



HAL
open science

Étude génétique et corrélation génotype-phénotype de la maladie de Parkinson dans la population tunisienne

Sawssan Ben Romdhan

► To cite this version:

Sawssan Ben Romdhan. Étude génétique et corrélation génotype-phénotype de la maladie de Parkinson dans la population tunisienne. Génétique humaine. Université Paris sciences et lettres; Université de Sfax (Tunisie), 2019. Français. NNT : 2019PSLEP031 . tel-02899962

HAL Id: tel-02899962

<https://theses.hal.science/tel-02899962>

Submitted on 15 Jul 2020

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.

THÈSE DE DOCTORAT

de l'Université de recherche Paris Sciences et Lettres
PSL Research University

Préparée dans le cadre d'une cotutelle entre
l'École Pratique des Hautes Études
et l'École Nationale d'Ingénieurs, Université de Sfax

Etude génétique et corrélation génotype-phénotype de la maladie de
Parkinson dans la population Tunisienne

École doctorale de l'EPHE – ED 472

Spécialité : Biodiversité, génétique et évolution

Soutenue par :

Sawssan Ben Romdhan

Le 3 Septembre 2019

Dirigée par :

Giovanni Stevanin

Chokri Mhiri

Suzanne Lesage

COMPOSITION DU JURY :

M. Saber MASMOUDI
Centre de Biotechnologie de Sfax
Rapporteur

M. Eric LEGUERN
Institut du cerveau et de la moelle épinière
Rapporteur

Mme. Marie-Christine Chartier-Harlin
Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert
Université de Lille- Inserm-CHRU
Examineur

M. Ahmed Rebai
Centre de Biotechnologie de Sfax
Examineur

M. Riadh Gouider
Service de Neurologie, Hôpital Razi de
Manouba
Invité



Dédicaces

LA THÈSE NUIT GRAVEMENT À LA SANTÉ

Comment je peux dédier quelque chose assez éprouvante jusqu'à nuire parfois à ma santé physique et surtout psychologique ? Comment je peux dédier tous ces moments de vulnérabilité, d'échecs et de souffrances ? Comment je peux dédier ma solitude dans un pays qui n'est pas le mien, parmi des gens qui ne sont pas mes proches ? Comment je peux dédier toutes ces larmes, ces déceptions et manque de confiance ? Quand j'ai commencé ma thèse, je n'ai jamais cru que je vais passer 5 longues années pendant les quelles j'ai perdu mes bien aimées, ma jeunesse et plein d'amis. Quand j'ai commencé ma thèse, je n'ai jamais cru que ma sœur ne sera pas là pour applaudir mon succès. Quand j'ai commencé ma thèse, je n'ai jamais cru que toute ma vie sera résumée dans ce manuscrit de quelques pages.

Oui, une thèse nuit gravement à la santé, car au cours d'une thèse tu perds les personnes que tu aimes les plus ; au cours d'une thèse tu rates les années et les moments les plus importants dans ta vie et tu te trouves juste avec un diplôme de plus.

Mais, j'ai adoré cette étape de ma vie, j'en ai retiré plein de plaisir, d'aventure et d'amour. Je me suis sentie complètement transformée et grandie par cette expérience. Une étape qui a enrichi ma personnalité et mes connaissances professionnelles considérablement. Une thèse c'est tout ça ; une dualité de chagrin, de plaisir et d'enrichissement. Alors je dédie mes moments du bonheur, de souffrance, du succès, d'échec, d'amour, de déception ; je dédie ma thèse à...

A mes Chers Parents

« L'honneur que vous rendrez à vos parents assurera le bonheur de votre vie. »

Pendant mes moments de faiblesses la seule chose qu'elle fallu faire c'était de parler avec vous, vous imaginer et se rappeler de vos paroles. Vous êtes ma source inépuisable de tendresse, de patience et de force. Vos prières m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie. Aucune parole, aucun remerciement ne pourrait traduire mes sentiments et ma profonde reconnaissance. Je sais que vous êtes toujours fiers de moi, même si au fond je vois votre inquiétude vis-à-vis mon futur. J'espère ne jamais vous décevoir, ni trahir votre confiance et vos sacrifices.

Puisse Dieu tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et
bonheur.

A la mémoire de ma chère sœur

**« Une sœur est un cadeau pour le cœur, un ami pour l'esprit, un fil d'or au sens
de la vie. »**

Comment puis-je oublier ce coin de paradis ? Ce petit bout de terre ; Où vit encore ma sœur. Moi j'ai perdu mon fil d'or mais comment puis-je oublier ? Je n'oublierai jamais tes paroles, ton sourire et ton humeur. Tu me manques mon aimable sœur, mais je sens toujours ta présence dans ma vie. Ton amour était et il est encore ma source de joie et stabilité. Depuis mon enfance, tu as partagé avec moi les meilleurs moments de ma vie, aussi bien que les plus difficiles. Tu étais toujours à mes côtés. Tu m'as promis que tu seras là le jour de ma soutenance, que tu vas t'occuper de tous, mais Dieu a décidé autrement.

Que le seigneur t'accorde la paix éternelle et t'accueille dans son paradis.

A Mes Frères

« C'est dans le malheur que vous apprenez à connaître votre frère. »

Vous étiez à mes côtés pendant toutes les étapes de ce travail. Même si vous ne m'en avez pas montré, je savais que vous étiez toujours à mes côtés et que je puisse compter sur vous. Aucune dédicace ne peut exprimer ma profondeur de reconnaissance et l'affection que j'ai à votre égard. Que Dieu le puissant vous protège, et renforce notre fraternité.

Je vous souhaite une heureuse vie pleine de bonheur.

A Mon Fiancé

« Love is patient, love is kind. It does not envy, it does not boast, it is not proud. It does not dishonor others, it is not self-seeking, it is not easily angered, it keeps no record of wrongs. Love does not delight in evil but rejoices with the truth. It always protects, always trusts, always hopes, always perseveres. »

Mon amour, dès notre rencontre j'ai su que tu es mon âme sœur, ma moitié. Avant toi personne n'a pu me procurer autant d'amour et de joie. Ton sourire, c'est mon bonheur. Tu es mon miracle que j'ai toujours prié Dieu pour l'avoir. Certes que tu étais un vrai soutien pour moi. Je te dédie ce travail en témoignage de mon grand amour et respect. Pour tes conseils et ton soutien moral.

Tu es ma vie !!!

A toute ma grande famille, mes nièces et mes neveux

Je sais que je n'étais pas toujours là pour vous et que la thèse a pris la plupart de mon temps, mais cela n'a jamais changé mon amour et mes sentiments envers vous. On sera bientôt réunies et j'espère compenser tous ces moments qu'on n'a pas vécus.

Que Dieu accomplisse vos vœux et vous garde.

A Tous Mes Amis, collègues et colocataires

« L'amitié est un feu qui éclaire l'esprit et qui réchauffe sans jamais brûler. »

Il me serait difficile de vous citer tous, mais vous êtes tous dans mon cœur. Vous êtes les personnes qui ont vu le plus mes moments de faiblesse et de désespoir. Si j'ai pu arriver aujourd'hui à ce que je suis c'est grâce à votre encouragement. Vous avez illuminé ma vie et vous ne saisissez pas de me soutenir. Je serai toujours fidèle.

J'espère que ce travail pourra vous exprimer mon profond amour.

A Tout Ceux Qui Me Sont Chers

Je vous aime

Remerciement

A mon cher encadrant **Chokri Mhiri**, chef du service de neurologie du CHU Habib Bourguiba Sfax et directeur du Laboratoire de recherche en Neurogénétique, maladie de Parkinson et maladies cérébro-vasculaires, pour le grand honneur qu'il m'a fait en acceptant de me confier ce travail. Vous êtes et vous serez toujours mon idole et ma source de motivation. Vous étiez beaucoup plus qu'un encadrant pour moi, vous êtes la personne avec laquelle je peux discuter tous mes idées, mes problèmes et mes soucis en toute liberté et confiance. J'ai trouvé en vous non seulement la compétence et l'aide scientifiques, mais également des qualités humaines agréables. Veuillez trouver dans ce travail mon témoignage de reconnaissance pour votre soutien, bienveillance et disponibilité. Qu'il me soit permis de vous remercier et de vous exprimer mon estime et profond respect.

A **Alexis Brice**, directeur de l'institut de cerveau et de la moelle épinière Paris, pour m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire. Que vous trouvez ici mes sincères respects et ma profonde gratitude.

A mon co-encadrant **Giovanni Stevanin**, Professeur à l'institut de cerveau et de la moelle épinière Paris, pour la bienveillance et la sympathie avec laquelle vous m'avez accueilli. Les mots semblent être assez pauvres pour exprimer ma reconnaissance pour votre patience, soutien et disponibilité. Je sais que c'était compliqué (comme vous m'avez dit une fois), mais finalement on est la grâce à vos efforts et encouragements. Veuillez accepter ma profonde gratitude pour l'aide considérable que vous m'avez apporté.

A ma directrice de thèse **Suzanne Lesage**, Ingénieur de recherche à l'institut de cerveau et de la moelle épinière Paris, pour m'avoir accepté dans son équipe et pour

m'avoir donné l'opportunité de travailler sur divers projets. Les connaissances, l'orientation et les conseils laborieux que vous m'avez accordés, ont été un vrai apport le long de ce travail et pour ma continuation. Je vous exprime ici toute ma reconnaissance envers tout ce que vous avez fait pour finaliser ce travail.

A tous les membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse. Vos commentaires et critiques enrichissants m'ont été assez précieux pour approfondir mon travail.

A **Ahmed Rebai**, Professeur au centre de biotechnologie de Sfax, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de ma thèse.

A **Eric Leguern**, Professeur à l'institut de cerveau et de la moelle épinière Paris ;

A **Saber Masmoudi**, Professeur au centre de biotechnologie de Sfax,

Pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

A **Marie-Christine Chartier-Harlin**, directeur de recherche au centre de Recherche Jean-Pierre Aubert, pour avoir accepté d'examiner ma thèse et de faire partie de mon jury de thèse.

