other than SYNE1.

Three *CA plus* patients (3/26= 12%; patients 13-1, 13-2, 23-1) showed a particularly severe and complex multisystemic phenotype, comprising of very early onset (6-10 years of age) ataxia, spasticity, weakness and muscle wasting of all four limbs, mental retardation (IQ 49-60), dysphagia, pes cavus, and a broad range of variable skeletal and soft-tissue abnormalities such as sacral cysts, pseudarthrosis clavicular, hyperlaxity of joints, achilles tendon contractures, kyphosis, scoliosis, cataract, hypertelorism. All three developed respiratory dysfunction in late adolescence, necessitating BiPAP (bi-level positive airway pressure) ventilation in 2/3 subjects and leading to premature death at age 36 years in one of them. One of the three subjects also showed developmental abnormalities of the visceral organs, such as malrotation of the colon and unilateral positioning of both kidneys at right pelvis. Reanalysis of her WES results revealed no other recessive mutations in any other gene which might explain these visceral features by a putative “second hit”. However, future studies in SYNE1 patients are warranted to confirm that such visceral features are indeed part of the phenotypic spectrum.

Electrophysiological findings

Motor evoked potentials, available for 8 patients, were prolonged or not evoked in 6/8 patients (75%), all of them showing also clinical signs of upper motor neuron damage (Table 2). Nerve conduction studies, available for 19 patients, were normal in 17/19 patients (89%), while 1 patient showed a peripheral motor neuropathy and 1 patient a mild sensory axonal neuropathy, demonstrating that peripheral neuropathy is a rather infrequent feature in SYNE1 disease.

Imaging findings

Cerebral MRI, available from 24 patients, consistently showed marked cerebellar atrophy in all 24/24 (100%) patients (for exemplary illustration, see Figure 5). ¹⁸F- FDG positron emission tomography (PET) imaging performed in two exemplary subjects with ataxia-motor neuron disease revealed a marked homogenous ¹⁸F-FDG decrease in both cerebellar hemispheres in both subjects and, on visual inspection, also of the pontine brainstem, which reached statistical significance in subject 10-1 with a Z-score of 3 and a trend in subject 9-1 with a Z-score of 1.5 (normalized to pontic metabolism) (Figure 5). These imaging findings provide proof-of-concept functional imaging evidence that dysfunctions in SYNE1 patients extend beyond the cerebellar domain to include in particular the pons, thus complementing our clinical findings of extra-cerebellar findings in SYNE1.

Discussion

SYNE1: a recurrent recessive ataxia worldwide, with mutations spanning across the whole gigantic gene

So far, autosomal-recessive cerebellar ataxia (ARCA) due to *SYNE1* mutations has been described mainly in Quebec, Canada, with only very few families having been identified outside French-Canadian populations (Izumi *et al.*, 2013, Noreau *et al.*, 2013). Reporting the by far largest series of *SYNE1* patients outside Quebec, we here show that *SYNE1* is in fact a relatively common recessive ataxia worldwide, yielding an estimated frequency of at least 5.2% after exclusion of Friedreich's ataxia and the most common repeat-expansion SCAs. This is probably a rather conservative estimate, given the fact that our approach did not cover copy number variations and was very restrictive on including missense variants.

Our genetic findings more than double the number of truncating *SYNE1* mutations identified so far: while <15 different truncating *SYNE1* mutations have been described, we here identified 35 novel truncating *SYNE1* mutations, which are scattered throughout all exons of the gigantic gene. Almost all most mutations are private mutations identified in single families, without obvious mutational hot spot regions. 5 mutations affected the coding sequence of the *SYNE1* isoform Nesprin 1 α . As no mutations had been previously found in this domain (Razafsky and Hodzic, 2015), it was suggested that a protein encoded by these exons may underlie distinct pathologies in humans (Razafsky and Hodzic, 2015). However, here we show that mutations in this sequence lead to the same phenotypic features as mutations in other parts of *SYNE1* (see mutations 1-5, table 1).

Taken together, these genetic findings have also major implications for future clinic-genetic testing strategies in unresolved ARCA patients around the world: they demonstrate that also in

non-Canadian populations current genetic testing approaches have to include the large *SYNE1* gene by using approaches that tightly capture all of its exons.

SYNE1: from late-onset pure cerebellar ataxia to complex neuromuscular disease with mental retardation

Recessive ataxia due to *SYNE1* is commonly perceived to present as a mildly progressive, relatively pure and homogenous cerebellar ataxia, starting in adult age (Dupre *et al.*, 1993/2012, Gros-Louis *et al.*, 2007, Noreau *et al.*, 2013, Fogel *et al.*, 2014). However, here we show that pure cerebellar ataxia represents only a relatively infrequent phenotypic cluster along a broad multidimensional *SYNE1*-associated spectrum of neurodegenerative disorders. With 81% of all patients exhibiting variable additional non-cerebellar features both in neurological and non-neurological domains, a multisystemic phenotype seems to be the rule rather than the exception in *SYNE1* disease. Apart from cerebellar ataxia, this spectrum includes upper motor neuron disease, lower motor neuron disease, brainstem dysfunction (e.g. saccadic slowing), and a variable range of musculoskeletal abnormalities (e.g. kyphosis, scoliosis, pes cavus). Variable combinations of these features can be found in different *SYNE1* patients along a continuous spectrum of disease. This spectrum reaches from (i) pure cerebellar ataxia via (ii) cerebellar ataxia plus damage of one or two additional systems (such as motor neuron disease, thus giving rise to spastic ataxia and complicated hereditary spastic paraplegia phenotypes) to (iii) cerebellar ataxia as part of severe multisystemic neurodegenerative syndromes. The latter encompass literally *all* of the aforementioned *SYNE1*-associated domains and include also mental retardation, respiratory distress and visceral organs (Table 2; for graphic illustration of the *SYNE1*-disease continuum, see Figure 4B and 4C).

The complex early-onset neurodegenerative syndrome does not seem to present a mere coincidental finding (that might be unrelated to the *SYNE1* mutations), but rather reflects a phenotypic cluster systematically related to *SYNE1* mutations. This is indicated by the fact that we identified 3 patients from two different families with this severe phenotypic combination. In fact, a fourth patient with early-onset complex *SYNE1* ataxia-motor neuron disease and respiratory dysfunction has recently been described as a single case in a Japanese family (Izumi *et al.*, 2013), thus increasing the evidence to three different families. Here we now show that this phenotypic cluster is not a qualitatively distinct syndrome, but rather a *combination* of *SYNE1*-associated features that can each be found in isolation or as part of less complex phenotypic clusters in other *SYNE1* patients along a continuous spectrum of disease. Although we did not find obvious mutation-phenotype correlations, different *SYNE1* mutations might differentially affect the multiple *SYNE1* splicing isoforms which vary greatly in size and tissue-specific expression patterns (Zhang *et al.*, 2010, Razafsky and Hodzic, 2015), thus possibly explaining parts of the phenotypic variability observed here. In fact, *SYNE1* mutant mice show variable phenotypes depending on the splicing isoform that was targeted (for overview see (Zhang *et al.*, 2010)).

Our findings have important implications for clinico-genetic counselling. They revise current clinical notions about the benign disease course of *SYNE1*-disease, including the notion that life expectancy was normal (Dupre *et al.*, 1993/2012, Gros-Louis *et al.*, 2007). They show that, at least in some patients, *SYNE1*-disease can start already as a developmental disease with mental retardation and early-onset ataxia in the first decade of life, and that it can lead to premature death due to respiratory dysfunction in the mid-adult age (age 30- 40 years).

Bridging the gap between SYNE1 ataxia and arthrogryposis syndromes

Truncating recessive *SYNE1* mutations have been described as a cause of an arthrogryposis multiplex congenita syndrome in a single Palestinian family presenting with infantile-onset hypotonia, bilateral club foot, progressive motor decline in the first decade, scoliosis and restrictive lung disease, yet without ataxia or motor neuron disease (Attali *et al.*, 2009) (for location of these mutations, see Figure 1B). This musculoskeletal infantile-onset phenotypic cluster was proposed as a “distinct human disease phenotype” of *SYNE1*, separate from the neurological phenotype (Attali *et al.*, 2009). As several of our ataxic *SYNE1* patients, however, (i) also show scoliosis/kyphosis, restrictive lung disease, foot deformities, and other neuromuscular abnormalities as part of their early-onset multisystemic disease, and (ii) carry mutations in the same or neighboring gene region (Figure 1B), we here suggest that such arthrogryposis syndromes do not represent qualitatively distinct phenotypes, but rather clusters of variably combined neurologic and non-neurologic features along the continuum of *SYNE1* disease.

A widespread functional role of SYNE1 in various tissues

Our findings on widespread extra-cerebellar dysfunctions in human *SYNE1* disease complement and recapitulate some of the key features of *SYNE1*/Nesprin 1 knock-out mouse models. Key features in mice include kyphoscoliosis, respiratory failure, and shortened survival (Zhang *et al.*, 2007, Puckelwartz *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2010). We now show systematically that these features are also part of the human disease spectrum, thus bridging the cross-species gap.

Moreover, our findings on extra-cerebellar dysfunctions might provide new insights into the pathophysiology underlying SYNE1-associated neurodegeneration. Recent work has shown that a specific SYNE1 isoform devoid of the KASH domain (KLNes1g) is specifically abundant in the cerebellum (in particular in the granule cell layer), where it might be involved in vesicular trafficking and/or in dendritic membranes' structural organization (Razafsky and Hodzic, 2015). Our clinical, electrophysiological and imaging observations of multisystemic damage in *SYNE1* patients, however, indicate that intact SYNE1 transcripts seem to be functionally important not only for cerebellar, but also for motor and brainstem neurons. They thus stimulate future molecular research aiming to identify the specific functional role of SYNE1 in these neuron types. For example, the proposed interaction of SYNE1 transcripts with vesicular trafficking proteins such as Kif5c, suggested for cerebellar neurons (Razafsky and Hodzic, 2015), might also apply to motor neurons. Aberrant vesicular trafficking dynamics is a common process underlying motor neuron degeneration (as e.g. in HSPs (Crosby and Proukakis, 2002)), and mutations in *KIF5C* have been shown to include upper motor neuron damage (Poirier *et al.*, 2013).

In sum, our clinical, electrophysiological and imaging findings suggest a widespread functional role of SYNE1 in many different tissues in humans, which is in line with its ubiquitous expression (Apel *et al.*, 2000, Gros-Louis *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2010). This ubiquitous expression SYNE1 – and, in turn, its absence in case of protein truncation - might help to find diagnostic biomarkers for the disease. Our results suggest that severely reduced to absent SYNE1 staining in muscle tissue – which was observed in all 3/3 available samples – might present a diagnostic marker that indicates underlying truncating *SYNE1* mutations. If confirmed in larger sample cohorts, SYNE1 staining of muscle tissue might thus become a helpful auxiliary tool in

the histochemical work-up of muscle biopsies of future patients with unresolved neurodegenerative and neuromuscular diseases. It is likely that many more SYNE1 patients with both relatively pure ataxia as well as complex neuromuscular phenotypes will be identified worldwide in the very next years.

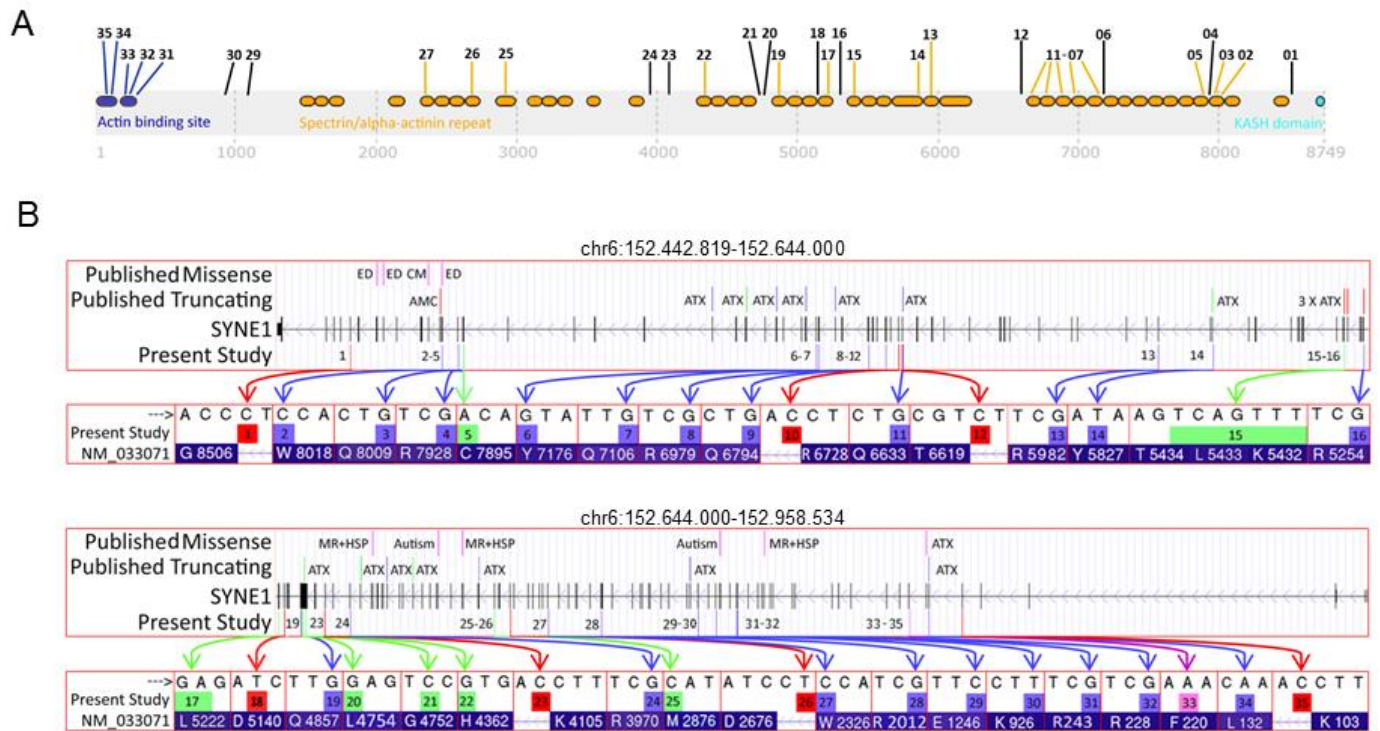


Figure 1: SYNE1 mutations. (A) Graphical overview of the mutations found in this study in relation to the SYNE1 domains. Numbers indicate the mutation IDs of the mutations identified in this study (see table 1). Their position indicates the position of the respective mutations in the SYNE1 gene. Blue color coding= N-terminal Actin binding domain (= Calponin homology domains containing actin binding sites [IPR001715]) and mutations affecting this domain; orange color coding = Spectrin/alpha-actinin repeat domains (IPR018159) and mutations affecting these domains; turquoise color coding= KASH domain (=C-terminal klarsicht domain) (IPR012315) and mutations affecting these domains; black color coding= mutations not affecting any of these domains. **(B) Overview of the variant types and their location of all published and novel SYNE1 mutations.** The presentation of the giant SYNE1 gene is split in a first part (chr6:152.44.819-152.644.000; upper panel) and a second part (chr6:152,644,000-152,958,534; bottom panel). It presents the variant types of all SYNE1 mutations found in the present study (bottom row of each panel) and other studies (Human Gene Mutation Database) (top row of each panel), their location and their annotation with the associated clinical phenotypes (ATX= ataxia, AMC, arthrogryposis multiplex congenita; ED, Emery-Dreifuss; CM, cardiomyopathy; MR, mental retardation; HSP, hereditary spastic paraplegia). Note that, except ATX and AMC, all other phenotypes have been

associated only with missense mutations, not truncating mutations in SYNE1. Green colored arrows and boxes= indel mutations; blue colored arrows and boxes= stop mutations; red colored arrows and boxes = splice site mutations; purple colored arrows and boxes = missense mutations. HG19 genome build. Transcript: NM_033071 > NP_149062.

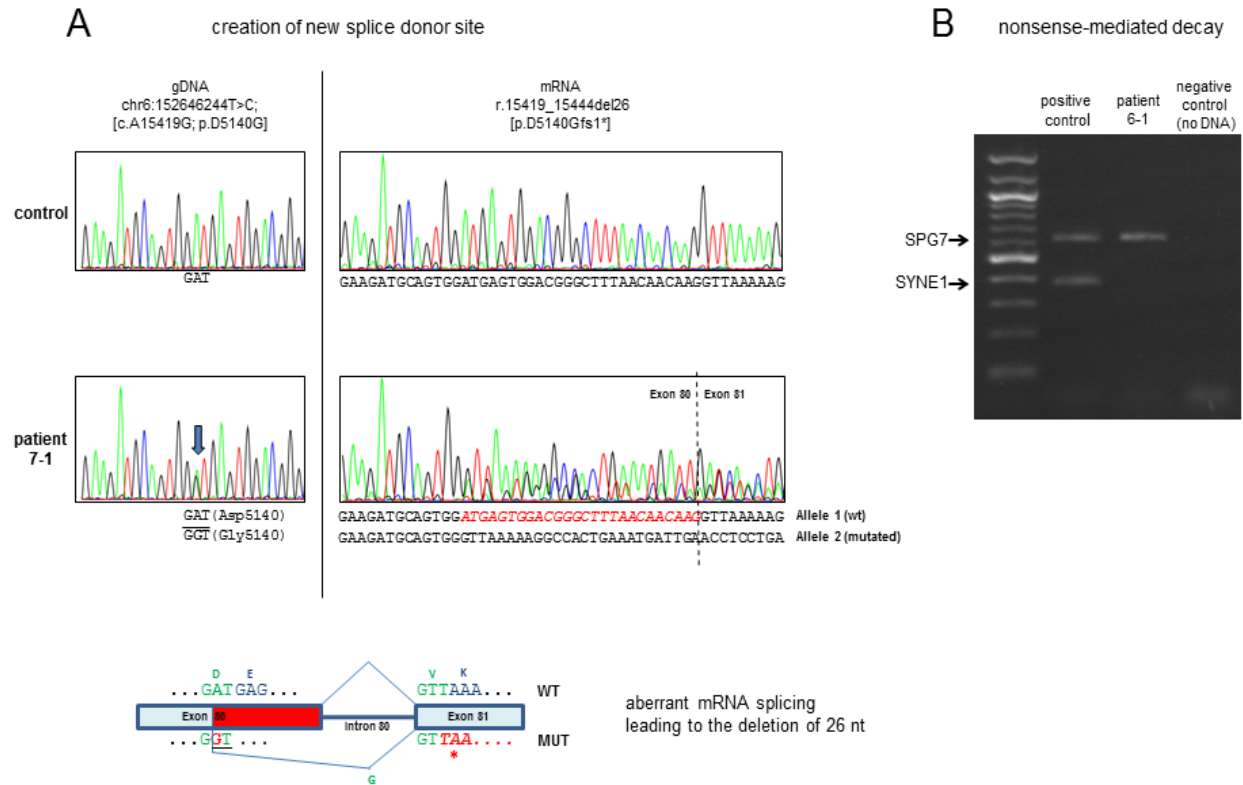


Figure 2. Exemplary mechanisms of *SYNE1* mutations. (A) An exonic base exchange leads to activation of a cryptic splice site. (A) *SYNE1* transcript analysis reveals that the c.A15419G (p.D5140G) mutation (identified in patient 7-1) creates a new splice donor site within exon 80 (GT, underlined in bottom panel) resulting in a 26bp deletion (p.D5140Gfs1*). Upper left panel: sequence analysis of PCR products of amplified genomic DNA showing the A-to-G variant (minus strand) that changes codon 5140 from GAT (Asp) to GGT (Gly). Upper right panel: sequence analysis of amplification products following RT-PCR of *SYNE1* transcript (exons 78-82) from patient's cells showing the presence of the 26-nt deletion (r.15419_15444del26). Bottom panel: schematic diagram showing the aberrant splicing mechanism which leads to the premature truncation of the protein through the deletion of 26 nucleotides in exon 80 (in red). Premature TAA termination codon in exon 81 is shown in bold-red +italics. (B) Truncating *SYNE1* mutations can lead to nonsense-mediated decay of *SYNE1* mRNA. *SYNE1* mRNA carrying the p.L132* and the p.G4752fs null mutations undergoes nonsense-mediated decay. RT-PCR amplification was carried out with primers specific for *SYNE1* (exons 4-9) and *SPG7* (exons 6-10) transcripts. Note the complete absence of the *SYNE1* mutant transcript in patient 6-1 as compared to the control.