A ma chère collègue **Sabrine Rekik**. C'est très agréables de travailler avec une personne comme toi, tes qualités scientifiques et humaines sont précieuses et m'ont été une vraie motivation. Ça me paraît que j'étais tellement en solitude dans notre laboratoire jusqu'à ton arrivée inattendue. Dès notre première discussion j'ai su que j'ai finalement trouvé mon âme sœur. Tu seras la prochaine sur la liste, tu peux compter sur mon aide comme d'habitude. Merci pour l'agréable ambiance de travail et pour tous les moments inoubliables que tu m'as offert.

Aux chercheurs, cliniciens, infirmiers et personnel du service de neurologie du CHU Habib Bourguiba Sfax et du Laboratoire de neurogénétique: **Nouha Bouzid Farhat**,

Mariem Damak, Salma Sakka, Olfa Hdiji, Hanen hadj kacem, Mohamed Amri, Raouia Ayedi, Norhen Essid, Dhekra Troudi. Merci pour votre amitié, votre aide et votre soutien dans les moments difficiles. Merci pour l'ambiance chaleureuse et agréable de travail, pour votre bonne humeur, pour les discussions durant la pause café et les repas. J'espère que l'on continuera encore longtemps à travailler ensemble.

Aux chercheurs et personnel de l'institut de cerveau et de la moelle épinière Paris et spécialement l'équipe « Brice » : **Valérie Drouet, Aude Nicolas, Tatiana Usenko, Marie Josephine Fontenille, Christelle Tesson, Grazia Iannello, Khalid Hamid El Hachimi, Mathilde Mairey, Magali Frah, Liena Elsayed, Ashraf Kambalawy, Lydia Guennec, Marie-Luce Poupinel.**

A **Riadh Gouider**, chef du service de Neurologie du CHU Razi Manouba et tous les chercheurs et cliniciens du service : **Mouna Ben Djebara, Amira Nasri, Zied Landoulsi** qui ont participé avec dynamisme à ce travail. Merci pour la confiance que vous m'avez accordé.

A **Faiza Fakhfakh**, Professeur à la Faculté des Sciences de Sfax, et tous les membres du Laboratoire de Génétique Moléculaire et Fonctionnel et du Laboratoire de Génétique Moléculaire Humaine: **Boudour Khabou, Olfa Alila, Marwa Maalej, Mouna Tabebi, Marwa Ammar, Rahma Felhi, Bochra Benrhouma, Marwa Kharrat, Marwa ben Jdila, Souhir Bouaziz, Rim Chaaben, Fakhri Kallabi, Emna Mkaour**, pour m'avoir encouragé de commencer dès le début et à faire cette thèse. Merci pour vos remarques et suggestions qui m'ont permis d'enrichir mes travaux et d'apporter des améliorations à la rédaction de la mémoire de thèse. J'ai apprécié nos discussions scientifiques mais j'ai adoré également nos moments de défoulement.

Un grand merci plein d'amour et de gratitude à **Radhia Gargouri-Bouزيد**, Professeur à l'Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, pour sa bienveillance. Le titre de docteur m'a paru inabordable sans votre aide précieux.

A tous mes enseignants professeurs et encadrant pendant tous mes 25 ans d'études: (je ne peux pas tout citer mais spécialement **Radhia Gargouri, Mohamed Najib Saidi, Faiza Fakhfakh, Abdelaziz Tlili, Abdellatif Maalej**). Vous faites tous part de ma réussite et de qui je suis ce jour.

Je dis merci à toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Sommaire

Introduction	1
Objectifs	2
Synthèse bibliographique	
A. La maladie de Parkinson	
I. ÉPIDEMIOLOGIE DE LA MALADIE DE PARKINSON.....	3
II. MANIFESTATIONS CLINIQUES.....	4
II.1. L'âge de début de la maladie.....	4
II.2. Les signes cliniques moteurs [18, 19].....	4
II.2.1. AKINESIE.....	4
II.2.2. TREMBLEMENT DE REPOS.....	5
II.2.3. RIGIDITE.....	5
II.2.4. INSTABILITE POSTURALE.....	6
II.2.5. FREEZING.....	6
II.3. Les signes cliniques non-moteurs [24–26].....	7
II.3.1. LES TROUBLES NEUROVEGETATIFS OU DYSAUTONOMIE.....	7
II.3.1.1. Hypotension artérielle orthostatique.....	7
II.3.1.2. Troubles gastro-intestinaux.....	7
II.3.1.3. Les troubles vésico-sphinctériens.....	8
II.3.1.4. Autres troubles neurovégétatifs.....	8
II.3.2. LES TROUBLES SEXUELS.....	8
II.3.3. LES TROUBLES DU SOMMEIL.....	8
II.3.4. TROUBLES COGNITIFS ET DEMENCES.....	9
II.3.5. TROUBLES SENSITIFS ET DOULEUR.....	9
II.3.5.1. Déficits olfactifs.....	9
II.3.5.2. Les troubles visuels.....	10
II.3.5.3. Douleur et troubles somato-sensoriels.....	10
II.3.6. LES TROUBLES PSYCHIATRIQUES.....	10
II.3.6.1. La dépression.....	10
II.3.6.2. L'anxiété.....	11
III.1. Critères de diagnostic.....	12
III.2. Échelles et questionnaires d'évaluation.....	13
III.2.1. EVALUATION DE LA SEVERITE DE LA MALADIE.....	13
III.2.1.1. Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS).....	13
III.2.1.2. Stade de Hoehn et Yahr.....	14
III.2.1.3. Echelle de Schwab et England.....	14
III.2.1.4. Les mouvements anormaux : Echelle AIMS.....	14
III.2.2. EVALUATION DES TROUBLES COGNITIFS.....	14
III.2.2.1. Mini Mental State Evaluation: MMSE.....	14
III.2.2.2. Montreal Cognitive Assessment : MoCA.....	15
III.2.2.3. Batterie Rapide d'Efficiency Frontale : BREF.....	15
III.2.3. EVALUATION DES TROUBLES NEUROPSYCHIATRIQUES.....	15
III.2.3.1. La Geriatric Depression Scale (GDS).....	15
III.2.3.2. Beck Depression Inventory.....	15
III.2.4. EVALUATION DE LA QUALITE DE VIE.....	16
III.2.4.1. Short Form Health Survey: SF-36.....	16
III.2.4.2. Échelles PDQ 39 et PDQ 8.....	16
IV.1. Les ganglions de la base ou les noyaux gris centraux (NGC).....	16
IV.1.1. ORGANISATION ANATOMIQUE.....	16
IV.1.2. MORPHOLOGIE NEURONALE ET NEUROBIOCHIMIE.....	18

IV.1.2.1.	Les neurones du striatum.....	18
IV.1.2.2.	Neurones du pallidum et du locus niger.....	18
IV.1.2.3.	Les neurones des noyaux sub-thalamiques.....	18
IV.1.3.	ROLES DES GANGLIONS DE LA BASE.....	18
IV.1.4.	ORGANISATION FONCTIONNELLE DES GANGLIONS DE LA BASE.....	19
IV.2.	<i>Circuits neuronaux touchés par la maladie de Parkinson</i>	20
V.1.	<i>Dégénérescence neuronale</i>	21
V.1.1.	DEGENERESCENCES DES NEURONES DOPAMINERGIQUES.....	21
V.1.2.	DEGENERESCENCES DES NEURONES NON DOPAMINERGIQUES.....	22
V.1.3.	LES CORPS DE LEWY.....	22
VI.1.	<i>Les facteurs de risque environnementaux [111, 112]</i>	24
VI.1.1.	LES AGENTS TOXIQUES.....	24
VI.1.2.	TRAUMATISMES CRANIENS.....	24
VI.1.3.	LES FACTEURS PROTECTEURS.....	24
VI.2.	<i>Les facteurs génétiques</i>	25
VI.2.1.	LES GENES AUTOSOMIQUES DOMINANTS.....	27
VI.2.1.1.	Le gène Synuclein Alpha : SNCA (PARK1 et PARK4).....	27
VI.2.1.2.	Le gène leucine rich repeat kinase 2: LRRK2 (PARK8).....	27
VI.2.1.3.	Le gène vacuolar protein sorting 35: VPS35 (PARK17).....	29
VI.2.1.4.	Acid beta-glucocerebrosidase : GBA.....	29
VI.2.1.5.	Autres gènes peu ou non répliqués.....	30
VI.2.2.	LES GENES AUTOSOMIQUES RECESSIFS.....	31
VI.2.2.1.	Le gène Parkin (PARK2).....	31
VI.2.2.2.	PTEN-Induced Putative Kinase 1: PINK1 (PARK6).....	32
VI.2.2.3.	Le gène Oncogène DJ1 (PARK7).....	34
VI.2.2.4.	Autres gènes rares.....	34
VIII.1.	<i>Dopa thérapie et agonistes dopaminergiques</i>	36
VIII.2.	<i>Anti cholinergiques</i>	37
VIII.3.	<i>Stimulation cérébrale profonde</i>	37
I.1.	<i>Préhistoire de la Tunisie [266]</i>	38
I.2.	<i>La Tunisie d'aujourd'hui</i>	39
II.1.	<i>Les différents haplogroupes du chromosome Y</i>	40
II.1.1.	L'ARBRE PHYLOGENETIQUE DU CHROMOSOME Y.....	40
II.2.	<i>Distribution à travers le monde des Y-haplogroupes</i>	43
II.3.	<i>Structure génétique de la population Tunisienne révélée par les lignées paternelles</i>	44
I.1.	<i>Recrutement et collecte des données</i>	46
I.2.	<i>Données épidémiologiques</i>	47
I.3.	<i>Données cliniques</i>	48
I.3.1.	AGE DE DEBUT.....	48
I.3.2.	SCORES CLINIQUES.....	48
I.3.2.1.	Score UPDRS III.....	48
I.3.2.2.	Hoehn and Yahr scale.....	49
I.3.2.3.	MMSE.....	49
I.3.2.4.	Beck Depression Inventory.....	49
I.3.3.	TRAITEMENT.....	49
I.3.4.	SYMPTOMES NON MOTEURS.....	50
I.3.5.	CLASSIFICATION DES PATIENTS EN FONCTION DE LA FORME CLINIQUE.....	50
II.1.	<i>Stratégie générale d'étude</i>	51
II.2.	<i>Extraction de l'ADN génomique total à partir du sang</i>	52
II.3.	<i>Criblage de la mutation LRRK2-p.G2019S par Taqman</i>	52
II.4.	<i>Double capture de Target Sequencing et Next Generation Sequencing</i>	53
II.5.	<i>Exome sequencing</i>	56
II.6.	<i>Analyse bio-informatique</i>	56
II.6.1.	ALIGNEMENT DES SEQUENCES ET DETECTION DES VARIATIONS.....	56
II.6.2.	FILTRATIONS ET SELECTION DES VARIATIONS.....	57
II.6.3.	ANALYSE DE LA COUVERTURE ET DES CNVs.....	57
II.6.4.	ANALYSE IN-SLICO DE LA PATHOGENICITE DES VARIATIONS.....	58
II.6.5.	ANALYSE DE L'EFFET DES VARIATIONS SUR LA STRUCTURE DE LA PROTEINE.....	60
II.7.	<i>Validation des CNV par MLPA</i>	60
II.8.	<i>Séquençage de Sanger</i>	61
II.8.1.	AMPLIFICATION PAR REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE (PCR).....	61