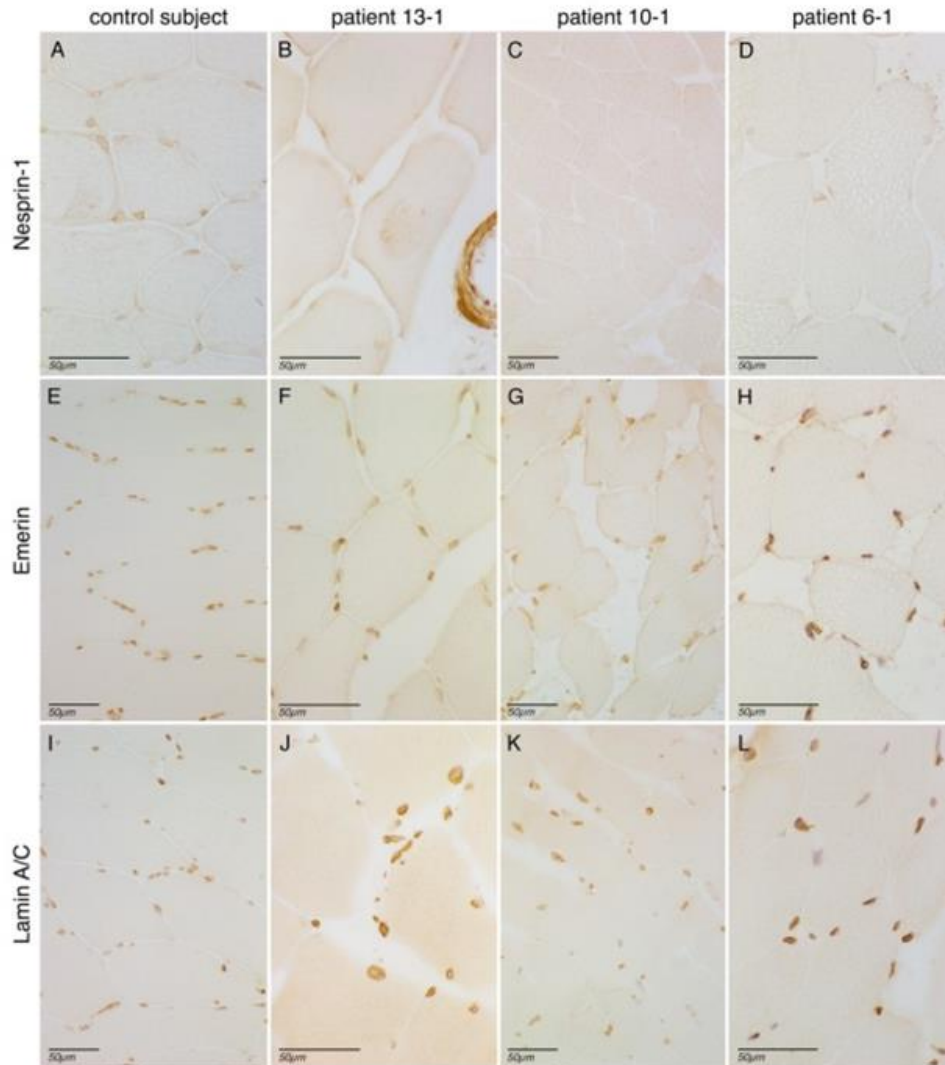


Figure 3. Severely reduced to absent SYNE1 staining in muscle tissue of SYNE1 patients. Immunohistological findings in control tissue (A, E, I), as well as in the quadriceps muscle biopsies of three different SYNE1 patients from three different countries: patient 13-1, Belgian (B, F, J); patient 10-1, German (C, G, K); and patient 6-1, Italian (D, H, L). All three patients show a severely reduced to absent staining of the nuclear envelope after immunolabelling of nesprin-1 (B, C, D), whereas staining was normal in the control (A) (Peroxidase-antiperoxidase technique). To control for an unspecific lack of staining in the SYNE1 patients, further control stainings were performed. Immunolabelling of Emerin and Lamin A/C at the inner nuclear membrane was normal in all three patients as well as the control (E-H and I-L respectively) (Avidin-biotin complex technique).

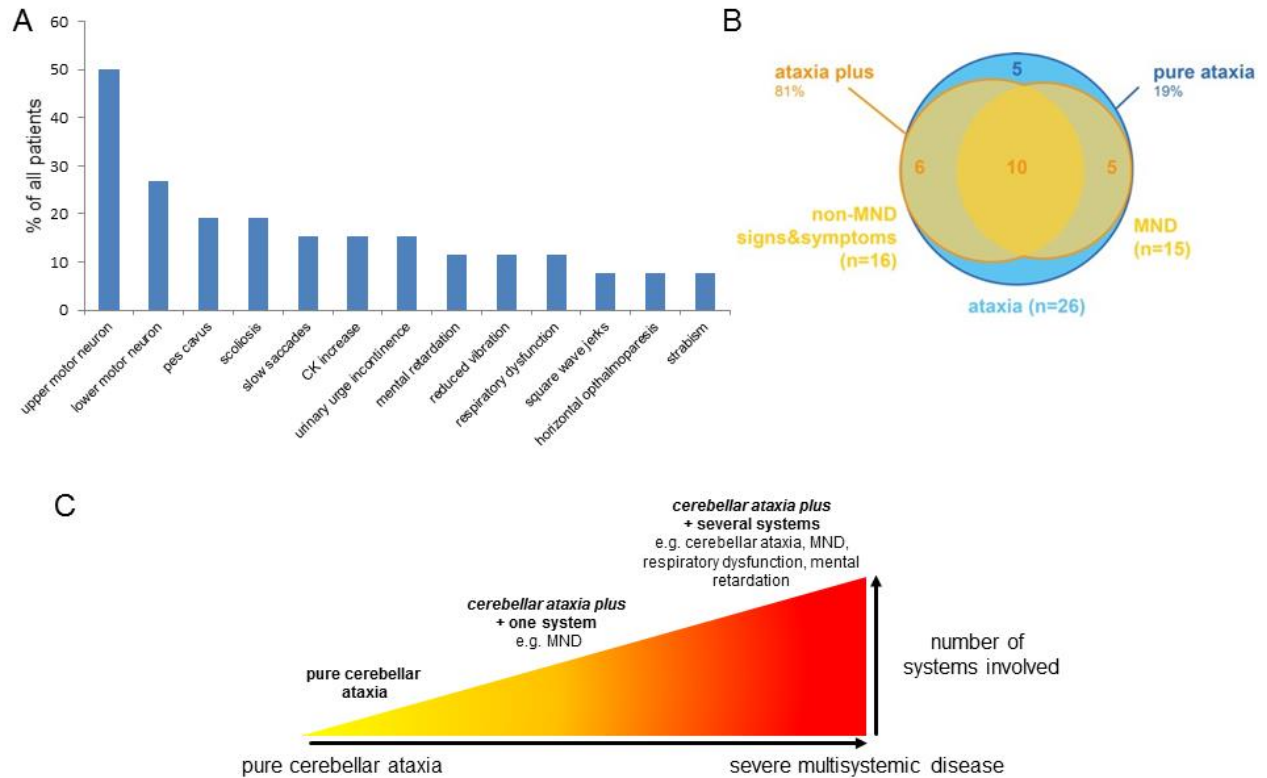


Figure 4: The phenotypic spectrum of SYNE1 disease. (A) Frequency of non-cerebellar features in SYNE1. Relative frequencies of non-cerebellar features observed in the n=26 SYNE1 patients investigated in this study. Note that several patients showed ≥ 2 non-cerebellar disease features. **(B) The relative share of main SYNE1 phenotypes.** This figure illustrates that only a minor share of SYNE1 patients shows pure cerebellar ataxia (blue), whereas the large majority shows cerebellar ataxia plus phenotypes (yellow), in particular cerebellar ataxia plus motor neuron disease (MND). The latter combination is thereby not a distinct ataxia plus-phenotype, but is commonly associated also with other non-MND signs (see overlap group comprising of n=10 subjects). **(C) The continuous spectrum of SYNE1-disease.** The clinical spectrum of neurological and non-neurological SYNE1 features presented in figure A unfolds along a continuous spectrum of disease. Variable combinations of these features can be found in different SYNE1 patients reaching from pure cerebellar ataxia (left side) via cerebellar ataxia plus damage of one or two additional systems (like e.g. motor neuron disease [MND]) to cerebellar ataxia as part of severe multisystemic neurodegenerative syndrome (right side). In addition to ataxia and MND, the latter can include also mental retardation, respiratory distress and visceral organs. The phenotype of mild, slowly progressive pure cerebellar ataxia, which has been considered the most prominent phenotype of SYNE1 so far (Gros-Louis *et al.*, 2007, Noreau *et al.*, 2013), thus represents only one far edge of this broad disease spectrum.

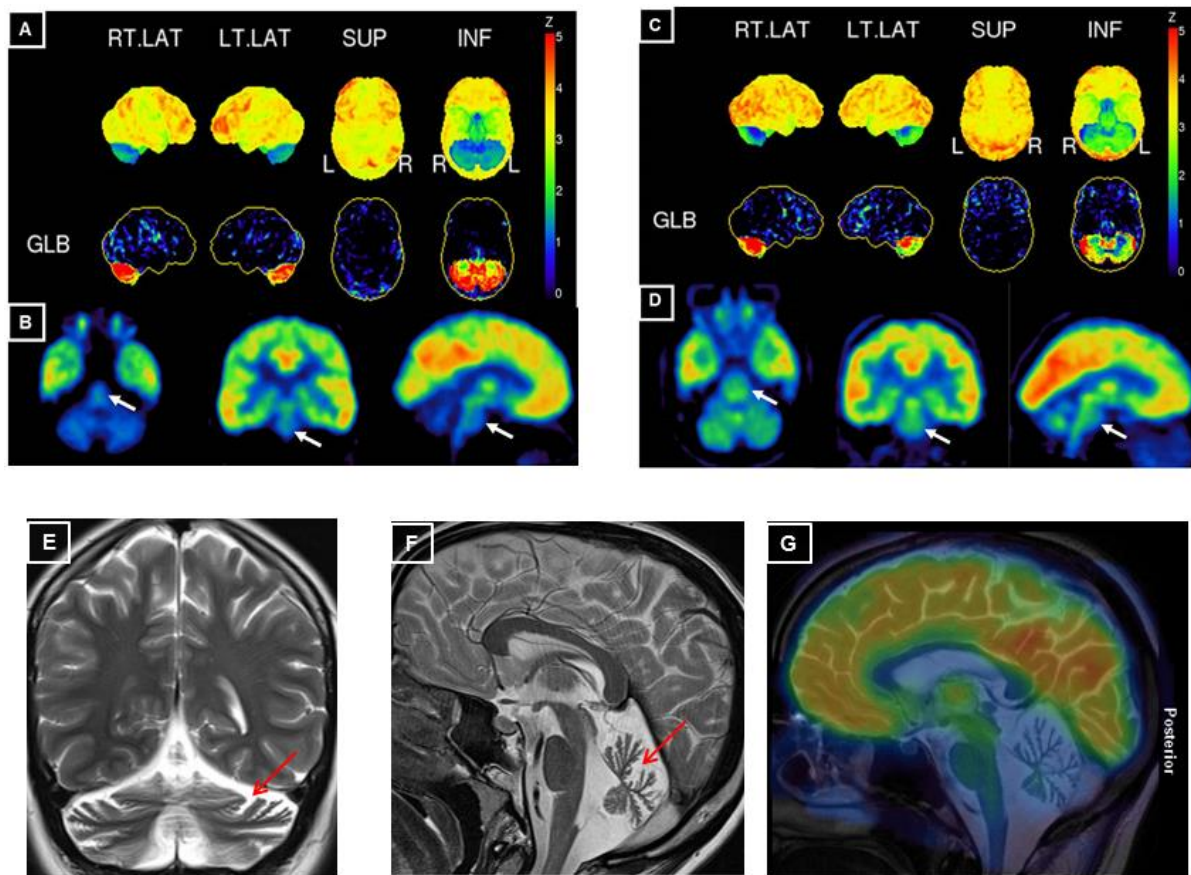


Figure 5: Cerebral ^{18}F - FDG PET and MRI in exemplary SYNE1 subjects. (A, C) Surface projections of the ^{18}F - FDG PET scans of subject 10-1 at age 37 years (A) and subject 9-1 at age 45 years (C). The upper rows in A and C show the surface projection map of cerebral glucose metabolism normalized to the maximum of the acquisition. The lower rows show the deviation of an age adjusted normal database after normalization to a global mean calculation (GLB) of metabolic activity. On both projections, a marked homogenous bilateral reduction of cerebellar FDG metabolism can be seen in both subjects. (B, D) Tomographic projections after automated fitting. For both subject 10-1 (B) and subject 9-1 (D) a reduction of FDG-metabolism is also clearly visible in the brain stem (white arrows), which reached statistical significance in subject #10 with a Z-score of 3 and a trend in subject 9-1 with a Z-score of 1.5 (normalized to pontic metabolism). (E, F) T2 weighted MRI scans in subject #18 at age 21 years shows marked vermian atrophy (F) and cortical hemisphere atrophy (E) of the cerebellum (red arrows). (G) Fusion image of ^{18}F - FDG PET scan of subject 10-1 onto a central paramedian sagittal T2 weighted MRI scan shows considerable hypometabolism in the cerebellum and in the pons, whereas FDG metabolism is normal in the cortical cerebral regions.

variant ID	family ID	phenotype	genomic variant	cDNA variant	protein change	variant type	zygosity	PhyloP	CADD score	MAF 1000genomes	MAF ExAC	MAF EVS 6500	in HGMD
1	#8	CA plus	chr6:152456368C>T	c.25516-1G>A	-NA-	splicing	het	7.62	29.1	0	0	0	absent
2	#18	pCA	chr6:152473139C>T	c.G24054A	p.W8018*	stopgain SNV	het	7.625	61	0	0	0	absent
3	#4	CA plus	chr6:152473168G>A	c.C24025T	p.Q8009*	stopgain SNV	het	5.634	60	0	0	0	absent
4	#5, #23	CA plus	chr6:152476161G>A	c.C23782T	p.R7928*	stopgain SNV	het	1.316	59	0	0	0	absent
5	#7	pCA	chr6:152477125insCA CTCGGCATCAGTGGC ACAGGCGT	c.23684_23685insACGCCTGTG CCAATGATGCC GAGTG	p.C7895fs	stopgain SNV	het	-NA-	54	0	0	0	absent
6	#12	CA plus	chr6:152542097G>T	c.C21528A	p.Y7176*	stopgain SNV	het	0.153	58	0	0	0	absent
7	#9	CA plus	chr6:152542688G>A	c.C21316T	p.Q7106*	stopgain SNV	het	9.038	60	0	0	0	absent
8	#12	CA plus	chr6:152551729G>A	c.C20935T	p.R6979*	stopgain SNV	het	1.371	41	0	0	0	absent
9	#14	CA plus	chr6:152555035G>A	c.C20380T	p.Q6794*	stopgain SNV	het	9.476	60	0	0	0	absent
10	#23	CA plus	chr6:152557241C>G	c.G20183+1G>C	-NA-	splicing	het	7.808	33	0	0	0	absent
11	#10	CA plus	chr6:152558041G>A	c.C19897T	p.Q6633*	stopgain SNV	homo	7.646	59	0	0	0	absent
12	#11	CA plus	chr6:152558084C>G	c.19855-1G>C	-NA-	splicing	homo	7.304	28.1	0	0	0	absent
13	#19	CA plus	chr6:152605163G>A	c.C17944T	p.R5982*	stopgain SNV	homo	1.582	50	0	0	0	absent
14	#14	CA plus	chr6:152615251insT	c.17480_17481insA	p.Y5827*	stopgain SNV	het	-NA-	38	0	0	0	absent
15	#18	pCA	chr6:152639275- 152639281delTCAAGT TT	c.16294_16300delAAACTGA	p.K5432fs	frameshift deletion	het	-NA-	40	0	0	0	absent
16	#3	pCA	chr6:152642966G>A	c.C15760T	p.R5254*	stopgain SNV	homo	5.373	53	0	0	0	absent
17	#4	CA plus	chr6:152644651- 152644652delGA	c.15665_15666delTTC	p.S222fs	frameshift deletion	het	-NA-	35	0	0	0	absent
18	#7	pCA	chr6:152646244T>C	c.A15419G	p.D5140Gfs1*	(cryptic) splicing	het	3.931	19.05	0	8,20E-06	0	absent
19	#2	CA plus	chr6:152651038G>A	c.C14569T	p.Q4857*	stopgain SNV	het	7.928	51	0	0	0	absent
20	#21	CA plus	chr6:152651345insA	c.14261- 14262insT	p.L4754fs	frameshift insertion	het	-NA-	36	0	0	0	absent
21	#6	CA plus	chr6:152651352- 152651352delC	c.14255delIG	p.G4752fs	frameshift deletion	het	-NA-	36	0	0	0	absent
22	#1	pCA	chr6:152652521-15265	c.13086delC	p.H4362fs	frameshift deletion	homo	-NA-	24.8	0	0	0	absent
23	#15	CA plus	chr6:152657975C>T	c.12315+1G>A	-NA-	splicing	homo	7.499	26.2	0	0	0	absent
24	#9	CA plus	chr6:152665320G>A	c.C11908T	p.R3970*	stopgain SNV	het	6.313	51	0	0	0	absent
25	#5	CA plus	chr6:152706854insAT	c.8627_8628insAT	p.M2876fs	frameshift insertion	het	-NA-	34	0	0	0	absent
26	#8	CA plus	chr6:152711589T>C	c.8026-2A>G	-NA-	splicing	het	7.542	25.6	0	0	0	absent
27	#16	pCA	chr6:152722345C>T	c.G6978A	p.W2326*	stopgain SNV	homo	5.118	20.3	0	0	0	absent
28	#21	CA plus	chr6:152737559G>A	c.C6034T	p.R2012*	stopgain SNV	het	0.595	32	0.0002 rs200119679	8,20E-06	0	absent
29	#17	CA plus	chr6:152765668C>A	c.G3736T	p.E1246*	stopgain SNV	homo	5.495	39	0	0	0	absent
30	#20	CA plus	chr6:152776698T>A	c.A2776T	p.K926*	stopgain SNV	het	3.905	36	0	0	0	absent
31	#22	CA plus	chr6:152826408G>A	c.C727T	p.R243*	stopgain SNV	homo	0.771	35	0	0	0	absent
32	#13	CA plus	chr6:152826453G>A	c.C682T	p.R228*	stopgain SNV	homo	4.534	36	0	8,20E-06	0	absent
33	#20	CA plus	chr6:152826476A>G	c.T659C	p.F220S	missense	het	9.339	28.8	0	0	0	absent
34	#6	CA plus	chr6:152832174A>T	c.T395A	p.L132*	stopgain SNV	het	9.14	38	0	1,60E-05	0	absent
35	#2	CA plus	chr6:152841593C>T	c.309+1G>A	-NA-	splicing	het	7.187	27.8	0	0	0	absent

Table 1: SYNE1 mutations identified in this study. Genomic positions of the variants according to genome build HG19. Protein change according to NM_033071. Variant type according to GVS function based on NP_149062. PhyloP = PhyloP conservation score based on base-wise conservation across 100 vertebrates. CADD score = scaled Combined Annotation Dependent Depletion score, integrating many diverse annotations into a single measure (C score) for each variant. The predicted pathogenicity of each variant is scored and ranked relative to all ~8.6 billion SNVs of the GRCh37/hg19 reference. A scaled CADD score of 20 indicates variants at the top 1%, a CADD score of 30 indicates variants at the top 0.1%, etc. (Kircher et al., 2014). MAF = minor allele frequency. ExAc= Exome Aggregation Consortium. EVS = Exome Variant Server 6500 exomes all from the NHLBI GO Exome Sequencing Project. HGMD = Human Gene Mutation Database.

patient ID (family_ individual)	origin/ gender	age of onset	age at last examination (years)	phenotype category	SARA score	cerebellar ataxia	dysfunction upper motor neuron	dysfunction lower motor neuron	additional clinical features	cerebellar atrophy (MRI)	peripheral neuropathy (NCS)	EMG changes (muscle)	abnormal MEPs
1-1	Turkish/m	22	32	pure CA	13	+	-	-	-	+	-	-	n.d.
3-1	Turkish/f	25	40	pure CA	12	+	-	-	-	+	-	n.d.	n.d.
7-1	Italian/f	36	48	pure CA	5	+	-	-	-	+	-	-	-
16-1	French/f	27	62	pure CA	18	+	-	-	-	+	-	-	n.d.
18-1	German/f	19	23	pure CA	9	+	-	-	-	+	-	-	n.d.
4-1	German/f	40	67	CA plus	18	+	signs +; spasticity LL	-	urge incontinence	+	-	n.d.	abnormal LL
5-1	Italian/m	35	75	CA plus	25	+	-	+	slow saccades	+	n.d.	n.d.	n.d.
9-1	German/m	28	46	CA plus	15,5	+	signs +; spasticity gait	-	mild macroglossia; esotropia;	+	n.d.	n.d.	n.d.
10-1	German/f	21	39	CA plus	22	+	signs +; spasticity LL and UL	-	urge incontinence	+	-	-	abnormal UL + LL
11-1	Turkey/f	18	25	CA plus	16,5	+	signs +	+	strabism divergens, fasciculation face, fibrillation tongue, reduced vibration sense, depression, mild CK increase	+	-	chronic neurogenic	abnormal UL+LL
12-1	Moroccan/f	30	42	CA plus	14	+	signs +; spasticity LL;	-	-	+	-	n.d.	n.d.
12-2	Moroccan/f	28	40	CA plus	14	+	signs +; spasticity gait	-	-	+	-	-	n.d.
13-1	Belgian/f	6	36	CA plus	33	+	signs +; spasticity LL and UL	+	respiratory distress, mental retardation, sacral cyst, malrotation colon, pseudarthrosis clavicular, 2 kidneys right sided, kyphosis, scoliosis, high CK elevation, pes cavus, strabism, cataract, myoclonus	+	-	acute neurogenic	abnormal LL
13-1	Belgian/m	6	28	CA plus	33	+	signs +; spasticity LL	+	respiratory distress (BIPAP all day), mental retardation (IQ= 60), hypertelorism, high CK elevation, pes cavus, hyperlaxity, achilles tendon contractures	+	-	acute + chronic neurogenic	n.d.
14-1	German/m	15	29	CA plus	8	+	signs +; spasticity LL	+	pes cavus	+	-	n.d.	abnormal UL+LL
19-1	Italian/f	10	49	CA plus	28	+	signs +; spasticity LL	-	slow saccade initiation; horizontal ophthalmoparesis; facial myokymia	+	n.d.	n.d.	n.d.
20-1	French/m	24	70	CA plus	24	+	-	+: proximal	reduced vibration sense, urge incontinence, bulging eyes; upper limb dystonia	+	n.d.	n.d.	n.d.
21-1	Italian/f	16	50	CA plus	20	+	signs +	-	urge incontinence	+	n.d.	n.d.	n.d.
22-2	Italian/m	20	65	CA plus	18	+	signs +	-	scoliosis, dysphagia	+	+ : mild sensory axonal, LL	-	-
23-1	Italian/m	10	21	CA plus	22	+	signs +; spasticity gait	+	cognitive deficit (IQ= 49); slow saccades, CK increase, restrictive ventilatory defect, pes cavus	+	+, motor axonal	chronic neurogenic	abnormal UL+LL
2-1	German/m	24	63	CA plus	14	+	-	-	slow vertical saccades	+	-	n.d.	n.d.
6-1	Italian/f	20	27	CA plus	13	+	-	-	scoliosis	+	-	-	n.d.
8-1	Italian/f	25	65	CA plus	22	+	-	-	scoliosis; kyphosis	+	-	-	n.d.
15-1	French/m	27	43	CA plus	13	+	-	-	square wave jerks, horizontal ophthalmoparesis, mild microretrognathism, unilateral ptosis	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
15-2	French/f	17	58	CA plus	11	+	-	-	scoliosis, seizures at age 2 year, square wave jerks	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
17-1	Algerian/f	7	32	CA plus	21	+	-	-	pes cavus	+	-	-	n.d.