II.8.2.	PREPARATION DES PRODUITS DE PCR POUR LE SEQUENÇAGE.....	62
II.8.3.	REACTION DE SEQUENÇAGE	62
II.8.4.	AMPLIFICATION DU GENE GBA	62
II.9.	<i>Etudes des effets fondateurs.....</i>	64
II.9.1.	HAPLOTYPE PORTEUR DE LA MUTATION LRRK2-p.G2019S.....	64
II.9.2.	HAPLOTYPE PORTEUR DE LA MUTATION PINK1-p. Q456*.....	65
II.9.3.	GENOTYPAGE DES MARQUEURS MICROSATELLITES:.....	66
II.10.	<i>Origine ethnique des mutations fondatrices.....</i>	66
II.11.	<i>Analyse des facteurs influençant la pénétrance de la mutation p.G2019S.....</i>	68
II.11.1.	ETUDE DE LA VARIATION RS2421947 DU GENE DNM3	68
II.11.2.	RECHERCHE D'AUTRES VARIATIONS SUR LE GENE LRRK2	68
II.11.3.	EXTRACTION D'ARN	69
II.11.4.	TRAITEMENT DNASE I DE L'ARN TOTAUX	70
II.11.5.	INVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR).....	70
II.12.	<i>PCR Long-range.....</i>	71
II.13.	<i>PCR en temps réel.....</i>	71
II.13.1.	REACTIFS ET REACTION	72
II.13.2.	OPTIMISATION DES CONDITIONS DE LA QPCR.....	74
II.13.3.	CALCUL DE LA QUANTITE RELATIVE DE L'ADN MITOCHONDRIAL.....	75
II.14.	<i>Analyse statistique.....</i>	76
IV.1.	<i>Comparaison des caractéristiques cliniques entre les porteurs et les non-porteurs de la mutation p.G2019S.....</i>	88
IV.2.	<i>Comparaison des caractéristiques cliniques entre les porteurs mâles et femelles de la mutation p.G2019S.....</i>	91
IV.3.	<i>Comparaison des caractéristiques cliniques entre les porteurs de la mutation p.G2019S à l'état homozygote et hétérozygote</i>	92
V.1.	<i>Effet de la variation DNM3 rs2421947 sur l'âge de début.....</i>	95
V.2.	<i>Recherche d'autres variations sur le gène LRRK2.....</i>	96
V.2.1.	ÉTUDE DE LA VARIATION P. S1647T : C.4939T>A	97
V.2.2.	ÉTUDE DE LA VARIATION P.L953L : C.2857T>C.....	98
V.2.3.	ANALYSE DE L'EFFET DE LA VARIATION P.L953L SUR L'EXPRESSION DU GENE LRRK2	100
II.1.	<i>Patient PD-TN-38-12</i>	113
II.2.	<i>Patient PD-TU-60</i>	114
IV.1.1.	LES MUTATIONS IDENTIFIÉES SUR LE GENE PINK1	126
IV.2.	<i>Analyse de l'effet fondateur de la mutation p.Q456*.....</i>	128
II.1.	<i>Le gène MAN2B2 : p.Arg195*</i>	138
II.2.	<i>Le gène ATAD3A : p.Ala264Ser</i>	140
II.3.	<i>Le gène IDE : p.Arg722Trp.....</i>	143
II.4.	<i>Le gène BRE : p.Ser11Cys.....</i>	146
III.1.	<i>Le gène ATXN3</i>	148
III.2.	<i>Le gène HTRA2 : p.Pro239Leu.....</i>	149
III.3.	<i>Le gène MAPT : p.Arg222Ser et p.Pro512His.....</i>	151

Conclusion 154

Perspectives 156

Références bibliographiques

Liste des Figures

Figure 1. Micrographie d'un patient parkinsonien droitier âgé de 58 ans publié par Ling et al... 5	5
Figure 2. Posture d'un patient parkinsonien indiquant les signes moteurs de la maladie [20]..... 6	6
Figure 3. Représentation des signes non-moteurs de la maladie de Parkinson [52]..... 12	12
Figure 4. Anatomie des ganglions de la base [80]..... 17	17
Figure 5. Diagramme schématique de la circuiterie fonctionnelle du système des ganglions de la base présentée par les neuromédiateurs mis en jeu [113]..... 20	20
Figure 6. Physiopathologie de la maladie de Parkinson: circuits neuronaux touchés durant la maladie de Parkinson [112]..... 21	21
Figure 7. Aspect macroscopique du mésencéphale chez un sujet sain et un patient Parkinsonien montrant la dépigmentation du locus niger [96]. 22	22
Figure 8. Corps de Lewy typiques du locus niger chez un patient Parkinsonien [108]..... 23	23
Figure 9. Etiologie et phénotype de la Maladie de Parkinson en fonction de l'âge de début 26	26
Figure 10. Implication du gène <i>LRRK2</i> dans les mécanismes cellulaires [165]..... 28	28
Figure 11. Autophagie des mitochondries endommagées via <i>PINK1</i> et <i>PARK2</i> [238]..... 33	33
Figure 12. Mécanismes moléculaires impliqués dans la pathogénèse de la MP..... 36	36
Figure 13. La répartition géographique des tribus parlant la "chelha" en Tunisie [269]. 39	39
Figure 14. L'arbre phylogénétique du chromosome Y défini par les SNPs caractéristique de chaque haplogroupe[275]. 40	40
Figure 15. Distribution à travers le monde des haplogroupes Y-ADN [272, 273]. 44	44
Figure 16. Répartition géographique de l'haplogroupe E1b1b1b d'origine berbère en Tunisie... 45	45
Figure 17. Répartition géographique des patients. 47	47
Figure 18. Répartition des formes de la MP selon l'âge de début dans notre cohorte. 48	48
Figure 19. Répartition des malades selon les formes cliniques motrices dans notre cohorte classée en se basant sur le score UPDRS-III. 50	50
Figure 20. Stratégie générale de l'étude génétique de la MP dans notre cohorte..... 51	51
Figure 21. Principe de la technique de Taqman utilisée pour la mutation p.G2019S. 53	53
Figure 22. La technique de double capture de Target Sequencing et Next Generation Sequencing utilisée pour le séquençage de 23 gènes impliqués dans la maladie de Parkinson. 55	55
Figure 23. Analyse des résultats de target sequencing sur Polyweb. Les filtres utilisés pour l'analyse sont encadrés en rouge. 57	57
Figure 24. Analyse de la couverture sur PolyDiag et l'équation pour le calcul des CNVs 58	58
Figure 25. Principe de la technique du MLPA utilisée pour la validation des CNVs[308]..... 61	61
Figure 26. Stratégie d'identification des variations p.L953L et p.S1647T pouvant influencer l'âge de début de la maladie chez les patients porteurs de p.G2019S 69	69
Figure 27. Principe de la PCR quantitative en utilisant les agents fluorescent se liant à l'ADN double brin[311]..... 72	72
Figure 28. Cycle thermique de la PCR quantitative..... 74	74
Figure 29. Courbe de fusion du gène ND4 74	74
Figure 30. Les différentes valeurs de la quantité d'ADNmt selon l'âge et le tissu étudié..... 75	75
Figure 31. Localisation de la mutation p.G2019S sur le gène <i>LRRK2</i> 78	78
Figure 32. Fréquence de la mutation p.G2019S parmi les témoins dans différentes populations[326]..... 79	79
Figure 33. Génotypage du sous-haplogroupe E1b1b1b représentatif de l'origine berbère défini par l'ensemble des marqueurs (YAP/PN2/M215/M35/M81). 82	82
Figure 34. Origine ethnique des patients porteurs de la mutation p.G2019S et des témoins sains dans notre cohorte. 83	83