Table 2: Clinical, imaging and electrophysiological features of SYNE1 patients.

Table 2: Clinical, imaging and electrophysiological features of SYNE1 patients. Patient ID= family number_individual number; m=male; f= female; pure CA= pure cerebellar ataxia; CA plus = cerebellar ataxia plus at least one additional system damage; + = present; - = absent; SARA = scale for the assessment and rating of ataxia; upper motor neuron signs = Babinski positive and/or hyperreflexia of muscle tendon reflexes; UL = upper limb, LL = lower limb; MRI= magnetic resonance imaging; NCS= nerve conduction studies; EMG= electromyography; n.d. = not done.

Supplement

Supplement 1: Next-generation sequencing strategies for SYNE1 mutation screening

A) Targeted sequencing by HaloPlex gene panel.

N=179 patients were screened for SYNE1 mutations as part of a high coverage (>94% mean coverage) HaloPlex gene panel kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA) which included >120 known ataxia genes. Sequencing started with fragmentation of DNA by digestion with multiple restriction enzymes. A set of gene-specific HaloPlex selector probes was hybridized to the fragmented DNA, thereby inducing the target fragments to form circular DNA molecules that also contain method-specific sequencing motifs (PBS) as well as a biotin label. Probe/Target DNA molecules were captured and purified using magnetic streptavidin beads. Probe/Target circles were then ligated to ensure that only perfectly hybridized fragments were circularized. A PCR amplification step provided an enriched library ready for sequencing. Sample barcodes (MID) were introduced during amplification for precise tracking. Finally, the enriched library was checked for quality and quantity prior to sequencing on an Illumina MiSeq sequencing device by means of a 2 X 150 bp paired end approach (MiSeq sequencing kit V2). Reads were mapped against the hg19 standard reference genome to detect SNPs, SNV, short deletions and insertions (SAMtools, IGV).

B) Targeted panel sequencing by Agilent Sureselect kit.

N=144 patients were screened for SYNE1 mutations as part of a targeted exon-capture strategy (Agilent Sureselect kit) coupled with multiplexing and high-throughput sequencing of 57 genes causing ataxia when mutated. The Agilent system consists in a capture of the genomic regions harboring the exons, based on the hybridization of complementary designed biotinylated cRNA

oligonucleotides. (with a capture size of 285kb). Reads were mapped against the hg19 standard reference genome to detect SNPs, SNV, short deletions and insertions (SAMtools, IGV).

C) Targeted sequencing by Illumina customized high-coverage panel

N=21 patients were screened part of an amplicon-based customized panel (Illumina TrueSeq Custom Amplicon, TSCA) run on an Illumina MiSeq apparatus covering 76 known ataxia genes (n=21). SYNE1 was covered with an average $\geq 20X$ -coverage of $93.5\% \pm 2.8$ SD. Reads were mapped against the hg19 standard reference genome to detect SNPs, SNV, short deletions and insertions (SAMtools, IGV).

D) Targeted sequencing by Illumina Nextera Rapid Capture Custom kit

N=54 patients were screened as part of a targeted exon-capture resequencing strategy (Illumina Nextera Rapid Capture Custom kit) which included 107 known ataxia genes. Reads were mapped against the hg19 standard reference genome to detect SNPs, SNV, short deletions and insertions (SAMtools, IGV).

E) *Whole exome sequencing.*

N= 41 patients were screened for SYNE1 mutations as part of a whole exome-sequencing study. WES was performed using the SureSelect Human All Exon 50Mb kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA) for in-solution enrichment and the Hiseq2000 instrument exome sequencing (Illumina, San Diego, CA, USA). Paired-end reads of 100 bp length were produced. BWA and GATK software packages (Li and Durbin, 2009, McKenna *et al.*, 2010, DePristo *et al.*, 2011) were used to align sequence reads to the reference and call variant positions, respectively. All data were then annotated and imported into GENomes Management Application (GEM.app), a web-based tool

for next generation sequencing data analysis(Gonzalez *et al.*, 2013) (genomics.med.miami.edu). Using the GEM.app analysis module ‘Genes Across Families’, we then filtered for non-synonymous homozygous or compound heterozygous truncating variants in *SYNE1* (frame-shift, insertions, deletions, and stop mutations), with low frequency in public databases (minor allele frequency in dbSNP137 and NHLBI ESP6500 < 0.5%), and moderate genotype quality (GATK quality index > 30 and genotype quality GQ > 30).

Supplement 2: FDG PET analysis

Following stereotactic anatomic standardisation, metabolic activity on the subject's PET scan was laid out in three-dimensional stereotactic surface projections. The subjects' datasets were compared individually with the institutional age-adjusted normal database by calculating a Z-score on a pixel-by-pixel basis. The results of this analysis were displayed in 3D-SSP views for visual inspections. A standardized software delivering three dimensional tomographic images after automated fitting to 3D reference normal templates (BRASS, Hermes Medical Solutions, Stockholm, Sweden) was used for analysis of subcortical structures like the basal ganglia.

Supplement 3: Conservation of the p. F220S variant

The actin-binding domain (or calponin-homology domains) of SYNE1 is highly conserved, even in non-metazoan species (paralogues in ichthyospora, fungi and slime mold, E-values in the range of 5×10^{-40} to 10^{-50}) while the spectrin domains of SYNE1 provide no significant alignment with paralogues of the same non-metazoan species (E-values above 10). The p. F220S (chr6:152826476A>G; c.T659C) mutation affects one of the 6 invariant amino-acid positions of the second calponin-homology domain in nesprin, spectrin and alpha-actinin homologues (see figure below). It was observed in *trans* with a non-sense mutation in family #20.

SYNE1.p.F220S¶

```
..... S I
SYNE1.....Homo.sapiens...AKKALLKWWQYTAGKQ--TGIEVKDFGKSWRSGVAFHSVIHAIRPELVLDLETVKGRSNREN¶
SYNE1.....Strongylo.pur...AKEALMNWAQRNVKDY--PGVQIKDFGRSWRDGLAFNAIIHKNRPDILINYESLKPSEHRAN¶
SYNE1.....Apis.mellifera...ARKTLLQWVTNALPKD---IKVRDFGESWRDGNLFLAIIIDAIKANLVNIAAMREATNRTR¶
SYNE1.....Drosophila.m...ARKTLLNWTNALPKD--SGVEVKDFGASWRDGVAFALIDAIDAIKANLVNLAE LKKT SNRQR¶
SYNE1.....Nematostella.v...TRKFMLEWAKKATSKASGSNEAIKDFSTSWRTGQAF LQIIHSFRPDLVNIIATIAERDNITN¶
¶
Spectrin.beta.4.Homo.sapiens...AKDALLLWCQMKTAGY--PEVNIQNFSTSWRDGLAFNALIHRRHPDLVDFSKLTKSNANYN¶
Spectrin.beta.2.Strongylo.pur...AKDALLLWCQMKTAGY--ANVDIRNFSTSWRDGLAFNALVHKHRPDLIDYNKLTQVQPVQN¶
Spectrin.beta.Apis.mellifera...AKDALLLWCQMKTAGY--PGVNIQDFTGSWRSGLAFNALIHHRHPDLVNWSELQQNKNIIDN¶
Spectrin.beta.Drosophila.m...AKDALLLWCQMKTAGY--HNVNVRNFSTSWRDGLAFNAIIHKHRPDLVQFEKLSKTNAIHN¶
Spectrin.beta.Nematostella.v...AKEALLLWCQRMTRGY--PGVDIQNFSTSWRNGLAFNALLHKHRPDLIDYATLRPSQHEAN¶
Spectrin.beta.Capsaspora.ow...AKEALLLWCQMKTAGY--PGVNVQDFSKSWSNGLAFNALIHHRHPDLDFNALSSGDPVAN¶
¶
Alpha-actinin.Homo.sapiens...AKEGLLLWCQKRTAPY--KNVNIQNFHISWKDGLAFNALIHRRHPDLIDYGLKLRKDDPLTN¶
Alpha-actinin.Strongylo.pur...AKEGLLLWCQKRTAPY--RNVNIQNFHNSWKDGLAFNALIHRRHPDLIDYGLKLRKDDPATN¶
Alpha-actinin.Apis.florea...AKEGLLLWCQKRTAPY--KNVNVQNFHLSFKDGLAFNALIHRRHPDLIDYNKLSKDNPLEN¶
Alpha-actinin.Droso.melan...AKEGLLLWCQKRTAPY--KNVNVQNFHLSFKDGLAFNALIHRRHPDLIDYAKLSKDNPLEN¶
Alpha-actinin.Nematostella...AKDGLLLWCQKRTAPY--KNVSVKNFSTSWFKDGLAFNALIHRRHPDLIDYDSLKEDPLYN¶
Alpha-actinin.Schizos.pombe...AKEGLLLWCQKRTANY--HPEVDVQDFTRSWTNGLAFNALIHQHRPDLIDYNKLDKKNHRAN¶
Alpha-actinin.Neurosp.crassa...AKEGLLLWCQKRTACY--DEVVDRDFSGSWNDGLAFNALIDIHRRPDLIDYDALDKSDHRGN¶
Alpha-actinin.Dictyo.disc...AKEALLLWCQKRTEGY--DRVKVGNFHTSFQDGLAFNALIHHRHPDLINFDLSLNKDDKAGN¶
```

References

- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods*. 2010;7(4):248-9.
- Apel ED, Lewis RM, Grady RM, Sanes JR. Syne-1, a dystrophin- and Klarsicht-related protein associated with synaptic nuclei at the neuromuscular junction. *J Biol Chem*. 2000;275(41):31986-95.
- Attali R, Warwar N, Israel A, Gurt I, McNally E, Puckelwartz M, et al. Mutation of SYNE-1, encoding an essential component of the nuclear lamina, is responsible for autosomal recessive arthrogyposis. *Human molecular genetics*. 2009;18(18):3462-9.
- Crosby AH, Proukakis C. Is the transportation highway the right road for hereditary spastic paraplegia? *American journal of human genetics*. 2002;71(5):1009-16.
- DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet*. 2011;43(5):491-8.
- Dupre N, Gros-Louis F, Bouchard JP, Noreau A, Rouleau GA. SYNE1-Related Autosomal Recessive Cerebellar Ataxia. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP, editors. *GeneReviews*. Seattle (WA); 1993/2012. p. accessed on July 13th, 2014.
- Dupre N, Gros-Louis F, Chrestian N, Verreault S, Brunet D, de Verteuil D, et al. Clinical and genetic study of autosomal recessive cerebellar ataxia type 1. *Ann Neurol*. 2007;62(1):93-8.
- Fogel BL, Lee H, Deignan JL, Strom SP, Kantarci S, Wang X, et al. Exome sequencing in the clinical diagnosis of sporadic or familial cerebellar ataxia. *JAMA neurology*. 2014;71(10):1237-46.
- Forster S, Vaitl A, Teipel SJ, Yakushev I, Mustafa M, la Fougere C, et al. Functional representation of olfactory impairment in early Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2010;22(2):581-91.

Gonzalez MA, Lebrigio RF, Van Booven D, Ulloa RH, Powell E, Speziani F, et al. GENomes Management Application (GEM.app): A New Software Tool for Large-Scale Collaborative Genome Analysis. *Hum Mutat.* 2013;34(6):842-6.

Gros-Louis F, Dupre N, Dion P, Fox MA, Laurent S, Verreault S, et al. Mutations in SYNE1 lead to a newly discovered form of autosomal recessive cerebellar ataxia. *Nat Genet.* 2007;39(1):80-5.

Izumi Y, Miyamoto R, Morino H, Yoshizawa A, Nishinaka K, Udaka F, et al. Cerebellar ataxia with SYNE1 mutation accompanying motor neuron disease. *Neurology.* 2013;80(6):600-1.

Kircher M, Witten DM, Jain P, O'Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet.* 2014;46(3):310-5.

Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25(14):1754-60.

Martin JJ, Ceuterick C, Van Goethem G. On a dominantly inherited myopathy with tubular aggregates. *Neuromuscul Disord.* 1997;7(8):512-20.

McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome research.* 2010;20(9):1297-303.

Noreau A, Bourassa CV, Szuto A, Levert A, Dobrzeniecka S, Gauthier J, et al. SYNE1 mutations in autosomal recessive cerebellar ataxia. *JAMA neurology.* 2013;70(10):1296-31.

Poirier K, Lebrun N, Broix L, Tian G, Saillour Y, Boscheron C, et al. Mutations in TUBG1, DYNC1H1, KIF5C and KIF2A cause malformations of cortical development and microcephaly. *Nat Genet.* 2013;45(6):639-47.

Puckelwartz MJ, Kessler E, Zhang Y, Hodzic D, Randles KN, Morris G, et al. Disruption of nesprin-1 produces an Emery Dreifuss muscular dystrophy-like phenotype in mice. *Human molecular genetics.* 2009;18(4):607-20.

Razafsky D, Hodzic D. A variant of Nesprin1 giant devoid of KASH domain underlies the molecular etiology of autosomal recessive cerebellar ataxia type I. *Neurobiol Dis.* 2015;78:57-67.

Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D. Improved splice site detection in Genie. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology.* 1997;4(3):311-23.

Schmitz-Hubsch T, du Montcel ST, Baliko L, Berciano J, Boesch S, Depondt C, et al. Scale for the assessment and rating of ataxia: development of a new clinical scale. *Neurology.* 2006;66(11):1717-20.

Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nature methods.* 2010;7(8):575-6.

Sim NL, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng PC. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic acids research.* 2012;40(Web Server issue):W452-7.

Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic acids research.* 2010;38(16):e164.

Zhang J, Felder A, Liu Y, Guo LT, Lange S, Dalton ND, et al. Nesprin 1 is critical for nuclear positioning and anchorage. *Human molecular genetics.* 2010;19(2):329-41.

Zhang X, Xu R, Zhu B, Yang X, Ding X, Duan S, et al. Syne-1 and Syne-2 play crucial roles in myonuclear anchorage and motor neuron innervation. *Development.* 2007;134(5):901-8.

2.3.4. Séquençage haut débit avec capture ciblée

L'exome étant trop coûteux en 2011 pour être utilisé sur une série importante de patients, une méthode de séquençage par capture ciblée a été développée à l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) à Illkirch Graffenstaden afin d'être utilisée pour le diagnostic de maladies héréditaires rares notamment dans le cadre des ataxies cérébelleuses, des myopathies (Vasli et al., 2012) et des retards mentaux (Redin et al., 2014).

2.3.4.1. Sélection des patients

Que l'on se place du point de vue du clinicien ou du chercheur, l'objectif est d'avoir la meilleure rentabilité diagnostique c'est-à-dire obtenir un maximum de diagnostics positifs. Cependant, le clinicien n'a pas à disposition une cohorte de patients homogènes mais des patients avec une variabilité importante dans les âges de début et dans les tableaux cliniques. L'ataxie cérébelleuse peut être pure mais est fréquemment associée à une neuropathie, un retard mental, un syndrome pyramidal ou une épilepsie. De nombreux patients sont des cas sporadiques pour lequel le doute entre cause génétique et acquise persiste pendant de nombreuses années. Il existe une tentation légitime à aller explorer chaque tableau clinique complexe comportant une ataxie cérébelleuse. Le nombre important de patients sans diagnostic peut faire en partie état de cette difficulté diagnostique.

Cent cinquante-cinq patients ont été sélectionnés par des cliniciens de différentes villes françaises et algériennes qui présentaient une ataxie cérébelleuse sans diagnostic moléculaire. La plupart avaient des formes sporadiques ou récessives. Dix patients avaient un arbre généalogique en faveur d'une affection autosomique dominante.

En raison des difficultés d'interprétation fréquemment rencontrées, il faut idéalement que l'étude clinique du patient et surtout de la famille soit poussée au maximum des possibilités. L'examen clinique des parents permet en théorie de déterminer s'il s'agit d'une forme dominante ou potentiellement récessive (avec les limites que l'on connaît). L'accès à la clinique et à l'ADN des parents et de la fratrie est un élément crucial dans l'interprétation des résultats. Des signes neurologiques discrets chez un des parents peuvent orienter vers une cause dominante changeant complètement l'interprétation des données.

La sélection de patients en rapport avec le panel de gènes choisis est importante : les gènes de syndrome de Joubert ne seront probablement pas pertinents sur une série de patients comprenant principalement des patients débutant à l'âge adulte. Cependant, cette affirmation est à tempérer car un des intérêts du séquençage haut débit est aussi de trouver des phénotypes atypiques de maladies de forme plus légère ou plus sévère que la description initiale.

A l'exception de trois témoins positifs, la série de patients explorée dans le laboratoire était composée uniquement de patients sans diagnostic. Certains patients avaient déjà eu des explorations relativement exhaustives concernant d'autres pathologies génétiques.

Avant de séquencer l'ADN des patients, il faut avoir recherché certaines pathologies acquises et génétiques notamment les pathologies par expansion de triplets pour lequel le séquençage haut débit est mis en défaut. Il faut exclure par analyse moléculaire les pathologies récessives fréquentes (maladie de Friedreich) ou facilement explorables par une analyse biochimique simple (dosage sanguin de la vitamine E dans l'ataxie par déficit en vitamine E) et les pathologies dominantes avec antécédent familial comme les SCA par expansion de polyglutamine qui ne sont pas explorées par cette technique (SCA1, 2, 3, 6, 7, 17, DRPLA).

Avant la réalisation du séquençage haut débit, l'ataxie de Friedreich a été exclue chez tous les patients, la vitamine E a été analysée chez tous les patients français et les mutations dans *APTX*, *SETX*, *ADCK3*, ont été exclues chez respectivement 30, 11 et 33 patients.

De même, des mutations avec effet fondateur avaient été recherchées chez des patients originaires du Maghreb, ne retrouvant pas d'anomalies dans l'exon 9 d'*ABHD12* (syndrome PHARC) ni dans l'exon 5 de *TTPA* (ataxie par déficit en vitamine E) chez respectivement 24 et 16 des patients analysés.

L'analyse des SCA 1, 2, 3, 6 et 7 avait été effectuée chez 18 patients et la recherche d'expansion intronique dans *FMRI* (FXTAS) chez 8 patients sans retrouver d'anomalies.

2.3.4.2. Sélection des gènes

La réalisation du séquençage pour des patients avec ataxie de début aussi bien pédiatrique qu'adulte a conduit au choix d'un panel de gènes (tableau 2) assez large allant des ataxies congénitales comme le syndrome de Joubert à des gènes de début plus tardif (*SYNE1*, *POLG*). Pour les pathologies récessives, des gènes de maladies métaboliques (*NPC1*, *NPC2*, *GALC*, *L2HGDH*...) et d'épilepsies myocloniques progressives (*CSTB*, *PRICKLE1*) ont aussi été retenus.

Pour les maladies de transmission dominante, les ataxies spinocérébelleuses dominantes sans expansion de triplet pour lequel le gène était identifié ont été sélectionnées (liste dans le tableau 2).

Pour les ataxies de transmission liée à l'X, seul les gènes *ABCB7* (syndrome ASAT) et *OFD1* (syndrome de Joubert) ont été sélectionnés.

Les gènes de certaines paraplégies spastiques complexes n'étaient pas clairement connus comme responsable d'ataxie cérébelleuse en 2011 au moment de la réalisation de la sélection de la capture ciblée, raison pour laquelle ils n'apparaissent pas dans la capture. En plus de *FA2H* (cf. partie 2.2.5), le gène *ZFYVE26* (SPG15) a été impliqué dans un cas présentant une ataxie cérébelleuse (Pyle et al., 2014). La famille associée au locus SPG46 présentait une ataxie spastique mais le gène *GBA2*, responsable de cette maladie, n'avait pas encore été découvert. Le gène *SPG7* aurait pu être inclus car ce gène est connu comme responsable d'ataxie spastique.