Figure 35. Comparaison de l'âge de début de la MP entre les patients porteurs et non porteurs de la mutation p.G2019S; AAO : Age At Onset.....	88
Figure 36. Comparaison de l'âge de début (AAO) de la MP en fonction du génotype de la variation c.161+22137C>G sur le gène <i>DNM3</i>	96
Figure 37. Comparaison d'âge de début (AAO) en fonction du génotype de la variation p.S1647T : c.4939T>A sur le gène <i>LRRK2</i>	97
Figure 38. Résultats de prédictions in silico de l'effet de la variation p.L953L.....	98
Figure 39. Structure de l'ARN sauvage (A) et muté(B) du gène <i>LRRK2</i> réalisée par Mfold.....	99
Figure 40. Comparaison d'âge de début (AAO) en fonction du génotype de la variation c.2857T>C.....	99
Figure 41. Résultats de séquençage du produit de la RT-PCR des exons 21, 22 et 23 chez un patient porteur de la variation c.2857T>C.....	100
Figure 42. Analyse sur gel d'agarose des produits de la RT-PCR semi quantitative.....	101
Figure 43. Niveau d'expression du gène <i>LRRK2</i> chez 3 patients porteurs de la mutation p.G2019S et de la variation p.L953L en comparaison du témoin sain.....	101
Figure 44. Analyse de la variation c.-68-1G> C sur le gène <i>GBA</i>	103
Figure 45. Les variations exoniques identifiées sur le gène <i>GBA</i>	105
Figure 46. Résultats de la modélisation 3D de la structure sauvage (A) et mutée (B) de la protéine GBA montrant les liaisons hydrogènes interrompues entre les résidus.....	106
Figure 47. Comparaison du niveau de pathogénicité en se basant sur les score fournis par les outils de prédictions in silico montrant que la mutation p.D180G possède les scores de pathogénicité les plus élevés suivit de la mutation p.A215V puis p.L483P.....	108
Figure 48. Ensemble de variations sur le gène <i>LRRK2</i> et leurs localisations sur la protéine. ..	109
Figure 49. Ensemble des CNVs identifié à l'état homozygote sur le gène <i>PARK2</i>	113
Figure 50. Identification de la triplication des exons 5-7 sur <i>PARK2</i> par PolyDiag et MLPA. .	114
Figure 51. Identification de la délétion de l'exon 7 sur <i>PARK2</i> par PolyDiag et MLPA.	115
Figure 52. Identification de la mutation hétérozygote composite sur le gène <i>SYNJI</i>	117
Figure 53. Analyse in-silico de la variation p.Lys1321Glu.....	119
Figure 54. Ensemble de variations confirmé pathogènes identifié à l'état homozygote ou hétérozygote composite sur le gène <i>PINK1</i>	126
Figure 55. Filtrés utilisés et stratégie d'analyse des résultats d'exome pour les familles consanguines.....	130
Figure 56. Analyse des résultats d'exome et identification des gènes candidats.....	131
Figure 57. Réseau d'interaction des gènes candidats avec les gènes impliqués dans la MP.....	138
Figure 58. Variation identifiée sur le gène <i>MAN2B2</i>	140
Figure 59. Variation identifiée sur le gène <i>ATAD3A</i>	141
Figure 60. Analyse de la variation c.790G>T/ p.Ala264Ser identifiée sur le gène <i>ATAD3A</i> ...	143
Figure 61. Analyse de la variation c.2164C>T/ p.Arg722Trp identifiée sur le gène <i>IDE</i>	144
Figure 62. Variation identifiée sur le gène <i>IDE</i>	145
Figure 63. Variation identifiée sur le gène <i>BRE</i>	148
Figure 64. Mécanisme de pathogénicité liée à l'expansion CAG sur le gène <i>ATXN3</i>	149
Figure 65. Représentation de la protéine HTRA2 et son activité.....	150
Figure 66. La protéine tau et son implication dans la maladie de Parkinson.....	152

Liste des Tableaux

Tableau 1. Les données démographiques et épidémiologiques de notre cohorte.....	47
Tableau 2. Description des logiciels de prédiction in-silico utilisés.....	59
Tableau 3. Programme de PCR Touch-Down pour l'amplification du gène <i>GBA</i>	63
Tableau 4. Séquences d'amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage du gène <i>GBA</i>	64
Tableau 5. Séquences d'amorces utilisées pour l'identification de l'haplotype p.G2019S.....	64
Tableau 6. Séquences d'amorces utilisées pour l'identification de l'haplotype p.Q456*.....	65
Tableau 7. Amorces utilisées pour l'amplification des différents haplogroupes.....	67
Tableau 8. Amorces utilisées pour l'amplification des variations identifiées sur <i>LRRK2</i>	69
Tableau 9. Amorces utilisées pour la RT-PCR.....	70
Tableau 10. Amorces utilisés pour l'amplification par la PCR Long-range.....	71
Tableau 11. Amorces utilisées pour la recherche des déplétions par PCR quantitative.....	73
Tableau 12. Les données fournies par les courbes de standard correspondant à chaque couple.....	75
Tableau 13. Haplotype commun identifié chez tous les patients porteurs p.G2019S.....	80
Tableau 14. Les études antérieures qui ont étudié l'haplotype 1 porteur de la p.G2019S.....	80
Tableau 15. Caractéristiques démographiques et cliniques des porteurs et non porteurs de la mutation <i>LRRK2</i> -p.G2019S.....	89
Tableau 16. Caractéristiques démographiques et cliniques des porteurs mâles et femelles de la mutation p.G2019S.....	91
Tableau 17. Caractéristiques démographiques et cliniques des porteurs de la mutation p.G2019S à l'état homozygote (HMZ) et hétérozygotes (HTZ).....	93
Tableau 18. Les variations identifiées en commun entre les 3 patients sur le gène <i>LRRK2</i> et leurs fréquences dans les bases de données.....	97
Tableau 19. Prédictions de la pathogénicité des variations exoniques identifiées sur le gène <i>GBA</i> en utilisant différents outils de prédiction in-silico.....	104
Tableau 20. Données démographiques et cliniques des patients porteurs des mutations <i>GBA</i>	108
Tableau 21. Prédictions de la pathogénicité des variations exoniques identifiées sur le gène <i>LRRK2</i> en utilisant différents outils de prédiction in-silico.....	110
Tableau 22. Caractéristiques cliniques des porteurs des mutations sur le gène <i>LRRK2</i>	112
Tableau 23. Prédictions de la pathogénicité des variations exoniques identifiées sur le gène <i>PINK1</i> en utilisant différents outils de prédiction in-silico.....	127
Tableau 24. Caractéristiques démographiques et cliniques des patients porteurs des mutations sur le gène <i>PINK1</i>	128
Tableau 25. Haplotype de la mutation p.Q456* à l'état homozygote.....	129
Tableau 26. Les variations identifiées après analyse des résultats d'exome.....	132
Tableau 27. Les gènes candidats validés et leurs fonctions.....	135
Tableau 28. Prédiction in silico de la pathogénicité des variations sur le gène <i>MAPT</i>	151

INTRODUCTION

La maladie de Parkinson (MP) est la deuxième maladie neuro-dégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer, avec une prévalence qui augmente avec l'âge. La forme idiopathique de cette maladie débute en moyenne vers 60 ans. Toutefois, près de 10% des patients développent leurs premiers symptômes avant l'âge de 40 ans. La présence de plusieurs cas familiaux avec un âge de début de la maladie très précoce a permis d'identifier plusieurs loci mendéliens liés aux formes héréditaires autosomiques récessives et dominantes de la MP. Cependant, chez près de 50% des formes familiales et plus de 80% des formes sporadiques avec un début de maladie précoce, aucune mutation dans ces gènes connus n'a été détectée, suggérant une hétérogénéité génétique avec l'implication probable de plusieurs autres gènes. L'identification de ces nouveaux gènes associés aux formes monogéniques de la MP, est beaucoup plus pertinente dans les formes consanguines provenant d'une population de même origine géographique, supposée génétiquement homogène.

En Tunisie, la prévalence des troubles neuro-dégénératifs, y compris la MP, est plus élevée que dans la plupart des autres pays. Dans cette région, les grands pedigrees, les faibles taux de migration et les taux élevés de consanguinité, augmentent le risque des maladies autosomiques récessives. Cette particularité fait de ce pays une source potentielle de recrutement des formes monogéniques de la MP, facilite l'établissement des corrélations génotype-phénotype et l'identification des nouveaux gènes impliqués.

La collaboration dans le cadre d'un projet CMCU-PHC UTIQUE entre le Laboratoire de Recherche Neurogénétique Maladie de Parkinson et Maladie Cérébro-Vasculaire au C.H.U Habib Bourguiba Sfax et l'Institut de cerveau et de la moelle épinière, Paris, France nous a permis d'entamer l'étude clinique et génétique de la maladie de Parkinson dans la population Tunisienne. Ainsi, nous avons recruté 250 patients atteints de la MP et suivis dans le service de Neurologie. Cela est dans l'objectif d'étudier les caractéristiques épidémiologiques, cliniques et génétiques du parkinsonisme Tunisien.

Objectifs

L'objectif général des travaux présentés dans cette thèse était d'étudier la structure génétique de la maladie de Parkinson en Tunisie à partir d'une cohorte de 250 patients. Ces patients sont tous d'origine Tunisienne et ont été recrutés de manière aléatoire par le service de Neurologie du C.H.U Habib Bourguiba de Sfax et le service de Neurologie du C.H.U Razide La Manouba.

Le premier volet de ce projet consistait à cribler les 22 gènes connus dans la MP et pratiquer l'analyse bio-informatique et fonctionnelle des nouvelles mutations identifiées.

Vu la fréquence importante dans notre cohorte des patients porteurs de la mutation p.G2019S du gène *LRRK2*, le deuxième objectif de nos travaux était de mieux caractériser le phénotype clinique associé à cette mutation et l'établir des corrélations génotype phénotype. Les résultats de cette étude ont une importance majeure concernant le pronostic pour ces formes et peut influencer la prise en charge médicale.