Abêtalipoprotéinémie	MTTP
Ataxie avec déficit en coenzyme Q10	ADCK3
Déficit en alpha-méthylacyl-coA racémase	AMACR
Anémie sidéroblastique et ataxie spino-cérébelleuse (ASAT)	ABCB7
ARCA3 (SCAR10)	ANO10
ARCA1 (SCAR8)	SYNE1
ARSACS	SACS
Ataxie téléangiectasie	ATM
Ataxie téléangiectasie-like (ATLD)	MRE11A
Ataxie, neuropathie axonale, hypoalbuminémie (SCAN1)	TDP1
Ataxie avec apraxie oculomotrice type 2 (AOA2)	SETX
Ataxie avec apraxie oculomotrice type 1 (AOA1)	APTX
Ataxie de Salih	KIAA0226
AVED	TTPA
Ataxie de Cayman	ATCAY
Ataxie cérébelleuse et retard mental avec ou sans locomotion quadrupédale type 3	CA8
Ataxie cérébelleuse et retard mental avec ou sans locomotion quadrupédale type 1	VLDLR
Xanthomatose cérébrotendineuse	CYP27A1
Ataxie-épilepsie (SCAR12)	WFOX
Désordre de glycosylation type 1a (CDG1A)	PMM2
Ataxie de Friedreich	FXN
Gangliosidose 1 (GM1)	GLB1
IOSCA	Twinkle
Syndrome de Joubert type 1	INPP5E
Syndrome de Joubert type 10	OFD1
Syndrome de Joubert type 12	KIF7
Syndrome de Joubert type 13	TCTN1

Syndrome de Joubert type 3	AHI1
Syndrome de Joubert type 6	TMEM67
Syndrome de Joubert type 8	ARL13B
Syndrome de Joubert type 9	CC2D2A
Maladie de Karak	PLA2G6
Maladie de Krabbe (leucodystrophie globoïde)	GALC
Acidurie L-2-hydroxyglutarique	L2HGDH
Syndrome de Marinesco-Sjögren	SIL1
Maladie de Niemann-Pick type C1	NPC1
Maladie de Niemann-Pick type C2	NPC2
Polynéuropathie, hypoacousie, ataxie, rétinite pigmentaire, cataracte (PHARC)	ABHD12
Ataxie cordonale postérieure, rétinite pigmentaire (PCARP)	FLVCR1
Maladie de Refsum	PHYH
Maladie de Refsum, forme infantile	PEX2
Maladie de Refsum like	PEX7
Maladie de Sandhoff (GM2)	HEXB
SCA 5	SPTBN2
SCA11	TTBK2
SCA13	KCNC3
SCA14	PRKCG
SCA15	ITPR1
SCA23	PDYN
SCA27	FGF14
SCA28	AFG3L2
Ataxie sensitive, neuropathie, dysarthrie, ophtalmoplégie (SANDO)	POLG
Ataxie spastique de type 4 (SPAX4)	MTPAP
SCAR11	SYT14
Maladie de Tay-Sachs (GM2)	HEXA
Maladie d'Unverricht Lundborg type 1A	CSTB
Maladie d'Unverricht Lundborg type 1B	PRICKLE1

Tableau 2 : Liste des 57 maladies et gènes correspondants inclus dans la capture d'exons

2.3.4.3. Résultats de l'analyse des cent cinquante-cinq patients

Cent cinquante-cinq patients ont été séquencés : 85 cas sporadiques soit 55%, 54 patients porteurs d'une ataxie de transmission récessive soit 35% (deux patients au moins atteints dans la même fratrie avec des parents sains ou un seul atteint issu d'une union consanguine) et 10 patients soit 6,5% avec une transmission dominante. Pour six patients, le mode de transmission était difficile à évaluer. En plus des résultats décrits dans le manuscrit 5, une mutation dans un gène de maladie dominante a été retrouvée dans les gènes *SPTBN2* (SCA5), *KCNC3* (SCA13) et *PRKCG* (SCA14) chez un total de cinq patients, respectivement chez 3 patients pour *KCNC3* et un patient pour *SPTBN2* et *PRKCG*. Cette dernière mutation est, de façon inhabituelle, une mutation homozygote, ce qui a cependant déjà été décrit pour ce gène (Asai et al., 2009).

Un diagnostic sur le plan moléculaire a pu être porté chez trente-deux patients soit 20,6% de la série de 155 patients séquencés.

L'âge de début de l'ataxie dans notre série est inférieur ou égal à 40 ans chez 143 patients, et supérieur à 40 ans chez 12 patients. Neuf des dix patients avec une ataxie de transmission dominante ont débuté après 40 ans.

De nombreux variants faux sens ont été identifiés, dont le caractère pathogène ou polymorphique a souvent posé des difficultés d'interprétation dans des gènes d'ataxies dominantes comme *ITPR1* ou *TTBK2* (VUS ou « variant of unknown significance »). Plusieurs raisons expliquent ces difficultés : des données cliniques du patient insuffisantes (patients perdus de vue), l'absence de données cliniques et moléculaires des parents (décès).

De plus, la présence de la mutation chez un parent sain est peu en faveur d'une affection dominante mais on ne peut exclure une pénétrance incomplète.

Cette série de patients ne peut être utilisée comme étude épidémiologique car il existe un important biais de sélection. Les centres envoyant les ADN ont déjà fait un premier tri des patients. Les pathologies les plus fréquentes comme la maladie de Friedreich ont été exclues ainsi que d'autres maladies en fonction des centres (notamment AOA1, AOA2 et l'ataxie avec déficit en coenzyme Q10).

On peut en tirer la conclusion que les gènes les plus souvent en cause sont *ANO10*, *SETX*, *SYNE1*, *ADCK3*, *SACS* et *APTX* pour les gènes récessifs (avec deux patients ou plus présents dans la série) bien qu'on ne puisse pas formellement établir un ordre de fréquence entre ces gènes.

L'étude de ces gènes serait importante dans l'espoir de comprendre la physiopathologie de ces maladies et trouver des traitements.

Des modèles murins KO pour le gène *ADCK3* sont en cours d'étude à l'IGBMC à Illkirch Graffenstaden (équipe du Dr Hélène Puccio).

Un modèle murin pour *SACS* vient d'être récemment publié (Larivière et al., 2015).

Pour le gène *SYNE1*, une souris transgénique avec effet dominant négatif a été générée (Grady et al., 2005) ainsi qu'une souris KO avec mutation homozygote (Zhang et al., 2007). Il n'y aurait pas d'ataxie dans le modèle murin *SYNE1* *-/-*. Le modèle murin double KO *SYNE1* *-/-* ; *SYNE2* *-/-* développe un élargissement des ventricules, des perturbations de l'organisation corticale, de l'hippocampe et des cellules de Purkinje (Zhang et al., 2009).

Seul des modèles murins KO spécifiques de l'intestin ont été réalisés pour *ANO10* (Schreiber et al., 2015).

Dans notre série, il n'a pas été retrouvé de mutations dans le gène *WWOX* confirmant qu'il s'agit d'un gène rare d'ataxie cérébelleuse. La série de patients était constituée de peu de cas d'ataxie ayant débuté dans la petite enfance ou d'ataxie en association à une épilepsie. Pour retrouver davantage de mutations dans *WWOX*, le séquençage d'une série de patients avec une ataxie de début avant 3 ans s'associant à une épilepsie précoce serait intéressant.

2.3.5. Mutations dans le gène *ANO10*

Le gène *ANO10* a été impliqué en 2010 dans une ataxie cérébelleuse autosomique récessive assez pure sur le plan clinique. Il code pour une protéine qui par homologie de séquence pourrait correspondre à un canal chlore. Cependant, la fonction de cette protéine n'a pas encore été étudiée.

A partir de la série de 155 patients, il a été retrouvé initialement une mutation d'*ANO10*, homozygote ou hétérozygote composite, chez 5 patients. Un sixième patient de capture ciblée a été diagnostiqué mais n'avait pas été inclus dans le manuscrit 4 devant un doute sur la mutation, qui a pu être confirmée secondairement par séquençage Sanger (Patient 12, Manuscrit 3).

Une série multicentrique de 9 patients (Manuscrit 4) a été publiée avec l'ajout de patients diagnostiqués par séquençage par la méthode de Sanger à partir d'une série de 44 autres patients. La découverte de ce nombre relativement important de cas en fait une cause non rare d'ataxie cérébelleuse, qui a été appelée ataxie cérébelleuse autosomique récessive de type 3 ou ARCA3.

Sur le plan du génotype, nous avons pu montrer que la duplication c.132dupA, qui n'avait pas été décrite jusqu'à maintenant, était une mutation fréquente.

Sur le plan phénotypique, la médiane d'âge de début dans notre série est à 33 ans ce qui confirme qu'ARCA3 se présente dans une majorité de cas comme une ataxie cérébelleuse tardive. L'âge de début est variable notamment en fonction de la mutation causale. La médiane d'âge de début dans la première publication était à 22,5 ans ce qui est relativement tardif pour une ataxie cérébelleuse récessive (Vermeer et al., 2010). Une mutation avec effet fondateur dans la population rom, retrouvée chez des patients serbes et bulgares, est responsable d'un début pédiatrique et d'un retard mental (Vermeer et al., 2010 ; Chamova et

al., 2012). L'évolution est lente dans la majorité des cas. Il existe une certaine hétérogénéité clinique avec un syndrome pyramidal ou une épilepsie chez certains patients.

2.3.6. Mutations dans le gène *SYNE1*

Le gène *SYNE1* (144 exons) code pour la protéine géante nesprine-1 de 8797 acides aminés, et environ 1 mégadalton de poids moléculaire.

La protéine comprend un domaine N-terminal « Actin binding », de nombreux domaines spectrine répétés et un domaine KASH en C-terminal (Klarsicht/Unc1/Syne1 Homology). Cette protéine participe à la formation de complexes macromoléculaires permettant de lier l'enveloppe nucléaire au cytosquelette (LINC ou Linkers of the Nucleoskeleton to the Cytoskeleton). Elle a également un rôle dans l'ancrage et dans la migration du noyau notamment au niveau de la jonction neuromusculaire. L'altération de l'isoforme très présent dans le cervelet qui ne possède pas le domaine KASH, *KLNes1g*, pourrait être responsable d'ARCA1. Cet isoforme est exprimé dans la couche granulaire du cervelet et les cellules de Purkinje (Razafsky et al., 2015).

Les mutations de ce gène sont responsables de l'ataxie autosomique récessive de type 1 ou ARCA1 décrit en 2007 chez 53 patients originaires du Québec (Gros-Louis et al., 2007) et d'une forme d'arthrogrypose récessive (Attali et al., 2009).

Quatre patients *SYNE1* avaient été retrouvés par séquençage massivement parallèle dans notre série. Sept patients ont été diagnostiqués en raison de deux familles avec plusieurs atteints. Les données cliniques figurent dans le tableau 3 (données cliniques non disponibles pour certains patients perdus de vue). Les données de la confirmation par séquençage Sanger (électrophérogrammes) sont présentées dans la figure 11. Le cas de la patiente d'origine algérienne a été récemment publiée (Hamza et al., 2015).

Nous avons réalisé une étude multi-centrique collaborative (Manuscrit 5) qui élargit le spectre phénotypique de SYNE1 notamment en décrivant de nouvelles mutations et des formes plus sévères que celles publiées dans les premières publications chez une minorité de patients.

Famille- patient	Nationalité/ sexe	Premiers symptômes/ âge de début	Age à l'examen (ans)	Ataxie cérébelleuse	Age de début de l'ataxie cérébelleuse	Score SARA (/40)	Spasticité/s yndrome pyramidal	Réflexes ostéo- tendineux	Déficit moteur/ amyotrophie	Autres	IRM cérébrale	Vitesses de conduction nerveuses	EMG	biopsie musculaire	Score SDFS
I-1	Française/f	troubles de la marche/27	43	oui	27	13	non, absence de signe de Babinski	présents	non	dysarthrie, ondes carrées, diplopie binoculaire, optatimoplagie horizontale dans le regard extrême, ptosis unilatéral, léger microrétinopathie	n.f.	normal	n.f.	n.f.	3
I-2	Française/f	troubles de la marche/17	58	oui	17	11	non, absence de signe de Babinski	viés aux MI	non	dysarthrie, scoliose modérée, crise d'épilepsie à l'âge de 2 ans, ondes carrées, nystagmus horizontal	atrophie cérébelleuse	n.f.	n.f.	n.f.	3
II-1	Française/f	troubles de la marche/27	62	oui	27	18	non, absence de signe de Babinski	présents	non	dysarthrie, scoliose	atrophie cérébelleuse	normal	normal	normal	3
III-1	Algérienne/f	troubles de la marche/7	32	oui	7	21	non, absence de signe de Babinski	abolis	non	dysarthrie, pieds creux, signe de Romberg	atrophie cérébelleuse	normal	normal	n.f.	3
IV-1	Française/m	dystonie (crampe de l'écrivan) puis troubles de la marche/24	70	oui	24	24	non, absence de signe de Babinski	très viés aux 4 membres	léger déficit moteur/ proximal des MI	diminution sévère de la pallesthésie, incontinence urinaire modérée, nystagmus horizontal.	atrophie cérébelleuse sévère, hypersignaux de la substance blanche	n.f.	n.f.	n.f.	5

Tableau 3 : Données cliniques des patients avec mutations dans le gène SYNE1 de notre série (MI : membres inférieurs, n.f: non fait)

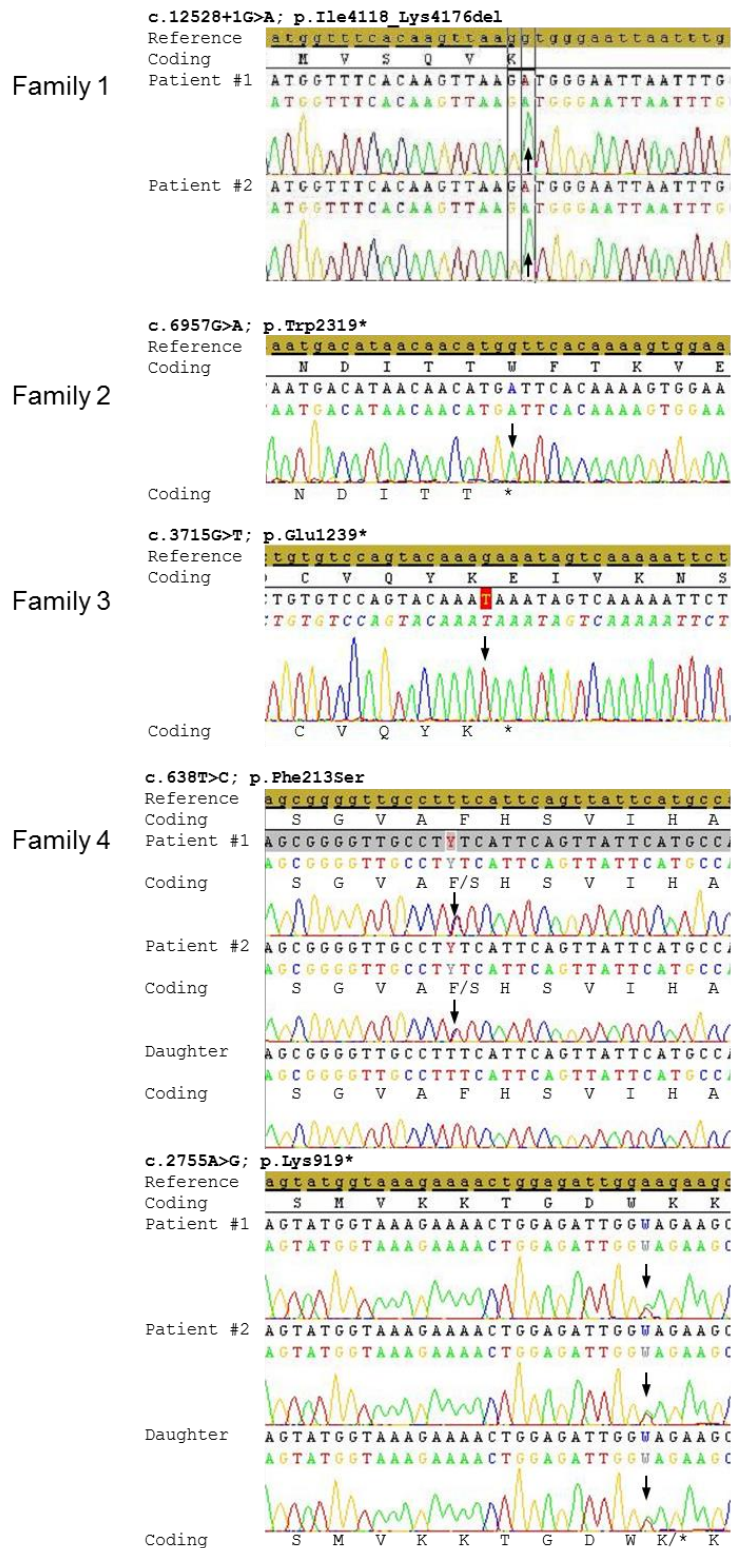


Figure 11 : Electrophérogammes des patients avec mutations dans *SYNE1*

3. Discussion et Perspectives

3.1. Fréquence des mutations hypomorphes dans les ataxies cérébelleuses récessives

Dans plusieurs gènes, il a pu être montré que des mutations sévères étaient responsables de tableaux syndromiques avec atteinte globale du système nerveux central alors que des mutations moins sévères ou « mild » étaient pourvoyeuses d'un tableau clinique avec ataxie (*WWOX*, *FA2H*, *POLG*, *CYP27A1*, *HEXB* et *ATM* pour les patients identifiés dans mon travail de thèse). Dans tous les cas, au moins une des deux mutations est une mutation faux-sens avec vraisemblablement un caractère hypomorphe. Le gène *SYNE1* représente un cas particulier, car les mutations perte de fonction totale responsables d'ataxie tardive (ARCA1) touchent l'isoforme long de la nesprine et épargnent l'isoforme court (musculaire), alors qu'une mutation homozygote touchant à la fois les isoformes long et court est responsable d'une arthrogrypose congénitale (Attali et al 2009). Il y a donc bien une perte de fonction partielle de *SYNE1* dans ARCA1, puisque l'isoforme court musculaire est préservé. Au total, un nombre important de gènes mutés d'ataxie récessive sont touchés par des pertes de fonction partielles hypomorphes rendant compte du phénotype ataxique, et le gène de la frataxine en est l'archétype par excellence, puisque l'expansion GAA entraîne une perte de fonction partielle (quantitative) de frataxine et l'absence de frataxine n'est pas viable. Le fait que la majorité de ces mutations hypomorphes soient des mutations faux-sens complique singulièrement la prédiction de leur pathogénicité et leur validation par des tests biochimiques.

3.2. Elargissement du spectre phénotypique des mutations récessives de *WWOX*

Après la publication du manuscrit 1, plusieurs publications ont retrouvé des mutations dans *WWOX* responsables de phénotypes plus sévères.

-Abdel Salam et al. ont décrit le cas d'un jeune garçon présentant un retard de croissance, une petite taille, une microcéphalie, une épilepsie pharmacorésistante ayant débuté à l'âge de 2 mois et un retard psychomoteur sévère. L'examen ophtalmologique retrouvait une pigmentation rétinienne anormale et une atrophie optique. Le décès est survenu à 16 mois d'un état de mal épileptique. Une sœur aînée avait présenté des symptômes similaires et était décédée à 3 mois.

-Mignot et al. ont décrit un tableau d'encéphalopathies épileptiques associées à *WWOX*. (WOREE syndrome pour « *WWOX* related epileptic encephalopathies »). 5 patients issus de quatre familles présentaient un tableau d'encéphalopathie épileptique infantile, dont 4 avec un retard psycho-moteur sévère. Certains patients présentaient une atrophie optique et une pigmentation rétinienne anormale.

-Valduga et al. ont décrit deux sujets atteints dans une famille d'origine turque avec union consanguine (fœtus masculin avec interruption thérapeutique de grossesse et une sœur décédée à 22 mois) présentant une délétion des six premiers exons de *WWOX*, responsable d'un tableau sévère. Le fœtus a présenté de probables crises d'épilepsie intra utérines. L'autopsie a révélé une organomégalie, une macrocéphalie, une polymicrogyrie, une atrophie du corps calleux et un élargissement des vallées sylviennes. Sa sœur présentait une augmentation de la clarté nucale à l'échographie prénatale. Elle a présenté une cyanose à la naissance puis un tableau d'hypertonie spastique, de crises d'épilepsie généralisées avec spasmes en flexion et

hypersarythmie à l'électroencéphalogramme faisant évoquer un syndrome de West. Le contact visuel n'a pas pu être obtenu et il n'y a pas eu de progrès sur le plan psychomoteur. A 6 mois, elle développa une scoliose et une cardiomyopathie dont elle décèdera à 22 mois. La mère a présenté plusieurs fausses couches ce qui pourrait traduire une variabilité clinique au sein de la famille dans la sévérité d'expression allant de la létalité au stade fœtal et quelques années de survie.

La présence de mutation hétérozygote symptomatique reste incertaine. L'absence de symptomatologie retrouvée chez les parents hétérozygotes ne plaide pas pour la présence d'un phénotype clinique associé à une mutation hétérozygote faux-sens ou non-sens de *WWOX*. Sur le faible nombre de sujets avec ces mutations à l'état hétérozygote, il n'a pas été décrit de phénotype neurologique ni de cancer précoce comme les études initiales sur la fonction de *WWOX* auraient pu le faire suspecter. En effet, ce gène initialement été décrit comme un gène suppresseur de tumeur sur la base de délétions somatiques dans les tumeurs (Bednarek et Aldaz 2000). Cependant, *WWOX* se distingue des autres gènes suppresseurs de tumeur par l'absence de « deuxième hit » somatique *en trans*. Il est possible que la présence des délétions de *WWOX* dans les tumeurs ne soit que coïncidence puisque *WWOX* contient un site fragile aphidicolin sensible (FRAD16) susceptible d'augmenter le taux de délétion à ce locus dans des conditions de stress génotoxique. Ce site fragile expliquerait également la fréquence élevée de délétion de *WWOX* dans le syndrome WOREE (Mignot et al. 2015) et dans les cribles CGH. En effet, White et al. ont décrit le cas d'un patient de sexe masculin présentant une ambiguïté sexuelle à la naissance avec une délétion hétérozygote en phase des exons 6 à 8 de *WWOX*. Sa mère est actuellement porteuse de la même mutation sans pathologie sexuelle associée hormis une ménarche tardive à 16 ans. Cependant, elle n'a pas eu de dysgénésie gonadique. Il est possible que le phénotype de ce patient soit totalement indépendant de la délétion du gène *WWOX*.

Le frère des sujets atteints dans la famille publiée par Valduga et al. avait un hypospade et une anomalie squelettique de la main droite mais une confirmation moléculaire d'hétérozygotie n'a pas pu être réalisée.

3.3. Nouvelles mutations dans *ANO10* et *SYNE1*

3.3.1. Nouveaux cas d'ARCA3

ANO10 (ou *TMEM16K*) est un gène faisant partie de la famille de gènes des anoctamines ou *TMEM16*. *ANO1* et *ANO2* sont des sous unités d'un canal chlore calcium dépendant. Par homologie de séquence, *ANO10* est présumé coder pour un canal chlore bien qu'à l'heure actuelle, Il n'y ait pas eu de recherches ayant pu confirmer cette hypothèse et déterminer son rôle physiologique. Ce gène est exprimé de façon ubiquitaire mais avec une expression particulièrement élevée au niveau cérébral. La présence d'une épilepsie chez certains patients atteints d'ARCA3 pourrait faire spéculer sur son rôle potentiel de canal chlore du fait que de nombreuses épilepsies sont secondaires à des canalopathies.

La mutation la plus fréquemment retrouvée à l'état hétérozygote composite est une « expansion » d'un nucléotide dans une séquence mononucléotidique, c.132dupA, responsable d'un décalage du cadre de lecture et de l'apparition d'un codon stop prématuré dans l'exon 2 du gène *ANO10*. Devant la découverte de cette mutation et sa fréquence à l'état hétérozygote dans la base de données Exome Variant Server, nous avons posé l'hypothèse d'une forme non viable à l'état homozygote (manuscrit 4). Cette hypothèse a été remise en question suite à la publication d'une famille homozygote pour la duplication c.132dupA dont les patients n'étaient pas plus sévèrement atteints que les autres patients décrits (Minnerop et Bauer, 2015). Une deuxième famille est rapportée dans Fogel et al. en 2014. En considérant la fréquence présumée de cette mutation, on pourrait supposer que ARCA3 associée aux mutations d'*ANO10* soit une cause fréquente d'ataxie cérébelleuse récessive dans la population générale alors que la découverte du gène est relativement tardive (2010) et que le nombre de cas décrits reste limité. Ce paradoxe n'est pas encore élucidé. De nouvelles estimations de la fréquence de la mutation à l'état hétérozygote seraient utiles sur la

population française. Si la proportion de 1/184 était exacte, la fréquence à l'état homozygote serait de 1/135424. Le nombre théorique de patients homozygotes, uniquement pour cette mutation, en France serait de 489 (pour une population française à 66,3 millions d'habitants en 2015 selon l'INSEE). La caractérisation d'autres familles avec cette mutation à l'état homozygote sera intéressante pour vérifier si le phénotype est homogène ou si des formes sévères avec encéphalopathies rapidement létales peuvent être constatées.

Le phénotype des patients atteints d'ARCA3 est relativement homogène, les rendant difficile à distinguer du phénotype d'ARCA1. L'absence de biomarqueurs chez la plupart des patients est une difficulté supplémentaire. Une élévation modérée de l'alpha foeto-protéine a été constatée chez deux patients. Cette caractéristique et la recherche d'autres biomarqueurs nécessitent d'être évaluées pour savoir si elles permettraient d'aider à la différenciation entre ARCA1 et ARCA3.

3.3.2. Nouveaux cas d'ARCA1

Les cas décrits sont principalement des mutations non-sens avec une perte fonctionnelle complète de l'isoforme long. La pathogénicité des mutations faux sens sont difficiles à évaluer en raison de l'absence de test fonctionnel existant et du nombre important de variants polymorphiques rares non décrits dans les bases de données. De nombreux variants de signification indéterminée sont retrouvés sans qu'il soit possible de confirmer ou non un lien de causalité avec la maladie du patient. Seule la mutation faux sens p.F220S a été retenue comme pathogène en raison de la conservation de l'acide aminé, sa localisation dans la protéine et l'association avec une mutation non-sens en *trans*.

Notre série permet d'élargir le spectre phénotypique d'ARCA1 par la description de symptômes extra cérébelleux chez un nombre important des patients.

Il n'y a pas de corrélation phénotype-génotype claire entre les mutations responsables de tableaux cliniques sévères et celles responsables de tableaux moins sévères avec une ataxie cérébelleuse prédominante lentement progressive.

Les formes sévères sont associées aux mutations suivantes :

-mutation homozygote c.C682T, p.R228T* dans une famille belge avec deux atteints

-mutations hétérozygote composite c.G20183+1G>C (mutation d'épissage) et c.C23782T, p.R7928* chez un patient italien

-mutation homozygote c.22456_22457insG, p.R7486fs7488* chez une patiente japonaise qui est également porteuse d'une autre mutation faux sens homozygote c.G553C, p.G185R (Izumi et al., 2013).

Il est difficile de savoir si les mutations affectant le début de la protéine comme dans la famille belge ou la mutation G185R chez la patiente japonaise sont véritablement à risque de forme sévère devant le faible nombre de cas décrits.

3.4. Ataxies spastiques autosomiques récessives

La description de nouveaux cas de patients *ANO10* et *SYNE1* avec un syndrome cérébelleux associé à un syndrome pyramidal comprenant une spasticité permet d'élargir la liste de gènes à évoquer devant ce tableau clinique. La spasticité reste un phénotype clinique inconstant d'ARCA1 et d'ARCA3 alors qu'il serait très fréquent chez les patients ARSACS. Quelques patients ARSACS n'ont pas de spasticité clinique mais une atteinte pyramidale est retrouvée sur le plan électrophysiologique avec une perturbation des potentiels évoqués moteurs (Synofzik et al., 2013). La présence d'une polyneuropathie sensitivo-motrice surajoutée permettra d'orienter vers les gènes *SACS* et *CYP27A1*.

La publication princeps de *SYNE1* de l'équipe de Montréal retrouvait chez 26% des patients (14/53) des réflexes vifs aux membres inférieurs (Gros Louis et al., 2007) de même que la publication de cette équipe en association avec l'équipe de La Pitié Salpêtrière (Noreau et al., 2013). La présence d'un syndrome pyramidal et d'une marche ataxo-spasmodique avait uniquement été décrite en association avec une atteinte du deuxième motoneurone chez une seule patiente (Izumi et al., 2013). Bien que le phénotype soit relativement homogène, la présence d'un syndrome pyramidal peut faire partie des variations phénotypiques liées aux mutations récessives du gène *SYNE1*.

La plupart des ataxies spastiques d'origine récessive ont pour la plupart une évolution lente, ce qui ne rend pas aisé leur distinction. Les principaux gènes responsables de ce tableau clinique sont énumérés ci-dessous :

- *FXN*/ Maladie de Friedreich de début tardif (LOFA ou late onset Friedreich ataxia)
- SACS*
- SPG7*

-gènes avec ataxie spastique récessive inconstante : *FA2H/SPG35*, *KIF1C/SPG58*, *SYNE1/ARCA1*, *ANO10/ARCA3*, *AVED*.

-maladies métaboliques (très nombreuses) : *CYP27A1*/xanthomatose cérébro-tendineuse, *GBA2* de découverte récente (Hammer et al., 2013 ; Voltsi et al., 2014), maladies peroxysomales comme *PEX16* (Ebberink et al., 2010)....

-Gènes d'ataxie spastique récessive de description très rare : *MARS2* (SPAX3), *MTPAP* (SPAX4), *AFG3L2* (SPAX5).

Une ataxie spastique sporadique doit faire rechercher des maladies de transmission dominante ou liée à l'X qui sont des diagnostics différentiels possibles comme la maladie de Machado-Joseph ou SCA3 (*MJD1*), la forme adulte de la maladie d'Alexander (*GFAP*) ou l'adrénomyélongueuropathie (*ABCD1*).

3.5. Rentabilité diagnostique de la stratégie par capture ciblée dans notre série

Le taux de diagnostic de 20,6% peut sembler relativement faible dans notre étude. Il est similaire aux résultats trouvés par une étude utilisant une stratégie de capture ciblée (Nemeth et al., 2013) qui obtient un pourcentage de 18%.

Dans cette série britannique, le pourcentage de diagnostics positifs allait jusqu'à 40% dans les formes de début avant 18 ans alors que son efficacité était bien moindre pour les formes débutant à l'âge adulte (8,3%). Le panel de gènes utilisé était différent. Il comportait 118 gènes (cf. annexe 2) dont des gènes d'ARNt synthétases, des gènes non décrits comme pathogènes chez l'homme mais dont l'implication est suspectée (phénotype d'ataxie chez la souris...) et des gènes des syndrome de Joubert. Ce panel n'a pas pris en compte les gènes de maladies métaboliques récessives pourvoyeuses d'ataxie comme la maladie de Niemann-Pick de type C la maladie de Tay Sachs ou la xanthomatose cérébrotendineuse. Des dosages biochimiques sanguins et urinaires et une analyse du liquide céphalo-rachidien avaient été réalisés au préalable pour exclure une partie de ces maladies métaboliques. Des gènes de paraplégie spastique comme *SPG7* ou *FA2H* n'avaient pas été sélectionnés.

La stratégie de séquençage de l'exome semble donner de meilleurs résultats par rapport à la capture ciblée :

-La série de l'équipe de Newcastle (Pyle al., 2014) retrouve un diagnostic chez 14 familles sur 22 soit 64%. La pathogénicité est certaine dans neuf familles et probable pour cinq autres familles.

-La série de l'équipe de Los Angeles (Fogel et al., 2014) comprend 76 patients consécutifs dont 73% de début à l'âge adulte et 74% de forme sporadique. Il est retrouvé un diagnostic de certitude chez 16 patients sur 76 soit 21%. Un diagnostic avec une pathogénicité possible est

porté chez 30 patients supplémentaires soit un taux de diagnostic possible ou probable de 60%. Cependant ces mutations possibles ou probables doivent être considérées avec prudence. L'exome pourrait être particulièrement utile pour détecter des phénotypes atypiques dans des gènes non connus pour être responsable d'ataxies cérébelleuses.

Certaines limites sont à noter concernant la comparabilité des résultats entre les différentes études. La population étudiée dans l'étude de Pyle est composée de 35 patients issus de 22 familles ne contenant que 8 patients sans antécédents familiaux. La probabilité est beaucoup plus grande de trouver une forme génétique en limitant le nombre de patient de présentation sporadique.

La série de Fogel est plus proche de notre série en termes d'âge de début et de la proportion de formes sporadiques. Le diagnostic de certitude est équivalent (21% contre 20,6% pour notre étude) malgré le plus grand nombre de gènes séquencés comparativement à la capture ciblée.

La sélection de familles avec plusieurs atteints semble améliorer la rentabilité du séquençage dans l'étude de Pyle alors que celle-ci est comparable entre formes sporadiques et formes familiales dans l'étude de Fogel. Cela permet de s'affranchir de quelques patients qui pourraient présenter des ataxies de causes acquises non diagnostiquées mais est beaucoup moins représentatif de la population de patients consultant pour une ataxie cérébelleuse dans les pays européens ou d'Amérique du nord où les cas sporadiques sont majoritaires.

L'avenir proche en diagnostic au laboratoire garde une préférence pour des techniques de capture ciblée ou de mini exome pour des questions de coût. Il est probable que la diminution du coût de l'exome dans les prochaines années rend cette technique accessible dans les pays développés. Le coût initial de l'analyse sera contrebalancé par la diminution des explorations

notamment des examens biochimiques qui étaient souvent pratiquées. On peut espérer dans un avenir proche améliorer le délai diagnostique dans les ataxies cérébelleuses.

3.6. Susceptibilité du cervelet dans les pathologies génétiques

Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer la fréquence de l'atteinte clinique du cervelet secondaires à des mutations dans des gènes de fonctions très diverses.

3.6.1. Perturbation de l'homéostasie des protéines

La perturbation de l'homéostasie des protéines (appelée par certains auteurs « protéostasie ») pourrait être en cause dans cette susceptibilité particulière. Les principales voies de dégradation des protéines dans les cellules eucaryotes sont le système ubiquitine-protéasome et l'autophagie. Cette « protéostasie » est en grande partie possible par l'action du réticulum endoplasmique qui constitue un réseau au sein duquel des processus de contrôle de qualité permettent de maintenir le protéome fonctionnel par un équilibre entre la synthèse et la dégradation (revues par Balch et al., 2008 et Hetz et al, 2015). Les protéines de conformation anormale vont être retirées du cytosol par le réticulum endoplasmique (ERAD ou endoplasmic reticulum associated degradation) et dégradées par le système ubiquitine-protéasome. Lors d'un stress important se portant sur le réticulum endoplasmique avec une augmentation du nombre de protéines à dégrader, une réponse adaptative débute (voie de signalisation UPR pour Unfolded Protein Response) diminuant la synthèse de nouvelles protéines et améliorant la capacité de repliement et de dégradation des protéines au sein du réticulum endoplasmique. Une deuxième voie de signalisation (heat shock response ou HSR) contrôle la conformation des protéines dans le cytoplasme et le noyau. De nombreuses pathologies neurodégénératives sont associées à des dépôts de protéines anormales formant des agrégats (comme les plaques amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer) secondaires à un défaut de dégradation. Le dépassement des capacités du réticulum endoplasmique conduit à un stress irréversible et à l'apoptose de la cellule.

Il a été montré qu'un stress prolongé pouvait devenir délétère dans certains modèles de maladies neurodégénératives. L'activation d'HSR peut par exemple, majorer l'agrégation de huntingtine dans des modèles cellulaires de maladie de Huntington. La correction de cette réponse inadaptée au stress cellulaire, devenant chronique (Maladaptive Stress Response), en diminuant l'activité des « heat shock proteins » (HSP) pourrait être une voie thérapeutique intéressante dans certaines maladies perturbant l'homéostasie protéique comme cela a pu être démontré dans des modèles cellulaires pour la maladie de Niemann-Pick de type C (Roth et al., 2014).

Les perturbations de l'homéostasie des protéines existent dans plusieurs modèles d'ataxie cérébelleuse et il a été montré que les cellules de Purkinje sont atteintes avant les autres cellules neurales chez la souris et chez l'homme (Zhao et al., 2005 ; Lee et al., 2006 ; Hara et al., 2006, Komatsu et al., 2006, La Spada et Taylor, 2010, Howes et al., 2012). La mutation dans des protéines connues pour être impliquées dans l'autophagie sont responsables de neuro-dégénérescence et d'ataxie chez des souris KO conditionnel pour le système nerveux pour les gènes *ATG5* *-/-* et *ATG7* *-/-* (Hara et al., 2006, Komatsu et al., 2006). Une mutation dans le gène *KIA0226* codant pour la protéine Rubicon régulateur négatif de l'autophagie a été décrite au sein de notre laboratoire.

Cependant, la présence de troubles de l'homéostasie des protéines est une constatation qui n'est pas spécifique des pathologies cérébelleuses. Il pourrait s'agir d'un facteur sur lequel il serait possible de jouer sur le plan thérapeutique sans pour autant qu'il soit un mécanisme causal de toutes les formes génétiques d'ataxie cérébelleuse.

3.6.2. Spécificités morphologiques des cellules de Purkinje

Une susceptibilité particulière des cellules de Purkinje est avancée par certains auteurs notamment à cause de leur très grande taille, de leur importante arborisation dendritique et de leur activité métabolique importante (Hekman et Gomez, 2015). La taille de l'arborisation dendritique ne semble pas tout expliquer car la réduction de celle-ci ne protège pas la cellule de l'excitotoxicité glutamatergique (Gugger et al., 2010). D'autres grandes cellules comme les neurones sensitifs des membres inférieurs qui sont particulièrement longs n'ont pas été étudiées spécifiquement en ce sens, ne permettant pas de savoir si ces particularités morphologiques en font un groupe de cellules particulièrement exposées.

3.6.3. Sensibilité à des stress externes et à l'excitotoxicité

Certaines cellules de Purkinje, minoritaires, qui n'expriment pas l'enzyme glycolytique aldolase C, sont particulièrement sensibles à l'hypoxie (Welsh et al., 2002), au traumatisme crânien et à l'excitotoxicité glutamatergique (Slemmer et al., 2007)

3.7. Qu'est-ce qu'un « gène d'ataxie cérébelleuse » ?

Un gène d'ataxie cérébelleuse est un gène qui peut être responsable de symptômes cliniques en rapport avec une ataxie cérébelleuse lorsqu'il est muté, alors que ce même gène peut être responsable d'autres tableaux cliniques dans le contexte d'autres mutations.

Le raisonnement diagnostique part de la clinique. Dans le cadre de ce raisonnement à l'échelle du patient, la distinction entre gènes responsables d'ataxies cérébelleuses métaboliques et d'ataxies cérébelleuses récessives classiques, d'ataxies cérébelleuses progressives ou non progressives n'est pas très pertinent.

L'important est de trouver le gène en cause chez le patient, qu'il soit décrit principalement comme un gène d'ataxie cérébelleuse pure, de paraplégie spastique complexe, d'épilepsie myoclonique progressive ou de cytopathie mitochondriale.

Tout gène précédemment décrit dans la littérature scientifique comme pouvant être responsable d'ataxie cérébelleuse a sa place dans un séquençage par capture ciblée afin de ne pas méconnaître une présentation atypique d'ataxie.

La stratégie par capture ciblée est limitée car elle correspond aux données scientifiques à un moment donné. En raison de la découverte chaque année de nouveaux gènes d'ataxie, la sélection faite initialement devient rapidement obsolète. Aussi, il semble plus opportun d'utiliser une stratégie WES (exome complet) ou une stratégie « exome clinique » (aussi appelé exome « OMIM ») pour le diagnostic moléculaire des ataxies héréditaires. Malgré tout, le taux de diagnostic positif risque de rester relativement faible parce qu'une fraction importante des ataxies sporadiques (surtout de l'adulte) n'est probablement pas héréditaire et que les formes héréditaires et non héréditaires sont au moins en partie cliniquement indistinguables.

Un exemple intéressant est celui de SCAR7 décrit plus haut, correspondant à une famille de patients avec une ataxie cérébelleuse d'évolution lente avec une liaison en 11p15 (Breedveld et al., 2004). La mutation a été découverte par la suite dans le gène *TPP1* connue pour donner un tableau sévère de céréoïde lipofuscinose avec ataxie cérébelleuse, épilepsie et détérioration cognitive avec une évolution rapide vers le décès. Dans une prise en charge diagnostique exhaustive par capture ciblée ou exome, il est intéressant de rechercher ce type de présentation.

A l'échelle de cohorte de patients, il devient intéressant de savoir si le cervelet est le site principal et fréquent de l'atteinte ou s'il est un site occasionnel et très inconstant de la neurodégénérescence. Cela permet d'une part d'établir des classifications et d'autre part de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie génétique d'intérêt. Les locus d'ataxie sans gène identifié n'ont pas été pris en compte.

On peut distinguer :

Des gènes d'ataxie cérébelleuse exclusive ou prédominante :

Transmission récessive :

ADCK3, ANO10, APTX, ATM, FXN, KIAA0226, MRE11A, MTPAP, MTTP, SACS, SETX, SIL1, SLC9A1, SYNE1, SYT14, TTPA ...

Transmission dominante

-Avec expansion de polyglutamine : SCA1, 2, 3, 6, 7, 17, DRPLA

-Avec expansion non-polyglutamine : SCA8, SCA10 (populations mexicaines/brésiliennes), SCA12 (populations indiennes), SCA31 (populations japonaises)

-Sans expansion : SCA5, 11, 13, 14, 15/16/29, 23, 28, 35, 36

Transmission liée à l’X: ABCB7, prémutation de FMR1 (FXTAS)

Et des gènes avec ataxies cérébelleuses inconstantes

-gènes associés à une épilepsie et/ou des myoclonies : CSTB, PRICKLE1, WWOX, gènes de céréoïde lipofuscinoses (CLN4B, CLN5, CLN6, CLN7)

-gènes entraînant des anomalies de l’ADN mitochondrial (également souvent associés à une épilepsie et/ou des myoclonies) : POLG, Twinkle, mutations de l’ADN mitochondrial

-gènes de paraplégie spastique : SPG7, SPG11, SPG15, FA2H (SPG35), PNPLA6 (SPG39)

-gènes de maladies métaboliques : CYP27A1 (xanthomatose cérébro-tendineuse), PHYH (maladie de Refsum), PEX2, PEX6, PEX7, PEX10, NPC1, NPC2, HEXA, HEXB, GLB1, GALC, ARSA, ABHD12 (syndrome PHARC), PLA2G6 (maladie de Karak), HSD17B4 (syndrome de Perrault), L2HGDH (acidurie L2-hydroxyglutarique), OPA3 (acidurie 3-méthylglutaconique) ...

Autres : WFS1 (syndrome de Wolfram de type 1) ...

3.8. Traitement des ataxies cérébelleuses d'origine génétique

Malgré l'accroissement permanent des connaissances dans la génétique des ataxies cérébelleuses récessives et dominantes ainsi que la compréhension plus fine des mécanismes moléculaires, la prise en charge thérapeutique est encore très réduite et se cantonne à une prise en charge symptomatique. La grande majorité des ataxies cérébelleuses ne peuvent pas bénéficier de traitement curatif ni même ralentissant l'évolution de la maladie. Il est intéressant de noter que de nombreuses pathologies dégénératives du cervelet comme l'atrophie multi systématisée de type cérébelleuse ne sont pas non plus accessibles à un traitement. Les pathologies inflammatoires (sclérose en plaques), infectieuses, vasculaires ou tumorales affectant le cervelet peuvent par contre être traitées, avec des possibilités de récupération fonctionnelle. Il est difficile de savoir si la récupération clinique qu'on peut observer dans ces maladies est exclusivement due à la régression de l'inflammation, à des capacités d'adaptation des tissus préservés ou une régénération de certaines cellules nerveuses. Une neurogénèse a pu être mise en évidence au niveau du cervelet dans le modèle de souris ataxique Harlequin (inactivation du gène *A1F*), pouvant être stimulée par la greffe de cellules souches mésenchymateuses (Kumar et al., 2014).