Comme la sévérité ? du phénotype et l'âge de début de la MP chez les porteurs de cette mutation étaient relativement différents d'un patient à un autre, notre troisième objectif était l'identification des facteurs génétiques qui peuvent influencer la variabilité d'expression de cette mutation. Nous nous sommes intéressés aussi à la recherche d'effet fondateur et de l'origine ethnique des deux mutations les plus fréquentes dans notre population (*LRRK2*-p.G2019S et *PINK1*- p.Q456*) dans le but d'étudier l'effet de l'origine et l'histoire de la population Tunisienne sur la structure génétique de la maladie de Parkinson. Enfin, la dernière partie du projet avait pour objectif d'identifier de nouveaux gènes responsables de MP par exome sequencing chez des patients consanguins ayant un âge de début de la maladie inférieur à 40 ans.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

A. La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson (MP) a été décrite pour la première fois en 1817 par "James Parkinson" initialement comme «une paralysie tremblante » dans sa monographie intitulée «An essay on the shaking palsy» à propos de 6 cas [1]. James Parkinson a donné les caractéristiques du tremblement de repos, des anomalies de la posture et de la marche, de la paralysie et de la diminution de la force musculaire, ainsi que la manière dont la maladie évolue au cours du temps. En 1868, c'est avec les médecins "Armand Trousseau" et "Alfred Vulpianque", que "Jean-Martin Charcot" formalise la triade classique des symptômes de la maladie : la rigidité musculaire, le tremblement de repos, la rareté et la lenteur des mouvements (bradykinésie) [2]. En 1877, "Charcot" a critiqué le terme de paralysie qu'il trouvait inapproprié et a proposé l'appellation de « maladie de Parkinson» [3].

I. Épidémiologie de la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson (MP) est la deuxième maladie neuro-dégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer [4]. Sa prévalence augmente avec l'âge et peut varier selon la localisation géographique et le sexe [5, 6]. Avec une prévalence allant de 41 pour 100 000 dans la quatrième décennie de la vie à plus de 1900 pour 100 000 dans les personnes de plus de 80 ans [4, 5, 7]. En effet, la méta-analyse des données mondiales a montré une prévalence croissante de la MP avec l'âge (tous pour 100 000): 41 en 40 à 49 ans; 107 dans 50 à 59 ans; 173 dans 55 à 64 ans; 428 en 60 à 69 ans; 425 de 65 à 74 ans; 1087 en 70 à 79 ans; et 1903 chez les plus de 80 ans [5].

Le rapport d'incidence annuelle homme/femme, ajusté selon l'âge, variait d'environ 1 à 2, avec une médiane de 1,5 [8, 9]. Cependant, il y avait une hétérogénéité dans ce rapport, avec un ratio hommes/femmes plus élevé dans les populations plus âgées. Une différence significative de la prévalence selon le sexe n'a été observée que pour les individus de 50 à 59 ans [5]. L'incidence est similaire chez les hommes et les femmes de moins de 50 ans (rapport M/F <1,2), et elle est 1,6 fois plus élevée chez les hommes que chez les femmes de plus de 80 [10]. L'explication de ces observations est incertaine. L'interprétation la plus simpliste c'est qu'il existe des effets potentiellement protecteurs de l'œstrogène ou des effets nocifs de la testostérone sur le développement de la MP. En fait les femmes atteintes de la MP étaient plus susceptibles d'avoir subi une hystérectomie ou une ovariectomie que celles qui n'avaient pas développé la MP, soutenant le rôle protecteur de l'œstrogène [11, 12]. Toutefois, si

l'œstrogène était la seule cause, le rapport hommes/femmes serait probablement plus élevé dans les populations plus jeunes que dans les populations plus âgées. Une autre possibilité relativement simpliste est qu'il existe un gène de susceptibilité récessif sur le chromosome X, ce qui confère un risque accru chez les hommes. D'une autre part, le mode de vie masculin qui prédispose à d'autres expositions qui sont des facteurs de risque de la MP peut expliquer aussi cette prédominance masculine.

Une différence significative a été aussi observée dans la prévalence par localisation géographique allant de 35,8/100 000 à 12 500/100 000 entre la Chine, l'Asie et l'Europe [7]. Dans les pays du Golf, la prévalence varie entre 27 et 37/100 000 [13], alors qu'elle est beaucoup moins en Afrique de Sud (7-20/100 000) [14, 15]. En Tunisie, cette prévalence semble être la plus élevée en Afrique et augmente jusqu'à 43/100 000 [16].

II. Manifestations cliniques

II.1. L'âge de début de la maladie

L'âge de début (AAO) de la maladie est généralement entre 50 et 69 ans dans 51 % des cas ou supérieur à 70 ans dans 39% des cas [17]. Par contre, 10-20% des patients sont touchés par les premiers symptômes avant 50 ans. On parle alors de maladie de Parkinson à début précoce. Dans de très rares cas, le trouble apparaît avant 20 ans ; c'est ce qu'on appelle la maladie de Parkinson juvénile [17]. Pour ces cas, le diagnostic clinique peut être étayé par l'analyse génétique et la recherche des causes héréditaires.

II.2. Les signes cliniques moteurs [18, 19]

II.2.1. Akinésie

L'akinésie est la difficulté d'initiation des mouvements volontaires mesurée par un temps de réaction. Dans la MP, l'akinésie se combine au ralentissement des mouvements (bradykinésie) et à la réduction de la mobilité automatique et volontaire (hypokinésie). L'akinésie parkinsonienne est caractérisée par le démarrage difficile de la marche avec de petits pas associée à la perte du balancement d'un bras, le dos courbé en avant et le cou raide [20]. On peut aussi observer une perte de la mimique gestuelle des membres supérieurs lors d'une conversation. Le visage présente des traits figés, un regard fixe (rareté du clignement palpébral) et peu expressifs (les sentiments ne s'expriment plus sur le visage). Au début de la maladie, la voix peut être altérée avec une parole monotone d'intensité plus faible. Ces pertes poussent le parkinsonien à penser chacun de ses gestes. Au final, la réalisation simultanée de deux actions différentes devient difficile. L'akinésie se remarque souvent précocement durant

l'écriture, qui devient de taille réduite (micrographie). Elle apparaît de façon progressive des années avant l'apparition des autres signes moteurs de la maladie [21] (Figure 1).

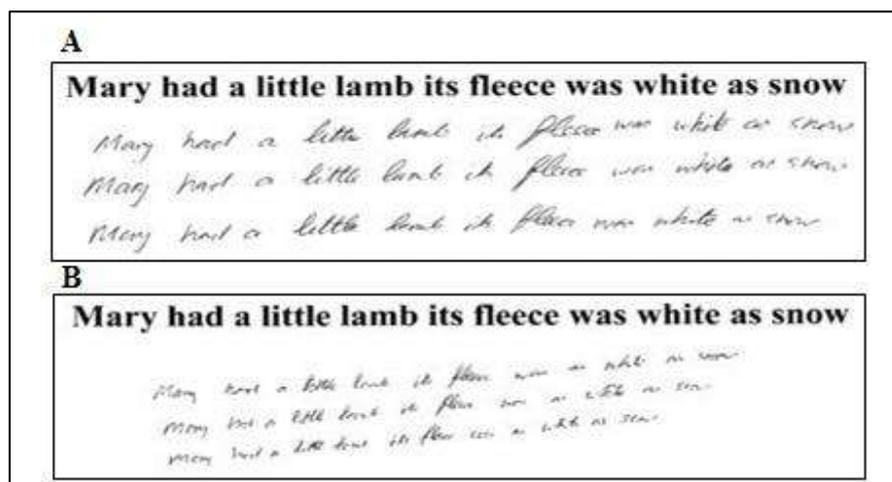


Figure 1. Micrographie d'un patient parkinsonien droitier âgé de 58 ans publié par Ling et al. [47].
A : sous traitement, B : sans traitement.

II.2.2. Tremblement de repos

Dans 60 à 70% des cas, le signe initial de la MP est le tremblement de repos qui est initialement ressenti comme une sensation de vibration interne puis devient visible et manifeste. Suivant les cas, il peut apparaître ou être majoré en cas de stress, de fatigue, ou d'une concentration mentale forte (calcul mental). Le tremblement est unilatéral au départ, ou très asymétriques s'il est bilatéral. Il débute classiquement à l'extrémité distale du membre supérieur mais peut apparaître au niveau du pied ou de la tête (lèvres, mâchoire, langue). Ce tremblement est présent au repos lorsque le segment de membre se retrouve en position de relâchement musculaire complet. Il se produit sous forme d'oscillations rythmiques régulières de faible amplitude ayant un rythme lent (4 à 6 cycles par seconde). Par contre, il disparaît lors de l'exécution de mouvements volontaires pour réapparaître quelques secondes.

II.2.3. Rigidité

La rigidité ou (hypertonie), est caractérisée par une résistance accrue à la mobilisation passive des membres, généralement accompagné du phénomène de la "roue dentée". Elle peut être au niveau du cou, épaules, hanches ou aux niveaux des poignets et les chevilles. Ces membres conservent à la fin du mouvement l'attitude exercée, ce qu'on appelle rigidité en « tuyau de plomb ». Ceci a tendance à donner au patient une attitude fléchie et penchée en avant. La rigidité parkinsonienne est de type plastique qui se renforce par les mouvements volontaires du membre controlatéral (connu sous le nom de la manœuvre de Froment).

II.2.4. Instabilité posturale

L'instabilité posturale est due à la perte des réflexes posturaux et se manifeste généralement au cours des derniers stades de la maladie. La longue période de latence avant l'apparition des chutes différencie la MP d'autres troubles neurodégénératif. En effet la période moyenne de l'apparition de la première chute est de 108 mois chez les patients parkinsoniens comparé à 16,8 et 42 mois, chez les patients avec paralysie supra-nucléaire progressive (PSP) et atrophie multi-systématisée (MSA) respectivement [22]. Le test de traction, dans lequel le patient est rapidement tiré vers l'arrière ou vers l'avant par les épaules, est utilisé pour évaluer le degré de rétropulsion ou de propulsion, respectivement. Prendre plus que de deux pas en arrière ou l'absence de toute réponse posturale indique une réponse posturale anormale. L'instabilité posturale est la cause la plus fréquente des chutes.

II.2.5. Freezing

Le freezing, également appelée bloc moteur, correspond à une dyskinésie touchant le plus souvent les jambes pendant la marche, mais les bras et les paupières peuvent aussi être impliqués. Il se manifeste généralement comme une incapacité de bouger de façon soudaine et transitoire (habituellement, 10 s). Cela peut inclure une hésitation au début de la marche ou l'interruption brutale de la marche dans des situations spécifiques. Bien que le freezing soit une caractéristique motrice de la MP mais elle se produit seulement chez environ 47% des patients [23]. Il se produit plus fréquemment chez les hommes que chez les femmes et moins fréquemment chez les patients dont le symptôme principal est le tremblement [23].