Concernant les ataxies cérébelleuses qui ne sont pas d'origine métabolique, un traitement efficace sera-t-il capable de revenir en arrière ou seulement de stabiliser l'affection et éviter une perte supplémentaire de cellules nerveuses ?

3.8.1. Prise en charge symptomatique

La prise en charge symptomatique vise à améliorer la qualité de vie des patients en limitant l'impact des symptômes sur la vie quotidienne. C'est la seule méthode qui est envisageable pour les ataxies sans diagnostic moléculaire.

Elle pourrait avoir un impact notable sur la qualité de vie et paraît de première importance à court terme, en l'absence d'essai thérapeutique dans une majorité d'ataxies. En effet, la plupart des formes d'ataxies ne sont pas en phase de tests cliniques applicable chez l'humain, hormis l'ataxie de Friedreich. L'amélioration de la formation du personnel paramédical est souhaitable pour que soit pris en charge de façon optimale les ataxies cérébelleuses.

3.8.1.1. Kinésithérapie

En 2015, il n'y a pas de preuves scientifiques sur l'efficacité de ce type de méthodes sur l'évolution à long terme (plusieurs années) de l'ataxie par manque de données. Peu d'études solides méthodologiquement ont étudié le bénéfice obtenu par la kinésithérapie dans les ataxies cérébelleuses (pour revue : Synofzik et Ilg, 2014). En raison de la rareté de ces maladies, des ataxies de causes génétiques différentes ont été incluses dans ces études, comprenant pour la plupart aussi bien des causes récessives que dominantes. Une amélioration transitoire de plusieurs mois jusqu'à un an a pu être constatée sur le score d'ataxie SARA et sur la marche mais cette amélioration a tendance à régresser à distance de la rééducation. L'origine de cette amélioration transitoire pourrait être secondaire à cet « entraînement » avec une meilleure adaptation aux troubles ainsi qu'à un effet motivationnel plus qu'à une véritable action neuroprotectrice.

La rééducation est basée sur la réalisation de tâches spécifiques aux troubles rencontrés par les patients ataxiques, qui consistent principalement à travailler la marche et l'équilibre. Plusieurs méthodes ont été évaluées :

3.8.1.1.1. Kinésithérapie associée à une thérapie occupationnelle (Miyai et al., 2012)

Il a été étudié 42 patients avec une ataxie cérébelleuse pure sur un programme se basant sur le travail de la coordination, l'équilibre et les activités de la vie quotidienne. La comparaison entre un groupe « rééducation immédiate » et un groupe « rééducation différée de 4 semaines » retrouve une amélioration prolongée en faveur du groupe « rééducation immédiate » qui se maintenait jusqu'à 24 semaines pour plus de la moitié des patients.

3.8.1.1.2 Kinésithérapie de coordination

Dans les travaux de l'équipe de Tübingen (Ilg et al., 2009, Ilg et al., 2010), seize patients ont été étudiés dont 10 ataxies cérébelleuses et 6 ataxies proprioceptives pour un programme d'entraînement sur quatre semaines. Une efficacité à un an a été retrouvée bien que l'amélioration avait tendance à diminuer avec le temps.

Plusieurs exercices sont détaillés :

- Equilibre statique (appui monopodal...)
- Equilibre dynamique
- Travail de coordination tronc-membre
- Stratégies de prévention des chutes et de réception au sol pour limiter les traumatismes
- Prévention et traitement des contractures : mouvements d'extension et de rotation du rachis, mouvements des épaules

Une équipe brésilienne a effectué une version allégée de cette rééducation dans une étude non contrôlée, sur une population de patients génétiquement plus homogènes, tous atteints

d'ataxies spinocérébelleuses dominantes (11 patients dont huit SCA3, deux SCA2 et un SCA7) avec une amélioration d'un score de stabilité, la « Berg Balance Scale » (Santos de Oliveira et al., 2015), dont on pourrait extrapoler une diminution du risque de chutes. Quelques réserves peuvent être faites en raison de l'absence de chutes chez les 11 patients étudiés alors que la prévalence dans cette population d'au moins une chute sur un an est de 73,6% et 84,1% dans deux études (Fonteyn et al., 2010 et 2013).

3.8.1.1.3. Exercices basées sur l'utilisation de jeux vidéo (Ilg et al., 2012)

L'utilisation de jeux vidéo nécessitant la réalisation de tâches motrices a eu des effets bénéfiques dans un groupe d'enfants atteints d'ataxies cérébelleuses de début précoce.

3.8.1.2. Orthophonie

Le travail de rééducation des troubles de la parole est important car les patients peuvent devenir difficilement compréhensibles pour leur entourage en raison de la dysarthrie cérébelleuse bien que peu d'études valables sur le plan méthodologique aie montré une efficacité (revue Cochrane Vogel et al., 2014)

3.8.1.3. Soutien psychologique

En raison de la fréquence des comorbidités psychiatriques (dépression réactionnelle, difficulté d'acceptation de la maladie), une prise en charge psychologique ou psychiatrique peut être utile.

3.8.1.4. Mesures socio-professionnelles et techniques

L'adaptation du poste de travail est bénéfique pour maintenir ces patients dans la vie professionnelle.

La mise en place d'aides techniques à domicile avec l'aide d'un ergothérapeute (poignées...) permet d'améliorer la mobilité et les transferts.

Une aide à la marche (cane, béquille) ou un fauteuil roulant est proposé en fonction de la sévérité des troubles de la marche afin d'améliorer le périmètre de marche et l'autonomie.

D'autres aides techniques comme un verticalisateur, un lève-personne ou des commandes à distance peuvent être bénéfiques pour les stades de dépendance avancés.

3.8.1.5. Prise en charge des complications orthopédiques et de la spasticité

Une prise en charge rééducative et parfois chirurgicale peut être nécessaire

La spasticité peut être traitée par voie médicamenteuse (baclofène, myorelaxants) et par injection intra musculaire de toxine botulique.

3.8.2. Causes d'ataxies cérébelleuses traitables

Certaines maladies responsables d'ataxies cérébelleuses peuvent être améliorées par des traitements spécifiques par des moyens médicamenteux ou des régimes. Ces maladies sont à connaître par le généticien, le pédiatre ou le neurologue car le retard au traitement est souvent responsable de séquelles irréversibles. Ces maladies sont avant tout des maladies métaboliques comme la maladie de Refsum, la maladie de Niemann-Pick de type C et l'abétalipoprotéinémie. L'ataxie par déficit en vitamine E et l'ataxie par déficit en coenzyme Q10 seront également évoquées.

3.8.2.1. La maladie de Refsum

Cette maladie métabolique peroxysomale autosomique récessive est caractérisée par l'association d'une ataxie cérébelleuse d'une rétinite pigmentaire, d'une polyneuropathie, d'une hyperprotéinorachie et d'une augmentation du taux d'acide phytanique dans le sang et les tissus. D'autres symptômes peuvent survenir comme une ichtyose, une cardiomyopathie hypertrophique et des troubles de la conduction cardiaque, une surdité, une anosmie et des dysplasies épiphysaires. Le gène muté *PHYH* code pour la phytanoyl CoA hydroxylase qui en conditions normales, hydroxyle l'acide phytanique en acide pristanique. Dans les formes sans mutation du gène *PHYH*, des mutations dans une autre enzyme peroxysomale *PEX7* ont été mises en évidence. L'acide phytanique est exclusivement apporté par l'alimentation chez l'homme par les produits laitiers, la graisse, la viande des ruminants et les poissons. Les végétaux et d'autres aliments comme le porc ou la volaille ne contiennent que peu d'acide phytanique.

Le traitement consiste en un régime prolongé sans acide phytanique permettant de réduire le taux plasmatique dans la majorité des cas au bout de 44 mois en moyenne (Baldwin et al., 2010). L'ataxie, la neuropathie, l'ichtyose et l'arythmie cardiaque sont les symptômes

qui répondent le mieux à ce régime, tandis que les autres manifestations sont habituellement irréversibles. La précocité du régime avant le début des troubles peut prévenir leur survenue. Des séances de plasmaphérèse étaient initialement proposées dans les années 80 et 90 dans les formes sévères pour diminuer plus rapidement le taux d'acide phytanique (Hungerbuhler et al., 1985) bien que l'efficacité de cette méthode ne soit pas systématiquement retrouvée (Leppert et al., 1991). Par la suite, des techniques de filtration des lipides (LDL aphaérèse) ont permis de simplifier la prise en charge (Straube et al., 2003, Zolotov et al., 2012).

3.8.2.2. La maladie de Niemann-Pick de type C

Cette pathologie métabolique autosomique récessive touche le plus souvent l'enfant ou l'adulte jeune. Les symptômes sont souvent multiples, comprenant une ataxie cérébelleuse, une dystonie, une détérioration cognitive, des crises d'épilepsie et sur le plan oculomoteur une paralysie supranucléaire du regard qui est un argument diagnostique majeur. Une catalepsie peut être retrouvée. Une hépatosplénomégalie peut avoir été présente dans l'enfance, et est d'évolution spontanément favorable. Le diagnostic est confirmé d'une part par le test à la Filipine sur une culture de fibroblastes obtenus par biopsie cutanée du patient puis par la biologie moléculaire. Les mutations sont retrouvées dans 95% des cas dans le gène *NPCI* et dans 5% des cas dans *NPC2*.

Un traitement par miglustat a montré son efficacité pour stabiliser et parfois améliorer les symptômes de la maladie, dont les troubles de la marche et l'ataxie cérébelleuse :

-Absence de dégradation de la marche à 24 mois (Wraith et al., 2010)

-Amélioration ou stabilisation chez 69 % des 86 patients sur une période moyenne de traitement de deux ans (Patterson et al., 2015)

-Amélioration de la dysphagie, des troubles de la marche et de la dysmétrie à deux ans avec une tendance à la dégradation pour certains patients à 48 mois (Fecarotta et al., 2015)

Ce traitement pourrait diminuer la perte de la substance grise du cervelet (Bowman et al., 2015). Il n'y a pas d'efficacité sur les troubles cognitifs.

3.8.2.3. L'abêtalipoprotéinémie

L'abêtalipoprotéinémie est une maladie métabolique autosomique récessive secondaire à la mutation du gène *MTTP* codant pour la "microsomal triglyceride transfer protein" aboutissant à une perturbation de l'absorption et du transport des lipides dans l'organisme. L'absence de cette protéine fonctionnelle perturbe de façon majeure le repliement de l'apolipoprotéine B et sa sécrétion la rendant quasiment inexistante dans le sang. L'apolipoprotéine B est un des composants des chylomicrons, des VLDL et des LDL. L'ataxie est due au déficit en vitamine E, secondaire au déficit en chylomicrons et VLDL.

Cette maladie débute dans les premières années de vie par une stéatorrhée en lien avec une malabsorption des graisses et un retard staturo-pondéral souvent accompagné de vomissements, diarrhées et de distension abdominale. Les autres signes extra-neurologiques sont des troubles hépatiques (stéatose, cirrhose) et squelettiques (cyphoscoliose). Des anomalies érythrocytaires peuvent être mises en évidence avec un aspect d'acanthocytes (globules rouges spiculés). Les signes neurologiques (ataxie cérébelleuse et proprioceptive, abolition des réflexes) et ophtalmologiques (rétinite pigmentaire, ulcères cornéens) apparaissent habituellement dans la deuxième décennie. Le lipidogramme est perturbé avec une hypocholestérolémie et le dosage des vitamines liposolubles A, D, E et K sont abaissées.

Le traitement de cette maladie est basé sur un régime alimentaire particulier en limitant les graisses alimentaires associé à une supplémentation en vitamine liposolubles à fortes doses (notamment en vitamine E) et en acides gras essentiels afin de ralentir la progression des symptômes neurologiques et rétinien(Azizi et al., 1978; Hegele and Angel 1985; Muller et al., 1985; Zamel et al., 2008).

3.8.2.4. La xanthomatose cérébrotendineuse

Cette maladie autosomique récessive d'origine métabolique est secondaire à des mutations du gène *CYP27A1* codant pour une enzyme mitochondriale participant à la synthèse des acides biliaires. L'accumulation secondaire à ce déficit enzymatique entraîne des dépôts de cholestérol et de cholestanol dans les tissus, responsable de la symptomatologie.

Les symptômes débutent le plus souvent dans l'enfance par des diarrhées chroniques. Les autres signes extra neurologiques sont une cataracte juvénile, des xanthomes tendineux, une ostéoporose précoce, une athérosclérose accélérée, un ictère cholestatique néonatal et plus rarement des atteintes pulmonaires. L'atteinte du système nerveux central peut être responsable d'une ataxie cérébelleuse, d'un syndrome pyramidal, d'une épilepsie, d'une dystonie, d'un syndrome parkinsonien, d'un retard mental, d'une détérioration intellectuelle et de troubles psychiatriques. L'atteinte du système nerveux périphérique est retrouvée chez 74,6% des patients avec une polyneuropathie axonale sensitivo-motrice le plus souvent légère à modérée bien que d'autres formes sont décrites (Ginanneschi et al., 2013) ; les atteintes musculaires sont plus rares. Le diagnostic est évoqué devant une élévation du taux plasmatique de cholestanol puis confirmé par la biologie moléculaire.

Le traitement consiste en apport en acide chénodesoxycholique, qui bloque la voie principale de synthèse des acides biliaires et permet de dévier le cholestanol vers une voie de biosynthèse secondaire. Le traitement présente une efficacité à la fois sur les manifestations neurologiques et extra-neurologiques (Ginanneschi et al., 2013). Cette supplémentation ne permet pas d'arrêter complètement la maladie ; l'aggravation clinique sous traitement est possible. La précocité du traitement serait utile pour limiter les complications neurologiques (Pierre et al., 2008). L'ajout d'une statine diminue le taux de cholestanol et de LDL-cholestérol (Kuriyama et al., 1994, Verrips et al., 1999) et un cas clinique rapporte une amélioration clinique chez deux frères (Luyckx et al., 2014). Les LDL aphérèses ont été

proposées par certains auteurs à partir de quelques cas (Mimura et al., 1993, Ito et al., 2003, Dotti et al., 2004).

3.8.2.5. L'ataxie avec déficit en vitamine E

L'ataxie avec déficit en vitamine E a été décrite la première fois en 1981 (Burck et al., 1981) et est due à des mutations dans le gène *TTPA* codant pour l' α -tocophérol Transfer Protein (α -TTP).

Le tableau clinique est proche de l'ataxie de Friedreich. L'âge de début est variable, le plus souvent avant 20 ans (extrêmes : 2-52 ans). L'atrophie cérébelleuse est souvent plus nette que dans l'ataxie de Friedreich et les patients peuvent présenter un tremblement du chef, une dystonie et/ou une rétinite pigmentaire. La cardiomyopathie est rarissime et le diabète n'a pas été décrit. Cette maladie est particulièrement présente au Maghreb, où elle est la deuxième ataxie récessive la plus fréquente après l'ataxie de Friedreich en raison d'un effet fondateur avec la mutation c.744delA (Ben Hamida et al., 1993; Ouahchi et al. 1995, Tazir et al., 2009). Le taux de vitamine E sérique est un marqueur diagnostique majeur avec un effondrement souvent inférieur à 1mg/l. Le lipidogramme et le dosage des autres vitamines liposolubles A, D et K est normal ce qui permet d'exclure une abêtalipoprotéïnémie.

L'administration à fortes doses de vitamine E n'a jamais été évaluée en aveugle notamment pour des raisons éthiques. Ce traitement permet de ralentir voire de stopper la progression et même parfois conduit à une réduction des signes neurologiques notamment la neuropathie (Martinello et al., 1998 ; Gabsi et al, 2001, Doria-Lamba et al., 2006).

Chez l'adulte, l'administration de 1600 mg par jour d' α -tocophérol en association à une alimentation contenant des graisses permet de normaliser le taux d' α -tocophérol (Cavalier et al., 1998). Cette maladie est particulièrement importante à connaître en raison de la

réversibilité partielle de symptômes neurologiques chez certains patients notamment si le traitement est débuté précocement.

3.8.2.6. L'ataxie avec déficit en coenzyme Q10 ou ataxie cérébelleuse autosomique récessive de type 2

L'ataxie avec déficit en coenzyme Q10 est une entité plus récente décrite par notre équipe et une autre équipe de façon simultanée (Lagier-Tourenne et al., 2008, Mollet et al., 2008) et qui touche une protéine mitochondriale.

L'ataxie cérébelleuse débute le plus souvent dans l'enfance, est d'évolution lente avec des signes associés variables des épisodes « stroke like » ou pseudo-AVC, un retard mental, une épilepsie et des signes musculaires avec une intolérance à l'effort (Mignot et al., 2013). Des tableaux sévères avec encéphalopathie ont été décrits (Mollet et al., 2008).

Le diagnostic peut être orienté par la mise en évidence d'un déficit en ubiquinone au niveau musculaire. L'efficacité de l'ubidécarenone a été montrée chez deux patients avec une amélioration de la dystonie, des myoclonies et du score d'ataxie SARA (Mignot et al., 2013). De ce fait, ce traitement mérite d'être essayé dans cette maladie.

3.8.2.7. Autres ataxies avec une efficacité potentielle du coenzyme Q10

Une étude a retrouvé une efficacité modérée chez deux patients atteints d'ARCA3 (gène *ANO10*, Balreira et al., 2014) et une autre pour le traitement d'AOA1 (Quinzii et al., 2005). Ce médicament a été testé en raison du déficit en coenzyme Q10 retrouvé à l'étude de la biopsie musculaire chez certains patients. Cependant, ce déficit n'est pas retrouvé systématiquement. Pour AOA1, 5 patients sur 6 ont été trouvés avec un déficit très modéré en coenzyme Q10 par une équipe parisienne (LeBer et al., 2007) ; mais seulement un patient sur

six par une équipe italienne (Castellotti et al., 2011). Ces résultats sur quelques patients, non contrôlés, nécessitent des évaluations en aveugle versus placebo pour confirmer ou non l'efficacité du coenzyme Q10.

3.8.3. Thérapeutiques d'avenir

3.8.3.1. Thérapie génique

Des essais de thérapie génique sont encore en cours chez l'animal pour la maladie de Friedreich. L'utilisation d'AAV avec le gène de la frataxine a permis une nette amélioration de la cardiomyopathie dans un modèle murin d'ataxie de Friedreich (Perdomini et al., 2014)

3.8.3.2. Greffe de cellules souches

Ce type de greffe a été réalisé dans différents modèles murins avec une amélioration histologique et fonctionnelle :

- greffe de cellules souches mésenchymateuses dans le modèle Lurcher comprenant une dégénérescence des cellules de Purkinje (Jones et al., 2010)
- greffe de cellules souches mésenchymateuses dans la maladie de Friedreich (Jones et al., 2015)
- greffe de cellules souches mésenchymateuses dans SCA1 (Matsuura et al., 2014)
- greffe de cellules souches neurales dans SCA3 ou maladie de Machado Joseph (Mendonça et al., 2015)

Des essais de greffe de cellules souches neurales ont été réalisés chez l'homme. La sécurité de ce type de procédure semble à l'heure actuelle insuffisamment évaluée en raison de la description du développement de multiples tumeurs du système nerveux central chez un patient avec une ataxie-télangiectasie ayant bénéficié de ce type de traitement (Amariglio et al., 2009).

3.8.3.3. Essais pharmacologiques

Des nouvelles molécules sont testées dans l'ataxie de Friedreich notamment des inhibiteurs d'histone déacétylases dans le but d'augmenter l'expression de frataxine en ouvrant l'hétérochromatine induite par l'expansion GAA.

Au cours des cinq dernières années, le bond technologique représenté par les techniques de séquençage massivement parallèle a permis d'accélérer la découverte de nouveaux gènes d'ataxie. Ces progrès importants dans le diagnostic font espérer que le prochain bond technologique se fera cette fois au profit de la thérapeutique.

L'utilisation d'un traitement neuroprotecteur actif sur la dégénérescence spinocérébelleuse dans une ou plusieurs formes d'ataxies cérébelleuses sera probablement encore longue à mettre en pratique chez l'homme en raison des obligations légitimes sur le plan de la réglementation et de la sécurité liés aux essais thérapeutiques, en particulier pour la thérapie génique et la greffe de cellules souches.

Bibliographie

Abdel-Salam G, Thoenes M, Afifi HH, Körber F, Swan D, Bolz HJ. The supposed tumor suppressor gene WWOX is mutated in an early lethal microcephaly syndrome with epilepsy, growth retardation and retinal degeneration. *Orphanet J Rare Dis.* 2014 Jan 23;9:12.

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010 Apr;7(4):248-9.

Alderson NL, Rembiesa BM, Walla MD, Bielawska A, Bielawski J, Hama H. The human FA2H gene encodes a fatty acid 2-hydroxylase. *J Biol Chem.* 2004 Nov 19;279(47):48562-8.

Amariglio N, Hirshberg A, Scheithauer BW, Cohen Y, Loewenthal R, Trakhtenbrot L, Paz N, Koren-Michowitz M, Waldman D, Leider-Trejo L, Toren A, Constantini S, Rechavi G. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med.* 2009 Feb 17;6(2):e1000029.

Anheim M, Fleury M, Monga B, Laugel V, Chaigne D, Rodier G, Ginglinger E, Boulay C, Courtois S, Drouot N, Fritsch M, Delaunoy JP, Stoppa-Lyonnet D, Tranchant C, Koenig M. 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.* 2010 Feb;11(1):1-12.

Anheim M, Tranchant C, Koenig M. The autosomal recessive cerebellar ataxias. *N Engl J Med.* 2012 Feb 16;366(7):636-46.

Antoniou AC, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Olsson H, Johannsson O, Borg A, Pasini B, Radice P, Manoukian S, et al. Breast and ovarian

cancer risks to carriers of the BRCA1 5382insC and 185delAG and BRCA2 6174delT mutations: a combined analysis of 22 population based studies. *J Med Genet.* 2005;42:602–3.

Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg A, Pasini B, Radice P, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet.* 2003;72:1117–30.

Aqeilan RI, Donati V, Palamarchuk A, Trapasso F, Kaou M, Pekarsky Y, Sudol M, Croce CM. WW domain-containing proteins, WWOX and YAP, compete for interaction with ErbB-4 and modulate its transcriptional function. *Cancer Res.* 2005 Aug 1;65(15):6764-72.

Aqeilan RI, Hagan JP, de Bruin A, Rawahneh M, Salah Z, Gaudio E, Siddiqui H, Volinia S, Alder H, Lian JB, Stein GS, Croce CM. Targeted ablation of the WW domain-containing oxidoreductase tumor suppressor leads to impaired steroidogenesis. *Endocrinology.* 2009 Mar;150(3):1530-5.

Aqeilan RI, Palamarchuk A, Weigel RJ, Herrero JJ, Pekarsky Y, Croce CM. Physical and functional interactions between the Wwox tumor suppressor protein and the AP-2gamma transcription factor. *Cancer Res.* 2004 Nov 15;64(22):8256-61.

Aqeilan RI, Pekarsky Y, Herrero JJ, Palamarchuk A, Letofsky J, Druck T, Trapasso F, Han SY, Melino G, Huebner K, Croce CM. Functional association between Wwox tumor suppressor protein and p73, a p53 homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 30;101(13):4401-6.

Aqeilan RI, Trapasso F, Hussain S, Costinean S, Marshall D, Pekarsky Y, Hagan JP, Zanesi N, Kaou M, Stein GS, Lian JB, Croce CM. Targeted deletion of Wwox reveals a tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Mar 6;104(10):3949-54.

Asai H, Hirano M, Shimada K, Kiriyama T, Furiya Y, Ikeda M, Iwamoto T, Mori T, Nishinaka K, Konishi N, Udaka F, Ueno S. Protein kinase C gamma, a protein causative for dominant ataxia, negatively regulates nuclear import of recessive-ataxia-related aprataxin. *Hum Mol Genet.* 2009 Oct 1;18(19):3533-43.

Attali R, Warwar N, Israel A, Gurt I, McNally E, Puckelwartz M, Glick B, Nevo Y, Ben-Neriah Z, Melki J. Mutation of SYNE-1, encoding an essential component of the nuclear lamina, is responsible for autosomal recessive arthrogryposis. *Hum Mol Genet.* 2009 Sep 15;18(18):3462-9.

Azizi E, Zaidman JL, Eshchar J, Szeinberg A. Abetalipoproteinemia treated with parenteral and oral vitamins A and E, and with medium chain triglycerides. *Acta Paediatr Scand.* 1978 Nov;67(6):796-801.

Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science.* 2008 Feb 15;319(5865):916-9.

Balreira A, Boczonadi V, Barca E, Pyle A, Bansagi B, Appleton M, Graham C, Hargreaves IP, Rasic VM, Lochmüller H, Griffin H, Taylor RW, Naini A, Chinnery PF, Hirano M, Quinzii CM, Horvath R. ANO10 mutations cause ataxia and coenzyme Q₁₀ deficiency. *J Neurol.* 2014 Nov;261(11):2192-8.

Bednarek AK, Keck-Waggoner CL, Daniel RL, Laflin KJ, Bergsagel PL, Kiguchi K, Brenner AJ, Aldaz CM. WWOX, the FRA16D gene, behaves as a suppressor of tumor growth. *Cancer Res.* 2001 Nov 15;61(22):8068-73.

Bednarek AK, Laflin KJ, Daniel RL, Liao Q, Hawkins KA, Aldaz CM. WWOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23.3-24.1, a region frequently affected in breast cancer. *Cancer Res.* 2000 Apr 15;60(8):2140-5.

Belkadi A, Bolze A, Itan Y, Cobat A, Vincent QB, Antipenko A, Shang L, Boisson B, Casanova JL, Abel L. Whole-genome sequencing is more powerful than whole-exome

sequencing for detecting exome variants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Apr 28;112(17):5473-8

Biesecker LG. Exome sequencing makes medical genomics a reality. *Nat Genet* 2010 Jan ; 42(1) :13-4

Bowman EA, Walterfang M, Abel L, Desmond P, Fahey M, Velakoulis D. Longitudinal changes in cerebellar and subcortical volumes in adult-onset Niemann-Pick disease type C patients treated with miglustat. *J Neurol*. 2015 Jun 20. [Epub ahead of print]

Breedveld GJ, van Wetten B, te Raa GD, Brusse E, van Swieten JC, Oostra BA, Maat-Kievit JA. A new locus for a childhood onset, slowly progressive autosomal recessive spinocerebellar ataxia maps to chromosome 11p15. *J Med Genet*. 2004 Nov;41(11):858-66

Buckner RL. The cerebellum and cognitive function: 25 years of insight from anatomy and neuroimaging. *Neuron*. 2013 Oct 30;80(3):807-15.

Buermans HP, den Dunnen JT. Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Oct;1842(10):1932-1941.

Castellotti B, Mariotti C, Rimoldi M, Fancellu R, Plumari M, Caimi S, Uziel G, Nardocci N, Moroni I, Zorzi G, Pareyson D, Di Bella D, Di Donato S, Taroni F, Gellera C. Ataxia with oculomotor apraxia type1 (AOA1): novel and recurrent aprataxin mutations, coenzyme Q10 analyses, and clinical findings in Italian patients. *Neurogenetics*. 2011 Aug;12(3):193-201.

Chamova T, Florez L, Guergueltcheva V, Raycheva M, Kaneva R, Lochmüller H, Kalaydjieva L, Tournev I. ANO10 c.1150_1151del is a founder mutation causing autosomal recessive cerebellar ataxia in Roma/Gypsies. *J Neurol*. 2012 May;259(5):906-11. doi: 10.1007/s00415-011-6276-6.

Chen ST, Chuang JI, Wang JP, Tsai MS, Li H, Chang NS. Expression of WW domain-containing oxidoreductase WOX1 in the developing murine nervous system. *Neuroscience*. 2004;124(4):831-9.

Dick KJ, Al-Mjeni R, Baskir W, Koul R, Simpson MA, Patton MA, Raeburn S, Crosby AH. A novel locus for an autosomal recessive hereditary spastic paraplegia (SPG35) maps to 16q21-q23. *Neurology*. 2008 Jul 22;71(4):248-52

Dick KJ, Eckhardt M, Paisán-Ruiz C, Alshehhi AA, Proukakis C, Sibtain NA, Maier H, Sharifi R, Patton MA, Bashir W, Koul R, Raeburn S, Gieselmann V, Houlden H, Crosby AH. Mutation of FA2H underlies a complicated form of hereditary spastic paraplegia (SPG35). *Hum Mutat*. 2010 Apr;31(4):E1251-60.

Doria-Lamba L, De Grandis E, Cristiani E, Fiocchi I, Montaldi L, Grosso P, Gellera C. Efficacious vitamin E treatment in a child with ataxia with isolated vitamin E deficiency. *Eur J Pediatr*. 2006 Jul;165(7):494-5.

Dotti MT, Lütjohann D, von Bergmann K, Federico A. Normalisation of serum cholestanol concentration in a patient with cerebrotendinous xanthomatosis by combined treatment with chenodeoxycholic acid, simvastatin and LDL apheresis. *Neurol Sci*. 2004 Oct;25(4):185-91.

Ebberink MS, Csanyi B, Chong WK, Denis S, Sharp P, Mooijer PA, Dekker CJ, Spooner C, Ngu LH, De Sousa C, Wanders RJ, Fietz MJ, Clayton PT, Waterham HR, Ferdinandusse S. Identification of an unusual variant peroxisome biogenesis disorder caused by mutations in the PEX16 gene. *J Med Genet*. 2010 Sep;47(9):608-15.

Edvardson S, Hama H, Shaag A, Gomori JM, Berger I, Soffer D, Korman SH, Taustein I, Saada A, Elpeleg O. Mutations in the fatty acid 2-hydroxylase gene are associated with leukodystrophy with spastic paraparesis and dystonia. *Am J Hum Genet*. 2008 Nov;83(5):643-8.

Fecarotta S, Romano A, Della Casa R, Del Giudice E, Bruschini D, Mansi G, Bembi B, Dardis A, Fiumara A, Di Rocco M, Uziel G, Ardisson A, Roccatello D, Alpa M, Bertini E, D'Amico A, Dionisi-Vici C, Deodato F, Caviglia S, Federico A, Palmeri S, Gabrielli O, Santoro L, Filla A, Russo C, Parenti G, Andria G. Long term follow-up to evaluate the efficacy of miglustat treatment in Italian patients with Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis.* 2015 Feb 27;10:22.

Fogel BL, Perlman S. Clinical features and molecular genetics of autosomal recessive cerebellar ataxias. *Lancet Neurol.* 2007 Mar;6(3):245-57.

Fonteyn EM, Schmitz-Hübsch T, Verstappen CC, Baliko L, Bloem BR, Boesch S, Bunn L, Charles P, Dürr A, Filla A, Giunti P, Globas C, Klockgether T, Melegh B, Pandolfo M, De Rosa A, Schöls L, Timmann D, Munneke M, Kremer BP, van de Warrenburg BP. Falls in spinocerebellar ataxias: Results of the EuroSCA Fall Study. *Cerebellum.* 2010 Jun;9(2):232-9.

Fonteyn EM, Schmitz-Hübsch T, Verstappen CC, Baliko L, Bloem BR, Boesch S, Bunn L, Giunti P, Globas C, Klockgether T, Melegh B, Pandolfo M, Schöls L, Timmann D, van de Warrenburg BP. Prospective analysis of falls in dominant ataxias. *Eur Neurol.* 2013;69(1):53-7.

Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, Bishop DT, Weber B, Lenoir G, Chang-Claude J, Sobol H, Teare MD, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet.* 1998;62:676–89.

Garone C, Pippucci T, Cordelli DM, Zuntini R, Castegnaro G, Marconi C, Graziano C, Marchiani V, Verrotti A, Seri M, Franzoni E. FA2H-related disorders: a novel c.270+3A>T splice-site mutation leads to a complex neurodegenerative phenotype. *Dev Med Child Neurol.* 2011 Oct;53(10):958-61.

Ginanneschi F, Mignarri A, Mondelli M, Gallus GN, Del Puppo M, Giorgi S, Federico A, Rossi A, Dotti MT. Polyneuropathy in cerebrotendinous xanthomatosis and response to treatment with chenodeoxycholic acid. *J Neurol*. 2013 Jan;260(1):268-74.

Grady RM, Starr DA, Ackerman GL, Sanes JR, Han M. Syne proteins anchor muscle nuclei at the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar 22;102(12):4359-64.

Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science*. 1974;185:862-64.

Gribaa M, Salih M, Anheim M, Lagier-Tourenne C, H'mida D, Drouot N, Mohamed A, Elmalik S, Kabiraj M, Al-Rayess M, Almubarak M, Bétard C, Goebel H, Koenig M. A new form of childhood onset, autosomal recessive spinocerebellar ataxia and epilepsy is localized at 16q21-q23. *Brain*. 2007 Jul;130(Pt 7):1921-8. Epub 2007 Apr 30.

Gros-Louis F, Dupré N, Dion P, Fox MA, Laurent S, Verreault S, Sanes JR, Bouchard JP, Rouleau GA. Mutations in SYNE1 lead to a newly discovered form of autosomal recessive cerebellar ataxia. *Nat Genet*. 2007 Jan;39(1):80-5.

Gugger OS, Kapfhammer JP. Reduced size of the dendritic tree does not protect Purkinje cells from excitotoxic death. *J Neurosci Res*. 2010 Mar;88(4):774-83.

Gutsche HU, Siegmund JB, Hoppmann I. Lipapheresis: an immunoglobulin-sparing treatment for Refsum's disease. *Acta Neurol Scand*. 1996 Sep;94(3):190-3.

Hammer MB, Eleuch-Fayache G, Schottlaender LV, Nehdi H, Gibbs JR, Arepalli SK, Chong SB, Hernandez DG, Sailer A, Liu G, Mistry PK, Cai H, Shrader G, Sassi C, Bouhlal Y, Houlden H, Hentati F, Amouri R, Singleton AB. Mutations in GBA2 cause autosomal-recessive cerebellar ataxia with spasticity. *Am J Hum Genet*. 2013 Feb 7;92(2):245-51.

Hamza W, Ali Pacha L, Hamadouche T, Muller J, Drouot N, Ferrat F, Makri S, Chaouch M, Tazir M, Koenig M, Benhassine T. Molecular and clinical study of a cohort of 110 Algerian patients with autosomal recessive ataxia. *BMC Med Genet*. 2015 Jun 12;16:36.

Hara T, Nakamura K, Matsui M, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 2006;441:885–9.

Harding AE Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet* 1983 May 21 ; 1(8334) :1151-5.

Hekman KE, Gomez CM. The autosomal dominant spinocerebellar ataxias: emerging mechanistic themes suggest pervasive Purkinje cell vulnerability. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015 May;86(5):554-61.

Hetz C, Chevet E, Oakes SA. Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nat Cell Biol*. 2015 Jun 30;17(7):829-38.

Hoischen A, Gilissen C, Arts P, Wieskamp N, van der Vliet W, Vermeer S, Steehouwer M, de Vries P, Meijer R, Seiqueros J, Knoers NV, Buckley MF, Scheffer H, Veltman JA. Massively parallel sequencing of ataxia genes after array-based enrichment. *Hum Mutat*. 2010 Apr;31(4):494-9

Howes J, Shimizu Y, Feige MJ, et al. C-terminal mutations destabilize SIL1/BAP and can cause marinesco-sjogren syndrome. *J Biol Chem* 2012;287:8552–60

Ilg W, Brötz D, Burkard S, Giese MA, Schöls L, Synofzik M. Long-term effects of coordinative training in degenerative cerebellar disease. *Mov Disord*. 2010 Oct 15;25(13):2239-46.

Ilg W, Schatton C, Schicks J, Giese MA, Schöls L, Synofzik M. Video game-based coordinative training improves ataxia in children with degenerative ataxia. *Neurology*. 2012 Nov 13;79(20):2056-60.

Ilg W, Synofzik M, Brötz D, Burkard S, Giese MA, Schöls L. Intensive coordinative training improves motor performance in degenerative cerebellar disease. *Neurology*. 2009 Dec 1;73(22):1823-30.

Ito S, Kuwabara S, Sakakibara R, Oki T, Arai H, Oda S, Hattori T. Combined treatment with LDL-apheresis, chenodeoxycholic acid and HMG-CoA reductase inhibitor for cerebrotendinous xanthomatosis. *J Neurol Sci*. 2003 Dec 15;216(1):179-82.

Izumi Y, Miyamoto R, Morino H, Yoshizawa A, Nishinaka K, Udaka F, Kameyama M, Maruyama H, Kawakami H. Cerebellar ataxia with SYNE1 mutation accompanying motor neuron disease. *Neurology*. 2013 Feb 5;80(6):600-1.

Jones J, Estirado A, Redondo C, Pacheco-Torres J, Sirerol-Piquer MS, Garcia-Verdugo JM, Martinez S. Mesenchymal stem cells improve motor functions and decrease neurodegeneration in ataxic mice. *Mol Ther*. 2015 Jan;23(1):130-8.

Jones J, Jaramillo-Merchán J, Bueno C, Pastor D, Viso-León M, Martínez S. Mesenchymal stem cells rescue Purkinje cells and improve motor functions in a mouse model of cerebellar ataxia. *Neurobiol Dis*. 2010 Nov;40(2):415-23.

Koenig M. Rare forms of autosomal recessive neurodegenerative ataxia. *Semin Pediatr Neurol*. 2003 Sep;10(3):183-92

Komatsu M, Waguri S, Chiba T, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 2006;441:880–4.

Kuriyama M, Tokimura Y, Fujiyama J, Utatsu Y, Osame M. Treatment of cerebrotendinous xanthomatosis: effects of chenodeoxycholic acid, pravastatin, and combined use. *J Neurol Sci*. 1994 Aug;125(1):22-8.

Kuroki T, Yendamuri S, Trapasso F, Matsuyama A, Aqeilan RI, Alder H, Rattan S, Cesari R, Nolli ML, Williams NN, Mori M, Kanematsu T, Croce CM. The tumor suppressor gene WWOX at FRA16D is involved in pancreatic carcinogenesis. *Clin Cancer Res.* 2004 Apr 1;10(7):2459-65.

Lagier-Tourenne C, Tazir M, López LC, Quinzii CM, Assoum M, Drouot N, Busso C, Makri S, Ali-Pacha L, Benhassine T, Anheim M, Lynch DR, Thibault C, Plewniak F, Bianchetti L, Tranchant C, Poch O, DiMauro S, Mandel JL, Barros MH, Hirano M, Koenig M. ADCK3, an ancestral kinase, is mutated in a form of recessive ataxia associated with coenzyme Q10 deficiency. *Am J Hum Genet.* 2008 Mar;82(3):661-72.

Larivière R, Gaudet R, Gentil BJ, Girard M, Conte TC, Minotti S, Leclerc-Desaulniers K, Gehring K, McKinney RA, Shoubridge EA, McPherson PS, Durham HD, Brais B. Sacs knockout mice present pathophysiological defects underlying autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. *Hum Mol Genet.* 2015 Feb 1;24(3):727-39.

La Spada AR, Taylor JP. Repeat expansion disease: progress and puzzles in disease pathogenesis. *Nat Rev Genet* 2010;11:247–58.

Le Ber I, Dubourg O, Benoist JF, Jardel C, Mochel F, Koenig M, Brice A, Lombès A, Dürr A. Muscle coenzyme Q10 deficiencies in ataxia with oculomotor apraxia 1. *Neurology.* 2007 Jan 23;68(4):295-7.

Lee JW, Beebe K, Nangle LA, et al. Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration. *Nature* 2006;443:50–5.

Leppert D, Schanz U, Burger J, Gmür J, Blau N, Waespe W. Long-term plasma exchange in a case of Refsum's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 1991;241(2):82-4.

Lim LP, Burge CB. A computational analysis of sequence features involved in recognition of short introns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Sep 25;98(20):11193-8.

Lo CP, Hsu LJ, Li MY, Hsu SY, Chuang JI, Tsai MS, Lin SR, Chang NS, Chen ST. MPP+-induced neuronal death in rats involves tyrosine 33 phosphorylation of WW domain-containing oxidoreductase WOX1. *Eur J Neurosci.* 2008 Apr;27(7):1634-46.

Lopes MC, Joyce C, Ritchie GR, John SL, Cunningham F, Asimit J, Zeggini E. A combined functional annotation score for non-synonymous variants. *Hum Hered.* 2012;73(1):47-51.

Lubinski J, Huzarski T, Byrski T, Lynch HT, Cybulski C, Ghadirian P, Stawicka M, Foulkes WD, Kilar E, Kim-Sing C, Neuhausen SL, Armel S, Gilchrist D, Sweet K, Gronwald J, Eisen A, Gorski B, Sun P, Narod SA; Hereditary Breast Cancer Clinical Study Group. The risk of breast cancer in women with a BRCA1 mutation from North America and Poland. *Int J Cancer.* 2012 Jul 1;131(1):229-34.

Ludes-Meyers JH, Kil H, Parker-Thornburg J, Kusewitt DF, Bedford MT, Aldaz CM. Generation and characterization of mice carrying a conditional allele of the *Wwox* tumor suppressor gene. *PLoS One.* 2009 Nov 10;4(11):e7775

Luyckx E, Eyskens F, Simons A, Beckx K, Van West D, Dhar M. Long-term follow-up on the effect of combined therapy of bile acids and statins in the treatment of cerebrotendinous xanthomatosis: a case report. *Clin Neurol Neurosurg.* 2014 Mar;118:9-11.

Matsuura S, Shuvaev AN, Iizuka A, Nakamura K, Hirai H. Mesenchymal stem cells ameliorate cerebellar pathology in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 1. *Cerebellum.* 2014 Jun;13(3):323-30.

Mancuso M, Orsucci D, Siciliano G, Bonuccelli U. The genetics of ataxia: through the labyrinth of the Minotaur, looking for Ariane's thread. *J Neurol.* 2014 Sep;261 Suppl 2:S528-41
Belkadi A, Bolze A, Itan Y, Cobat A, Vincent QB, Antipenko A, Shang L, Boisson B, Casanova JL, Abel L. Whole-genome sequencing is more powerful than

whole-exome sequencing for detecting exome variants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Apr 28;112(17):5473-8.

Mendonça LS, Nóbrega C, Hirai H, Kaspar BK, Pereira de Almeida L. Transplantation of cerebellar neural stem cells improves motor coordination and neuropathology in Machado-Joseph disease mice. *Brain*. 2015 Feb;138(Pt 2):320-35.