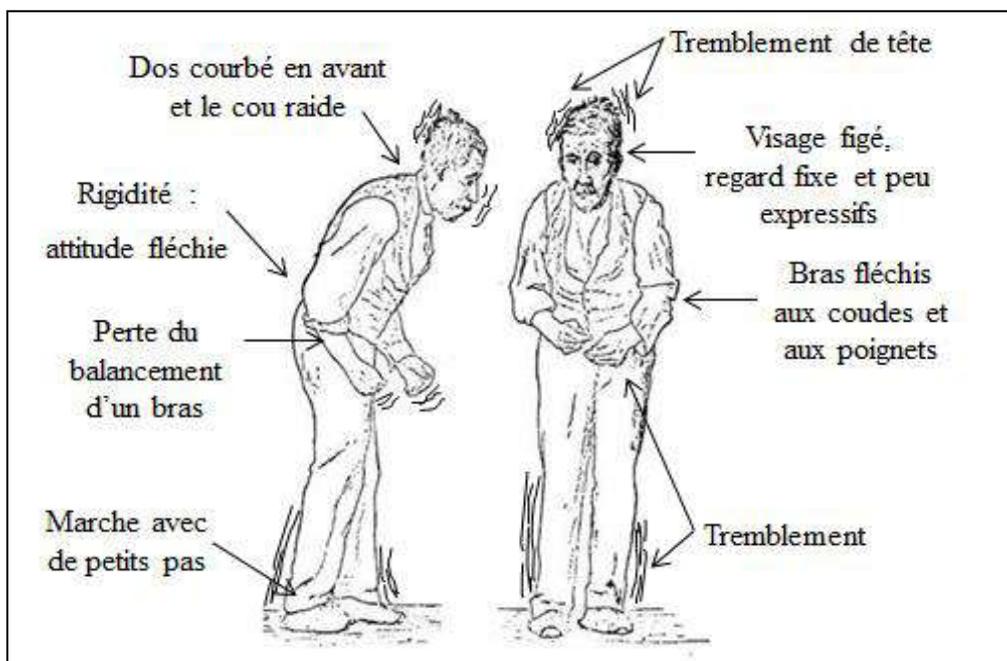


Figure 2. Posture d'un patient parkinsonien indiquant les signes moteurs de la maladie [20].

II.3. Les signes cliniques non-moteurs [24–26]

Avant que les symptômes moteurs apparaissent et que le diagnostic soit posé, les patients peuvent présenter divers symptômes pré-moteurs tels que les troubles de sommeil, l'apathie, la constipation, fatigue, troubles de mémoire, transpiration excessive, douleurs et troubles sensorielles. Dans 60-70% des cas, ces symptômes non-moteurs peuvent survenir jusqu'à des stades très précoces et même dès 10 ans ou plus avant le diagnostic [27]. La dépression et l'anxiété peuvent également survenir longtemps avant que le diagnostic soit fait [28].

II.3.1. Les troubles neurovégétatifs ou dysautonomie

Les problèmes neurovégétatifs affectent la vie quotidienne de plus de 50% des patients [29]. Ceux-ci résultent de l'extension des lésions aux niveaux du système nerveux central et post-ganglionnaire périphérique [29]. Les fonctions les plus touchées sont les fonctions cardiovasculaires, digestives, respiratoires et vésico-sphinctériennes avec pour conséquence des handicaps et une altération de la qualité de vie des patients et de leur entourage. Ces troubles sont aggravés et majorés par les traitements antiparkinsoniens

II.3.1.1. Hypotension artérielle orthostatique

Hypotension artérielle orthostatique affecte entre 30-40% des patients parkinsoniens. Ceci est défini comme la chute de la pression artérielle systolique d'au moins 20 mm Hg ou de la pression artérielle diastole d'au moins 10 mm Hg lors d'un changement de position trop rapide et du passage à la position orthostatique debout ou inclinaison verticale de la tête à au moins 60 degrés pendant 3 minutes minimum [30]. Dans la MP, la chute de la pression sanguine peut durer plusieurs minutes et peut entraîner des vertiges, les troubles visuels et la cognition altérée qui peuvent précéder une perte de conscience [29].

II.3.1.2. Troubles gastro-intestinaux

Les troubles gastro-intestinaux sont fréquents et sont surtout représentés par des gastro-parésies, des constipations et des troubles de la déglutition. Les patients peuvent également éprouver des difficultés dans l'évacuation rectale en raison de dysfonction du sphincter rectal. Le retard de vidange ralentit de plus l'absorption du traitement et donc nuit à son efficacité [31]. L'autopsie chez les patients parkinsoniens a montré la présence des corps de lewy, caractéristique de la MP, dans les neurones entériques le long du tractus gastro-intestinal, de l'œsophage au côlon [32]. La constipation est le trouble gastro-intestinaux le plus fréquent qui touche entre 70-80% des cas [33] et peut précéder les symptômes moteurs [34].

II.3.1.3. Les troubles vésico-sphinctériens

Ces troubles sont présents chez environ 25-50% des cas [35] et ils marquent généralement une évolution dans la sévérité de la MP [36]. Ils sont provoqués par des perturbations des mécanismes de la miction contrôlés par le système nerveux. L'hyperactivité du détrusor est l'anomalie urodynamique la plus fréquente, produisant le besoin urgent et fréquent d'avoir à vider sa vessie, accompagné d'une incontinence d'urine (le patient est incapable de se retenir et d'arriver aux toilettes à temps) [29].

II.3.1.4. Autres troubles neurovégétatifs

L'hyperhidrose (transpiration excessive) est plus fréquente chez les patients qui présentent des fluctuations motrices (dyskinésie), mais ne semble pas corrélée avec la durée de la maladie [37]. Il peut également y avoir des symptômes dermatologiques tels que la kératose séborrhéique dermatologique faciale qui sont des tumeurs épithéliales bénignes. Aussi l'hyperhidrose qui est fréquente au niveau du cuir chevelu, du cou et de la face a été rapportée chez 18,6% des patients [38]. D'autre part, la sécrétion salivaire semble être réduite chez les patients malgré que les problèmes fréquents du stade avancé de la MP est l'hyposialorée. L'hyposialorée est due à une diminution des mouvements automatiques de déglutition, une incontinence labiale [39].

II.3.2. Les troubles sexuels

Les troubles sexuels sont peu mentionnés durant les consultations et de fait sous-estimés et ils sont moins étudiés. Par contre plus de 79% des hommes atteints par la MP présentent une altération de la fonction sexuelle, notamment une dysfonction érectile, des problèmes d'éjaculation et des difficultés à atteindre l'orgasme [40]. Alors que chez les femmes ça engendre un désir sexuel faible et une difficulté avec l'excitation et l'orgasme [40]. La sexualité chez le Parkinsonien est gênée par les syndromes extrapyramidaux (tremblement, akinésie, hypertonie, mouvements involontaires).

II.3.3. Les troubles du sommeil

Les troubles du sommeil et de la vigilance affectent 70% des patients atteints de la MP [41]. La prévalence de ces troubles augmente avec la durée de la maladie [42]. Ces troubles sont dû à l'affection des structures anatomique et les neurotransmetteurs centraux qui modulent le cycle de sommeil physiologique aussi bien que l'effet secondaire de certains traitement parkinsonien [43]. Dans la majorité des cas, les troubles de sommeil s'expriment sous la forme d'une insomnie incluant la fragmentation du sommeil, l'éveil fréquent et prolongé, le trouble du comportement en sommeil paradoxal, les mouvements périodiques des membres, le

syndrome des jambes sans repos et l'akathisie [44]. La fragmentation du sommeil gêne le déroulement de la journée suivante avec l'apparition d'une somnolence diurne. La somnolence diurne touche environ 50% des cas parkinsoniens [45] et peut être induite par les traitements médicamenteux comme les agonistes dopaminergiques ou les antidépresseurs [46]. Elle est plus fréquente chez les patients en stade tardif ou chez les patients souffrant de troubles cognitifs, de dépression ou d'anxiété [45]. Le syndrome des jambes sans repos s'exprime par des douleurs, des brûlures, des paresthésies, ou des crampes au niveau des mollets et des cuisses avec une envie impérieuse de bouger les membres inférieurs. Le patient n'arrive à se calmer alors qu'en marchant. Cette affection touche 20 % des patients et consiste en une secousse rythmique des membres inférieurs pendant le sommeil [25].

II.3.4. Troubles cognitifs et démences

Les troubles cognitifs peuvent se développer à des stades précoces de la maladie sans s'aggraver à une démence [47]. La principale caractéristique de ce syndrome cognitif précoce est une altération de la fonction exécutive incluant les troubles de la mémoire, de la perception, un ralentissement de la pensée, des difficultés à planifier et organiser un comportement orienté et à résoudre des problèmes [48]. Sur le plan physiopathologique, la déficience cognitive précoce est considérée comme un trouble frontostriatal dépendant de la dopamine et pour lequel certains composants peuvent être améliorés par des médicaments dopaminergiques [49]. Alors que, la démence tardive se caractérise par une aggravation prononcée de l'ensemble des troubles cognitifs. Elle survient chez environ 70 % des patients est caractérisée par des perturbations des fonctions visuospatiales avec hallucinations, une aggravation notable des troubles attentionnels et mnésiques et une perte de mémoire sémantique et épisodique [50]. Ces déficits n'ont pas d'origine ganglionnaire basale mais sont associés à une désactivation du cortex frontal secondaire à l'atteinte des structures dopaminergiques sous-corticales [51]. Les patients atteints d'une forme bradykineto-rigide de la MP sont plus susceptibles de développer une démence ultérieure que les personnes qui présentent une forme tremblante [50, 52].