Mignot C, Lambert L, Pasquier L, Bienvenu T, Delahaye-Duriez A, Keren B, Lefranc J, Saunier A, Allou L, Roth V, Valduga M, Moustaine A, Auvin S, Barrey C, Chantot-Bastarud S, Lebrun N, Moutard ML, Nougues MC, Vermersch AI, Héron B, Pipiras E, Héron D, Olivier-Faivre L, Guéant JL, Jonveaux P, Philippe C. WWOX-related encephalopathies: delineation of the phenotypical spectrum and emerging genotype-phenotype correlation. *J Med Genet*. 2015 Jan;52(1):61-70.

Mimura Y, Kuriyama M, Tokimura Y, Fujiyama J, Osame M, Takesako K, Tanaka N. Treatment of cerebrotendinous xanthomatosis with low-density lipoprotein (LDL)-apheresis. *J Neurol Sci*. 1993 Feb;114(2):227-30.

Minnerop M, Bauer P. Autosomal recessive cerebellar ataxia 3 due to homozygote c.132dupA mutation within the ANO10 gene. *JAMA Neurol*. 2015 Feb;72(2):238-9

Miyai I, Ito M, Hattori N, Mihara M, Hatakenaka M, Yagura H, Sobue G, Nishizawa M; Cerebellar Ataxia Rehabilitation Trialists Collaboration. Cerebellar ataxia rehabilitation trial in degenerative cerebellar diseases. *Neurorehabil Neural Repair*. 2012 Jun;26(5):515-22

Mollet J, Delahodde A, Serre V, Chretien D, Schlemmer D, Lombes A, Boddaert N, Desguerre I, de Lonlay P, de Baulny HO, Munnich A, Rötig A. CABC1 gene mutations cause ubiquinone deficiency with cerebellar ataxia and seizures. *Am J Hum Genet*. 2008 Mar;82(3):623-30.

Németh AH, Kwasniewska AC, Lise S, Parolin Schneckenberg R, Becker EB, Bera KD, Shanks ME, Gregory L, Buck D, Zameel Cader M, Talbot K, de Silva R, Fletcher

N, Hastings R, Jayawant S, Morrison PJ, Worth P, Taylor M, Tolmie J, O'Regan M; UK Ataxia Consortium, Valentine R, Packham E, Evans J, Seller A, Ragoussis J. Next generation sequencing for molecular diagnosis of neurological disorders using ataxias as a model Brain. 2013 Oct;136(Pt 10):3106-18.

Ng PC, Henikoff S. SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. Nucleic Acids Res. 2003; 31:3812–3814.

Noreau A, Bourassa CV, Szuto A, Levert A, Dobrzeniecka S, Gauthier J, Forlani S, Durr A, Anheim M, Stevanin G, Brice A, Bouchard JP, Dion PA, Dupré N, Rouleau GA. SYNE1 mutations in autosomal recessive cerebellar ataxia. JAMA Neurol. 2013 Oct;70(10):1296-31.

Ouahchi K, Arita M, Kayden H, Hentati F, Ben Hamida M, Sokol R, Arai H, Inoue K, Mandel JL, Koenig M. Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the alpha-tocopherol transfer protein. Nat Genet. 1995 Feb;9(2):141-5.

Patterson MC, Mengel E, Vanier MT, Schwierin B, Muller A, Cornelisse P, Pineda M; NPC Registry investigators. Stable or improved neurological manifestations during miglustat therapy in patients from the international disease registry for Niemann-Pick disease type C: an observational cohort study. Orphanet J Rare Dis. 2015 May 28;10:65.

Perdomini M, Belbellaa B, Monassier L, Reutenauer L, Messaddeq N, Cartier N, Crystal RG, Aubourg P, Puccio H. Prevention and reversal of severe mitochondrial cardiomyopathy by gene therapy in a mouse model of Friedreich's ataxia. Nat Med. 2014 May;20(5):542-7

Pfeffer G, Pyle A, Griffin H, Miller J, Wilson V, Turnbull L, Fawcett K, Sims D, Eglon G, Hadjivassiliou M, Horvath R, Németh A, Chinnery PF. SPG7 mutations are a common cause of undiagnosed ataxia. Neurology. 2015 Mar 17;84(11):1174-6.

Pierre G, Setchell K, Blyth J, Preece MA, Chakrapani A, McKiernan P. Prospective treatment of cerebrotendinous xanthomatosis with cholic acid therapy. *J Inher Metab Dis.* 2008 Dec;31 Suppl 2:S241-5.

Pyle A, Smertenko T, Bargiela D, Griffin H, Duff J, Appleton M, Douroudis K, Pfeffer G, Santibanez-Koref M, Eglon G, Yu-Wai-Man P, Ramesh V, Horvath R, Chinnery PF. Exome sequencing in undiagnosed inherited and sporadic ataxias. *Brain.* 2015 Feb;138(Pt 2):276-83

Quinzii CM, Kattah AG, Naini A, Akman HO, Mootha VK, DiMauro S, Hirano M. Coenzyme Q deficiency and cerebellar ataxia associated with an aprataxin mutation. *Neurology.* 2005 Feb 8;64(3):539-41.

Razafsky D, Hodzic D. A variant of Nesprin1 giant devoid of KASH domain underlies the molecular etiology of autosomal recessive cerebellar ataxia type I. *Neurobiol Dis.* 2015 Jun;78:57-67. doi: 10.1016/j.nbd.2015.03.027.

Redin C, Gérard B, Lauer J, Herenger Y, Muller J, Quartier A, Masurel-Paulet A, Willems M, Lesca G, El-Chehadeh S, Le Gras S, Vicaire S, Philipps M, Dumas M, Geoffroy V, Feger C, Haumesser N, Alembik Y, Barth M, Bonneau D, Colin E, Dollfus H, Doray B, Delrue MA, Drouin-Garraud V, Flori E, Fradin M, Francannet C, Goldenberg A, Lumbroso S, Mathieu-Dramard M, Martin-Coignard D, Lacombe D, Morin G, Polge A, Sukno S, Thauvin-Robinet C, Thevenon J, Doco-Fenzy M, Genevieve D, Sarda P, Edery P, Isidor B, Jost B, Olivier-Faivre L, Mandel JL, Piton A. Efficient strategy for the molecular diagnosis of intellectual disability using targeted high-throughput sequencing. *J Med Genet.* 2014 Nov;51(11):724-36.

Ruano L, Melo C, Silva MC, Coutinho P The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies. *Neuroepidemiology* 2014;42(3):174-83.

Roth DM, Hutt DM, Tong J, Bouche-careilh M, Wang N, Seeley T, Dekkers JF, Beekman JM, Garza D, Drew L, Masliah E, Morimoto RI, Balch WE. Modulation of

the maladaptive stress response to manage diseases of protein folding. *PLoS Biol.* 2014 Nov 18;12(11):e1001998.

Sáez ME, González-Pérez A, Martínez-Larrad MT, Gayán J, Real LM, Serrano-Ríos M, Ruiz A. WWOX gene is associated with HDL cholesterol and triglyceride levels. *BMC Med Genet.* 2010 Oct 14;11:148.

Santos de Oliveira LA, Martins CP, Horsczaruk CH, Lima da Silva DC, Martins JV, Vasconcelos LF, Rodrigues Ede C. Decreasing fall risk in spinocerebellar ataxia. *J Phys Ther Sci.* 2015 Apr;27(4):1223-5.

Schneider SA, Bhatia KP. Excess iron harms the brain: the syndromes of neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA). *J Neural Transm.* 2013 Apr;120(4):695-703.

Schmahmann JD, Sherman JC. The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain.* 1998 Apr;121 (4):561-79.

Schulz JB, Boesch S, Bürk K, Dürr A, Giunti P, Mariotti C, Pousset F, Schöls L, Vankan P, Pandolfo M. Diagnosis and treatment of Friedreich ataxia: a European perspective. *Nat Rev Neurol.* 2009 Apr;5(4):222-34.

Slemmer JE, Haasdijk ED, Engel DC, Plesnila N, Weber JT. Aldolase C-positive cerebellar Purkinje cells are resistant to delayed death after cerebral trauma and AMPA-mediated excitotoxicity. *Eur J Neurosci.* 2007 Aug;26(3):649-56.

Stoodley CJ, Valera EM, Schmahmann JD. Functional topography of the cerebellum for motor and cognitive tasks: an fMRI study. *Neuroimage.* 2012 Jan 16;59(2):1560-70.

Straube R, Gäckler D, Thiele A, Muselmann L, Kingreen H, Klingel R. Membrane differential filtration is safe and effective for the long-term treatment of Refsum syndrome--an update of treatment modalities and pathophysiological cognition. *Transfus Apher Sci.* 2003 Aug;29(1):85-91.

Sun Y, Almomani R, Breedveld GJ, Santen GW, Aten E, Lefeber DJ, Hoff JI, Brusse E, Verheijen FW, Verdijk RM, Kriek M, Oostra B, Breuning MH, Losekoot M, den Dunnen JT, van de Warrenburg BP, Maat-Kievit AJ. Autosomal recessive spinocerebellar ataxia 7 (SCAR7) is caused by variants in TPP1, the gene involved in classic late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis 2 disease (CLN2 disease). *Hum Mutat.* 2013 May;34(5):706-13.

Suzuki H, Katayama K, Takenaka M, Amakasu K, Saito K, Suzuki K. A spontaneous mutation of the *Wwox* gene and audiogenic seizures in rats with lethal dwarfism and epilepsy. *Genes Brain Behav.* 2009 Oct;8(7):650-60.

Suzuki H, Takenaka M, Suzuki K. Phenotypic characterization of spontaneously mutated rats showing lethal dwarfism and epilepsy. *Comp Med.* 2007 Aug;57(4):360-9.

Synofzik M, Ilg W. Motor training in degenerative spinocerebellar disease: ataxia-specific improvements by intensive physiotherapy and exergames. *Biomed Res Int.* 2014;2014:583507.

Synofzik M, Soehn AS, Gburek-Augustat J, Schicks J, Karle KN, Schüle R, Haack TB, Schöning M, Biskup S, Rudnik-Schöneborn S, Senderek J, Hoffmann KT, MacLeod P, Schwarz J, Bender B, Krüger S, Kreuz F, Bauer P, Schöls L. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix Saguenay (ARSACS): expanding the genetic, clinical and imaging spectrum. *Orphanet J Rare Dis.* 2013 Mar 15;8:41.

Valduga M, Philippe C, Lambert L, Bach-Segura P, Schmitt E, Masutti JP, François B, Pinaud P, Vibert M, Jonveaux P. WWOX and severe autosomal recessive epileptic

encephalopathy: first case in the prenatal period.. *J Hum Genet.* 2015 May;60(5):267-71.

Vasli N, Böhm J, Le Gras S, Muller J, Pizot C, Jost B, Echaniz-Laguna A, Laugel V, Tranchant C, Bernard R, Plewniak F, Vicaire S, Levy N, Chelly J, Mandel JL, Biancalana V, Laporte J. Next generation sequencing for molecular diagnosis of neuromuscular diseases. *Acta Neuropathol.* 2012 Aug;124(2):273-83.

Vermeer S, Hoischen A, Meijer RP, Gilissen C, Neveling K, Wieskamp N, de Brouwer A, Koenig M, Anheim M, Assoum M, Drouot N, Todorovic S, Milic-Rasic V, Lochmüller H, Stevanin G, Goizet C, David A, Durr A, Brice A, Kremer B, van de Warrenburg BP, Schijvenaars MM, Heister A, Kwint M, Arts P, van der Wijst J, Veltman J, Kamsteeg EJ, Scheffer H, Knoers N. Targeted next-generation sequencing of a 12.5 Mb homozygous region reveals ANO10 mutations in patients with autosomal-recessive cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet.* 2010 Dec 10;87(6):813-9.

Verrips A, Wevers RA, Van Engelen BG, Keyser A, Wolthers BG, Barkhof F, Stalenhoef A, De Graaf R, Janssen-Zijlstra F, Van Spreeken A, Gabreëls FJ. Effect of simvastatin in addition to chenodeoxycholic acid in patients with cerebrotendinous xanthomatosis. *Metabolism.* 1999 Feb;48(2):233-8.

Vogel AP, Folker J, Poole ML. Treatment for speech disorder in Friedreich ataxia and other hereditary ataxia syndromes. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014 Oct 28;10:CD008953.

Votsi C, Zamba-Papanicolaou E, Middleton LT, Pantzaris M, Christodoulou K. A novel GBA2 gene missense mutation in spastic ataxia. *Ann Hum Genet.* 2014 Jan;78(1):13-22.

Welsh JP, Yuen G, Placantonakis DG, Vu TQ, Haiss F, O'Hearn E, Molliver ME, Aicher SA. Why do Purkinje cells die so easily after global brain ischemia? Aldolase C, EAAT4, and the cerebellar contribution to posthypoxic myoclonus. *Adv Neurol.* 2002;89:331-59.

White S, Hewitt J, Turbitt E, van der Zwan Y, Hersmus R, Drop S, Koopman P, Harley V, Cools M, Looijenga L, Sinclair A. A multi-exon deletion within WWOX is associated with a 46,XY disorder of sex development. *Eur J Hum Genet.* 2012 Mar;20(3):348-51.

Wraith JE, Vecchio D, Jacklin E, Abel L, Chadha-Boreham H, Luzy C, Giorgino R, Patterson MC. Miglustat in adult and juvenile patients with Niemann-Pick disease type C: long-term data from a clinical trial. *Mol Genet Metab.* 2010 Apr;99(4):351-7.

Yu K, Fan J, Ding X, Li C, Wang J, Xiang Y, Wang QS. Association study of a functional copy number variation in the WWOX gene with risk of gliomass among Chinese people. *Int J Cancer.* 2014 Oct 1;135(7):1687-91.

Zamel R, Khan R, Pollex RL, Hegele RA. Abetalipoproteinemia: two case reports and literature review. *Orphanet J Rare Dis.* 2008 Jul 8;3:19.

Zhang X, Xu R, Zhu B, Yang X, Ding X, Duan S, Xu T, Zhuang Y, Han M. Syne-1 and Syne-2 play crucial roles in myonuclear anchorage and motor neuron innervation. *Development.* 2007 Mar;134(5):901-8.

Zhao L, Longo-Guess C, Harris BS, et al. Protein accumulation and neurodegeneration in the woozy mutant mouse is caused by disruption of SIL1, a cochaperone of BiP. *Nat Genet* 2005;37:974–9.

Zolotov D, Wagner S, Kalb K, Bunia J, Heibges A, Klingel R. Long-term strategies for the treatment of Refsum's disease using therapeutic apheresis. *J Clin Apher.* 2012;27(2):99-105.

Ressources Web

Programme Varank <http://www.lbgi.fr/VaRank>

Programme Splicesport <http://spliceport.cbcb.umd.edu>

Base de données sur les protéines : <http://www.uniprot.org/>

Site Agilent <http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pageId=3083> (Juillet 2015)

www.anism.sante.fr/var/anism_site/storage/original/application/0edd877424b6f7301df42c2aff2a9a5a.pdf (Juillet 2015)

genetique.snv.jussieu.fr/doc2012/120607_SequencageHautDebit.pdf (Juillet 2015)

<http://seqanswers.com/forums/showthread.php?t=21> (Juillet 2015)

<http://www.biorigami.com/?tag=enrichissement-ciblee> (Juillet 2015)

Annexes

**Annexe 1 : panel « Ataxie » du Center for genomics and transcriptomics Tübingen
(www.Cegat.de)**

- ABCB7
- ABHD12
- ADCK3
- AFG3L2
- APTX
- ATM
- ATN1
- ATXN1
- ATXN2
- ATXN3
- ATXN7
- C10ORF2
- ATXN10
- BEAN1
- CACNA1A
- CYP27A1
- DARS2
- DNMT1
- FGF14
- FXN
- ITPR1
- KCNC3
- KCND3
- MRE11A
- MTPP

- MTPAP
- NOP56
- NPC1
- NPC2
- OPA1
- OPA3
- PDYN
- PEX7
- PHYH
- POLG
- PPP2R2B
- PRKCG
- SACS
- SETX
- SIL1
- SPG7
- SPTBN2
- SYNE1
- TBP
- TDP1
- TGM6
- TTBK2
- TTPA
- VAMP1
- VLDLR
- ZNF592

Annexe 2 : Panel de 118 gènes d'ataxie d'après Nemeth et al., 2013

(supplementary Data)

Autosomal Dominant	Autosomal Recessive	Ataxia in mouse models	tRNA synthetase genes	Other disorders associated with Ataxia	Speculative	Joubert
GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE	GENE
<i>ATXN1</i>	<i>APTX</i>	<i>AARS</i>	<i>AARS2</i>	<i>PRPS1</i>	<i>AIFM1</i>	<i>AHI1</i>
<i>ATXN2</i>	<i>SACS</i>	<i>CHD6</i>	<i>CARS</i>	<i>GAN</i>	<i>EN1</i>	<i>ARL13B</i>
<i>ATXN3</i>	<i>ABCB7</i>	<i>A2BP1</i>	<i>CARS2</i>	<i>SLC6A19</i>	<i>EN2</i>	<i>CC2D2A</i>
<i>PLEKHG4</i>	<i>ATM</i>	<i>ATP2B2</i>	<i>DARS</i>	<i>TINF2</i>	<i>KLHL1</i>	<i>CEP290</i>
<i>SPTBN2</i>	<i>MRE11A</i>	<i>AGTPBP1</i>	<i>DARS2</i>	<i>PSAP</i>	<i>RAB3A</i>	<i>INPP5E</i>
<i>CACNA1A</i>	<i>TTPA</i>	<i>DNAJC19</i>	<i>EARS2</i>	<i>SCN1A</i>	<i>SYNE2</i>	<i>NPHP1</i>
<i>ATXN7</i>	<i>ATCAY</i>	<i>DST</i>	<i>EPRS</i>		<i>EEF2</i>	<i>OFD1</i>
<i>ATXN8OS</i>	<i>FXN</i>	<i>GRID2</i>	<i>FARS2</i>			<i>RPGRIP1L</i>
<i>ATXN10</i>	<i>SIL1</i>	<i>HERC1</i>	<i>FARSA</i>			<i>TMEM216</i>
<i>TTBK2</i>	<i>TDP1</i>	<i>KCNJ6</i>	<i>FARSB</i>			<i>TMEM67</i>
<i>KCNC3</i>	<i>CABC1</i>	<i>MYO5A</i>	<i>GARS</i>			
<i>PRKCG</i>	<i>SETX</i>	<i>RELN</i>	<i>HARS</i>			
<i>ITPR1</i>	<i>SYNE1</i>	<i>RORA</i>	<i>HARS2</i>			
<i>TBP</i>	<i>MARS2</i>	<i>SLC12A6</i>	<i>IARS</i>			
<i>FGF14</i>	<i>GRM1</i>	<i>SNAP25</i>	<i>IARS2</i>			
<i>AFG3L2</i>	<i>KIAA0226</i>	<i>TRPC3</i>	<i>KARS</i>			
<i>BEAN1</i>	<i>DARS2</i>	<i>USP14</i>	<i>LARS</i>			
<i>KCNA1</i>	<i>KCNJ10</i>	<i>AFF1</i>	<i>LARS2</i>			
<i>CACNB4</i>	<i>AAAS</i>		<i>MARS</i>			
<i>SLC1A3</i>	<i>VLDLR</i>		<i>NARS</i>			
<i>ATN1</i>			<i>NARS2</i>			
<i>PPP2R2B</i>			<i>PARS2</i>			
			<i>QARS</i>			
			<i>RARS</i>			
			<i>RARS2</i>			
			<i>SARS</i>			
			<i>SARS2</i>			
			<i>TARS</i>			
			<i>TARS2</i>			
			<i>VARS</i>			
			<i>VARS2</i>			
			<i>WARS</i>			
			<i>WARS2</i>			
			<i>YARS</i>			
			<i>YARS2</i>			

Martial MALLARET

Identification de nouveaux gènes d'ataxies cérébelleuses récessives et intérêt du séquençage haut débit dans le diagnostic des ataxies d'origine génétique

Résumé

Les ataxies cérébelleuses héréditaires sont un ensemble de pathologies neurodégénératives ou neuro-développementales rares responsables d'un handicap fonctionnel important. Nous décrivons la découverte dans deux familles consanguines avec une ataxie cérébelleuse, une épilepsie et un retard mental deux mutations homozygotes dans le gène *WWOX* à l'aide du séquençage de l'exome d'un des patients de chaque famille. Ce gène était connu comme un gène suppresseur de tumeur. Par une stratégie de capture ciblée de 57 gènes d'ataxies cérébelleuses sur une série de 155 patients, nous avons posé un diagnostic dans 20,6% des cas dont des mutations d'*ANO10* et *SYNE1*. Des études multicentriques ont permis d'étendre les connaissances sur ces maladies et montrer l'existence de phénotypes sévères dans *ARCA1*.

A partir de cette série, nous avons validé en aveugle la pertinence d'un algorithme diagnostique clinico-biologique proposé par l'article de Anheim dans le New England Journal of Medicine en 2012.

Mots clés : ataxie ; séquençage haut débit ; *WWOX*

Résumé en anglais

Hereditary cerebellar ataxias are a group of neurodegenerative or neurodevelopmental diseases responsible of major disability. We found thanks to exome sequencing mutations in the *WWOX* gene in two consanguineous families presenting with cerebellar ataxia, epilepsy and mental retardation. This gene was until recently only recognized to be a tumor suppressor.

With a 57 ataxia genes targeted capture strategy, next generation sequencing in 155 patients found 20,6% of positive diagnosis, including several new mutations in *ANO10* and *SYNE1*. Multi center studies allow to extend clinical knowledge with severes phenotypes especially in *ARCA1*.

We validate a clinico-biological algorithm for recessive ataxias diagnosis published by Anheim in the in New England Journal of Medicine, 2012 in a blinded manner

Key words : ataxia ; next generation sequencing ; *WWOX*