II.3.5. Troubles sensitifs et douleur

II.3.5.1. Déficits olfactifs

La diminution pathologique de l'odorat (hyposmie) et l'abolition complète des perceptions olfactives (anosmie) se développent chez plus de 90% des patients atteints de la MP prédisant l'apparition des signes moteurs [26]. L'anosmie est en rapport avec des lésions du bulbe olfactif, du nerf olfactif antérieur, de l'amygdale et du cortex périorrhinal [53].

II.3.5.2. Les troubles visuels

Les troubles visuels sont relativement fréquents et peuvent toucher jusqu'à 78% des patients et augmente avec la progression de la maladie [54]. Les hallucinations visuelles peuvent empirer, particulièrement avec les agonistes de dopamine [55]. Les hallucinations visuelles peuvent être des hallucinations bénignes qui engendrent des taches lumineuses se déplaçant dans la périphérie du champ visuel, ou des hallucinations visuelles complexes avec des visions de personnages ou d'animaux. Les hallucinations peuvent aussi être auditives, olfactives, ou tactiles [56]. Les hallucinations peuvent avoir un lien avec les troubles de sommeil [57], aussi bien que les troubles cognitifs et la démence et elle présente un bon outil pour la prédiction du déclin cognitif plus tard dans la maladie [58].

II.3.5.3. Douleur et troubles somato-sensoriels

Les changements dans la fonction sensorielle et l'apparition de la douleur sont une caractéristique commune de la MP affectant 30-85% de la population de patients [59]. On peut distinguer cinq types de douleur chez les patients parkinsoniens [59] incluant :

- la douleur musculo-squelettique tel que des crampes, des contractions musculaires (dystonie), des engourdissements et les sensations d'étau. Elle est due à la rigidité parkinsonienne.
- la douleur neuropathique radiculaire qui est la cause d'une lésion des nerfs focaux ou périphériques.
- la douleur dystonique est en rapport avec les médicaments antiparkinsoniens. Elle est due aux contractions musculaires involontaires et prolongées engendrant des attitudes anormales.
- la douleur neuropathique centrale est un symptôme spécifique de la MP et peut être très intense et difficile à traiter (associée aux médicaments antiparkinsoniens).
- l'akathisie qu'est un ensemble de symptômes rappelant le syndrome des jambes sans repos. Les patients souffrent de sensations désagréables les obligeant à bouger et à changer de position sans cesse, ou sont incités à frictionner et à étirer leurs membres.

D'autres changements sensoriels se produisent dans la MP, y compris les paresthésies périphériques, la sensation de brûlure (syndrome de la bouche brûlante) et des sensations de chaleur ou de froid au niveau des extrémités [26].

II.3.6. Les troubles psychiatriques

II.3.6.1. La dépression

La dépression touche 30 à 40 % des patients parkinsoniens à n'importe quel stade de la maladie [60]. Les troubles cognitifs, l'insomnie, la somnolence diurne, la fatigue, la gêne

fonctionnelle et la déficience des activités quotidiennes augmentent le risque de dépression [61]. Le syndrome dépressif détériore la qualité de vie chez le parkinsonien mais montre des caractéristiques distinctes de la dépression majeure non liée à la MP [62]. La dépression dans la MP se traduit par la tristesse, l'irritabilité psychologique, la dysphorie (perturbation de l'humeur), le pessimisme et les idées suicidaires (considérer le suicide sans nécessairement essayer). Par contre, la culpabilité, l'auto-culpabilité, les sentiments d'échec et les tentatives de suicide sont moins courants [63].

Le développement de la dépression dans la MP semble être due à un dysfonctionnement des ganglions de la base et il semble être lié aux déficits dopaminergiques, noradrénergiques et synaptiques sérotoninergiques [62].

II.3.6.2. L'anxiété

L'anxiété est le symptôme neuropsychiatrique le plus fréquent après la dépression et elle est présente chez 20 à 46 % des cas parkinsoniens [64]. Elle se manifeste via une anxiété généralisée, phobie simple, phobie sociale ou des attaques de paniques paroxystiques [64]. L'anxiété est plus fréquente chez les patients de jeune âge, du sexe féminin ou qui présentent des fluctuations motrices, des antécédents d'anxiété. La dépression s'associe souvent à l'anxiété ce qui la rend plus grave [26]. Des études ont montré le risque de développer une maladie de Parkinson est plus importante chez les personnes anxieuses [64]. L'anxiété peut précéder de quelques minutes les fluctuations motrices et la période de l'apparition de freezing, qui sont associées à des périodes de faibles niveaux de dopamine [26].

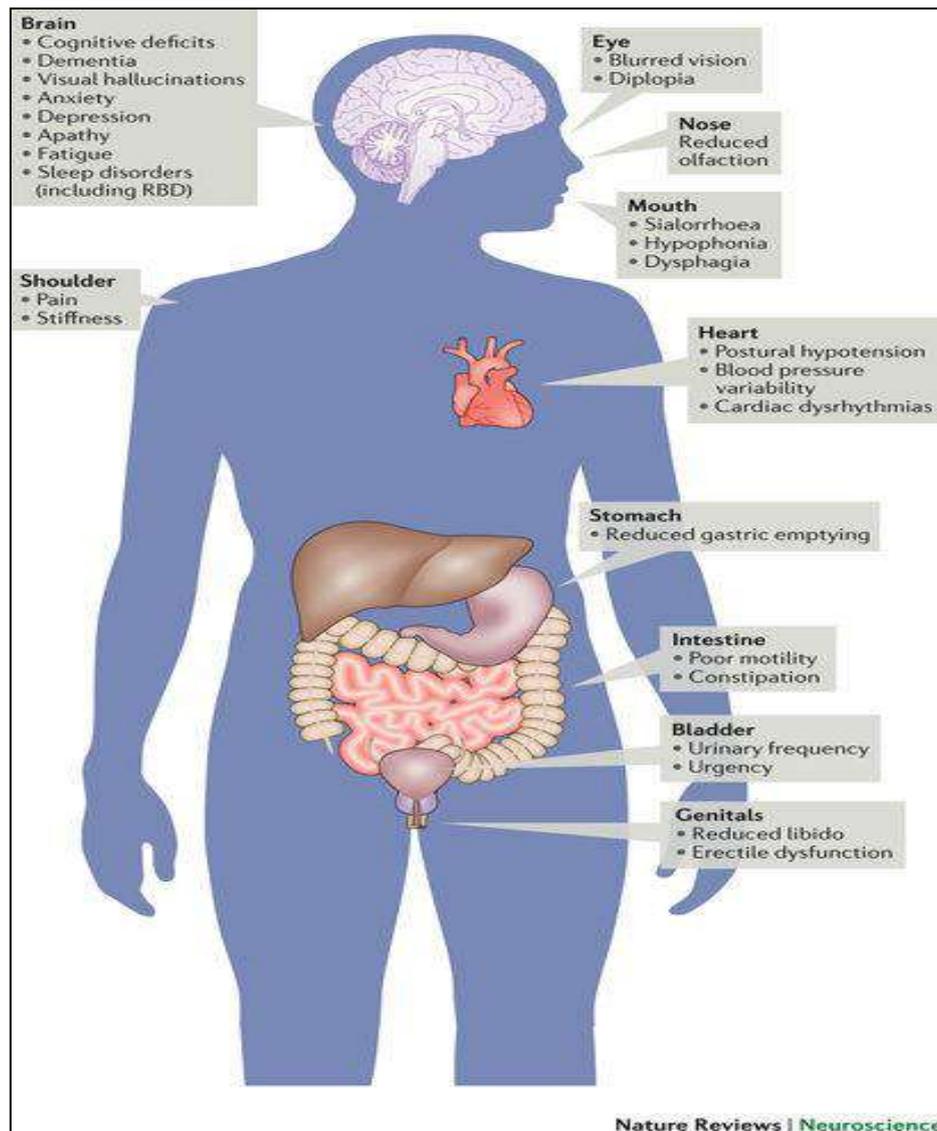


Figure 3. Représentation des signes non-moteurs de la maladie de Parkinson [52].

III. Diagnostic

III.1. Critères de diagnostic

Le diagnostic de la maladie de Parkinson est un examen clinique qui cible les troubles moteurs que présentent ces patients. Le clinicien examine tout d'abord la présence de symptômes moteurs de la maladie : la bradykinésie, le tremblement de repos, la rigidité, l'instabilité posturale et l'asymétrie des symptômes. Par contre plusieurs autres symptômes non-moteurs peuvent être observés. Selon la société internationale de Parkinson et les troubles de mouvements (International Parkinson and Movement Disorder Society : MDS), le premier critère essentiel du diagnostic de la MP est le parkinsonisme, défini comme la bradykinésie, associé au tremblement de repos et la rigidité ou l'un des deux [65]. Ayant établi que le patient présente le parkinsonisme, les critères de la MDS seront appliqués pour confirmer le

diagnostic de la MP et cela par l'élimination des autres causes du parkinsonisme et l'évaluation de la réponse au traitement [66]. Ces causes potentielles de parkinsonisme, incluent : l'intoxication, troubles métaboliques, tumeurs, hydrocéphalies, infarctus lacunaires, infections, maladie de Wilson, paralysie supranucléaire progressive (maladie de Steele-Richardson-Olszewski), atrophie olivo-ponto-cérébelleuse, syndrome de Shy-Drager, ainsi que d'autres troubles neurologiques. La plupart de ces causes sont rares mais peuvent être évoquées par le clinicien lors de présence de signes atypiques chez le patient [66].

III.2. Échelles et questionnaires d'évaluation

La plupart des symptômes moteurs et non-moteurs de la MP sont améliorés par le traitement dopaminergique. Mais certains signes d'inefficacité du traitement ou de mal-tolérance qui marquent le début du déclin cognitif et moteur apparaissent au bout de quelques années d'évolution. La vitesse d'évolution est variable d'une personne à une autre. Elle peut être lente où le patient ressent peu de gêne sans complications motrices et maintient sa vie sociale et professionnelle sans grande difficulté en suivant son traitement durant des années. Au contraire, certaines formes ont une progression rapide où les complications motrices précoces apparaissent même au bout de deux ans avec une majoration rapide du handicap moteur. L'évaluation de cette évolution a nécessité de développer des échelles et des questionnaires efficaces de mesure de l'effet des médicaments ou de la chirurgie.

III.2.1. Evaluation de la sévérité de la maladie

III.2.1.1. Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS)

L'échelle UPDRS (échelle d'évaluation unifiée pour la maladie de Parkinson) est le standard international d'évaluation clinique pour l'ensemble des symptômes de la maladie de Parkinson et des problèmes liés à son traitement (annexe 1) [67]. Il s'agit d'une échelle composite qui recouvre toutes les situations cliniques qui peuvent être observées comportant six sections utilisables séparément. Chaque section comprend un certain nombre d'items.

- Section I : évalue les troubles mentaux à l'aide de quatre items (Total /16).
- Section II : évalue les aspects de l'activité quotidienne et contient 13 items : Parole, salivation, déglutition, écriture, s'alimenter, habillage, hygiène, se retourner dans son lit, chutes, piétinement, marche, tremblement, douleurs. (Total/52).
- Section III : évalue les symptômes moteurs au moment de l'examen sur la base de 27 items (Total /108). Les symptômes sont dits légers pour un score entre 6 et 12, modérés pour un score entre 12 et 30 et sévères pour un score entre 30 et 80.

- Section IV : (11 items) évalue la présence et la sévérité de certaines complications liées au traitement (Total / 23)
- Section V ou stade de Hoehn et Yahr : évalue la sévérité globale du syndrome parkinsonien (5 stades).
- Section VI ou échelle de Schwab et England: apprécie d'une façon globale le degré d'autonomie du patient et le retentissement de le handicap sur la vie quotidienne.

En 2003, sous l'égide de la Movement Disorders Society (MDS), une nouvelle version de l'UPDRS est apparue en gardant les points forts de la version originale et en créant des items supplémentaires. Cette nouvelle version, appelée la MDS-UPDRS, a été mise au point et publiée plus tard [65, 68].

III.2.1.2. Stade de Hoehn et Yahr

Cette échelle à 5 niveaux évalue les manifestations physiques et la sévérité globale de la maladie de Parkinson (annexe 1)[69]. Elle permet de définir le *stade* de la maladie. Le Tableau clinique était léger pour des stades de Hoehn et Yahr entre 1 et 2, modéré pour des stades entre 2,5 et 3 et sévère entre 4 et 5.

III.2.1.3. Echelle de Schwab et England

Cette échelle évalue le degré d'autonomie du patient [70]. L'examineur invite l'individu à choisir la note qui décrit le mieux son niveau d'indépendance fonctionnelle et, souvent, incorpore également la note du soignant quant au niveau d'indépendance du patient. L'autonomie était préservée chez les patients ayant un score allant de 70 à 100%, partiellement altérée pour un score de 50 à 60% et très gravement perturbée pour un score allant de 0 à 40%. Une activité de 100% indique que le patient est totalement indépendant alors qu'à 0% le patient est alité.

III.2.1.4. Les mouvements anormaux : Echelle AIMS

Les mouvements anormaux ont été évalués par l'échelle codifiée AIMS « Abnormal Involuntary Movement Scale » [71]. Elle consiste à évaluer les différents types de dyskinésies, leurs sièges et leurs sévérité à partir de 10 items coté sur une échelle en 5 points (Total / 40).

III.2.2. Evaluation des troubles cognitifs

III.2.2.1. Mini Mental State Evaluation: MMSE

Le Mini Mental state examination (MMSE) est une échelle d'évaluation des fonctions cognitive très sensible pour les troubles mnésiques d'une personne (Annexe 2) [72]. Elle inclut des questions de mémoire, d'orientation, de langage et d'attention, pour un total de 30

points. Le MMSE permet de répartir les troubles en léger ($24 < \text{MMSE} < 20$), modéré ($19 < \text{MMSE} < 10$) et sévère ($9 < \text{MMSE} < 0$). Cependant, sa fiabilité et sa validité ont été discutées. En effet, le MMSE surestime le déclin cognitif chez les personnes ayant un faible niveau d'éducation [73].

III.2.2.2. Montreal Cognitive Assessment : MoCA

Le MoCA est un outil de dépistage de l'atteinte neurocognitive et il est dédié principalement au dépistage de l'atteinte plus légère pour contrôler l'effet plafond observé avec le MMSE [74]. Le MoCA est un questionnaire incluant : la mémoire à court terme, les habiletés visuospatiales, les fonctions exécutives, l'attention, la concentration, la mémoire de travail, le langage et l'orientation dans le temps et l'espace. Les épreuves qui y sont proposées sont souvent plus complexes que celles retrouvées dans le MMSE. Un score inférieur à 26 distingue les personnes atteintes de troubles neurocognitive.

III.2.2.3. Batterie Rapide d'Efficiency Frontale : BREF

La BREF [75], batterie rapide d'évaluation frontale (en anglais FAB: Frontal Assessment Battery at Bedside) constitue un test de dépistage spécifique aux troubles exécutifs cognitif et comportemental. Cette batterie est destinée à permettre une évaluation rapide des syndromes démentiels. Elle est composée de six sous tests : épreuve des similitudes, épreuve d'évocation lexicale, séquence gestuelle de Luria, épreuve des consignes conflictuelles, épreuve Go-No Go, recherche d'un comportement de préhension. Un score BREF < 14 traduit la présence d'un syndrome dysexécutif.

III.2.3. Evaluation des troubles neuropsychiatriques

III.2.3.1. La Geriatric Depression Scale (GDS)

Il s'agit de l'échelle de dépression gériatrique la plus connue et comporte 30 items ayant chacun une réponse de type Oui-Non [76]. Elle fournit des indications sur l'état psycho-affectif du patient. Par contre, à elle seule, ne permet pas de faire un diagnostic de dépression et elle n'a pas de validité avec les personnes ayant des troubles cognitifs. Un score de 0 à 9 est normal, un score de 10 à 19 correspond à une dépression modérée, et un score de 20 à 30 correspond à une dépression sévère.

III.2.3.2. Beck Depression Inventory

L'Inventaire de dépression de Beck est un questionnaire qui investigate l'état dans lequel se trouve le patient durant les dernières semaines [77]. Elle est constituée de 21 questions et chaque question possède quatre réponses possibles, variant selon leur intensité. Elle mesure la sévérité de la dépression clinique du patient (annexe 3). Il existe trois versions de cet

inventaire, l'original été publié pour la première fois en 1961, puis révisé en 1978 sous le nom de IDB-1A, et l'IDB-II, publié en 1996. La dépression est considérée comme légère (score 4-7), moyenne à modérée (score 8-15) ou sévère (score ≥ 16).

III.2.4. Evaluation de la qualité de vie

III.2.4.1. Short Form Health Survey: SF-36

Cette échelle comporte 36 questions réparties en 8 dimensions évaluant différents domaines de la qualité de vie (l'état général, l'activité physique, les limitations dues à l'état physique, la santé mentale, la limitation émotionnelle, la douleur physique, l'énergie et la vitalité et l'activité sociale) [78]. Les réponses sont cotées de 0 à 100 et un score moyen est calculé pour chaque dimension. Plus ce score n'est élevé, plus la qualité de vie est meilleure.

III.2.4.2. Échelles PDQ 39 et PDQ 8

PDQ-39 (Parkinson Disease Quotation) est une échelle d'évaluation de la qualité de vie de la maladie de Parkinson [79]. Elle est fiable, validée, spécifique de la maladie et sensible aux changements. Elle a été déclinée dans une forme abrégée : la PDQ-8 qui utilise les 8 items les plus représentatifs de la PDQ-39. Le questionnaire permet d'apprécier les changements sur la qualité de vie, après une période de changement thérapeutique complexe.

IV. Physiopathologie de la maladie de Parkinson

Les symptômes de la maladie de Parkinson sont principalement le résultat de la mort cellulaire sélective des neurones dopaminergiques dans les formations pigmentées (la pars compacta) de la substance noire des ganglions de la base. Ces neurones se projettent vers le striatum et leur dégénérescence perturbent l'activité neuronale des ganglions de la base qui régulent les mouvements.

IV.1. Les ganglions de la base ou les noyaux gris centraux (NGC)

IV.1.1. Organisation anatomique

Les noyaux gris centraux (NGC) ou les ganglions de la base sont un ensemble de structures (noyaux) de substance grise sous-corticales situées approximativement au milieu du cerveau humain. Les ganglions de la base sont structurellement des masses nucléaires sous-corticales dérivées du télencéphale appartenant au système extrapyramidal. Ils sont un élément clef de la motricité et permettent de moduler le mouvement, en particulier les mouvements appris et exécutés de façon automatique.

Les NGC sont constitués de cinq noyaux principaux : le striatum, le pallidum, le locus niger, le thalamus et le noyau sous thalamique [80] (Figure 4).

- Le striatum (STR) comprend le noyau caudé et le putamen. Le striatum tient son nom de l'apparence striée qu'il présente en microscopie optique en raison des nombreuses fibres qui le composent. Il contient des neurones GABAergiques et des neurones cholinergiques.
- Le pallidum (GP) est subdivisé en deux segments : Globus Pallidus externe (GPe) et Globus Pallidus interne (GPi).
- Le locus niger (substance noire) est constitué de deux régions :
 - La pars compacta du locus niger contient environ 450000 neurones dopaminergiques. La pigmentation noire est due à la présence de mélanine, produit de la dégradation de la dopamine. Dans la maladie de Parkinson, c'est une perte neuronale massive affectant cette population de cellules qui entraîne les signes majeurs de la pathologie.
 - La pars reticulata est riche en neurones GABAergiques. Elle est liée fonctionnellement et cytologiquement au pallidum interne (GPi).
- Le thalamus (NST) est divisé par de minces cloisons en trois masses : les noyaux antérieurs, postérieurs et latéraux. Le noyau latéral entre dans l'organisation motrice en activant le programme moteur. On distingue aussi le complexe central du thalamus incluant le centre médian (CM) et le noyau parafasciculaire (Pf).

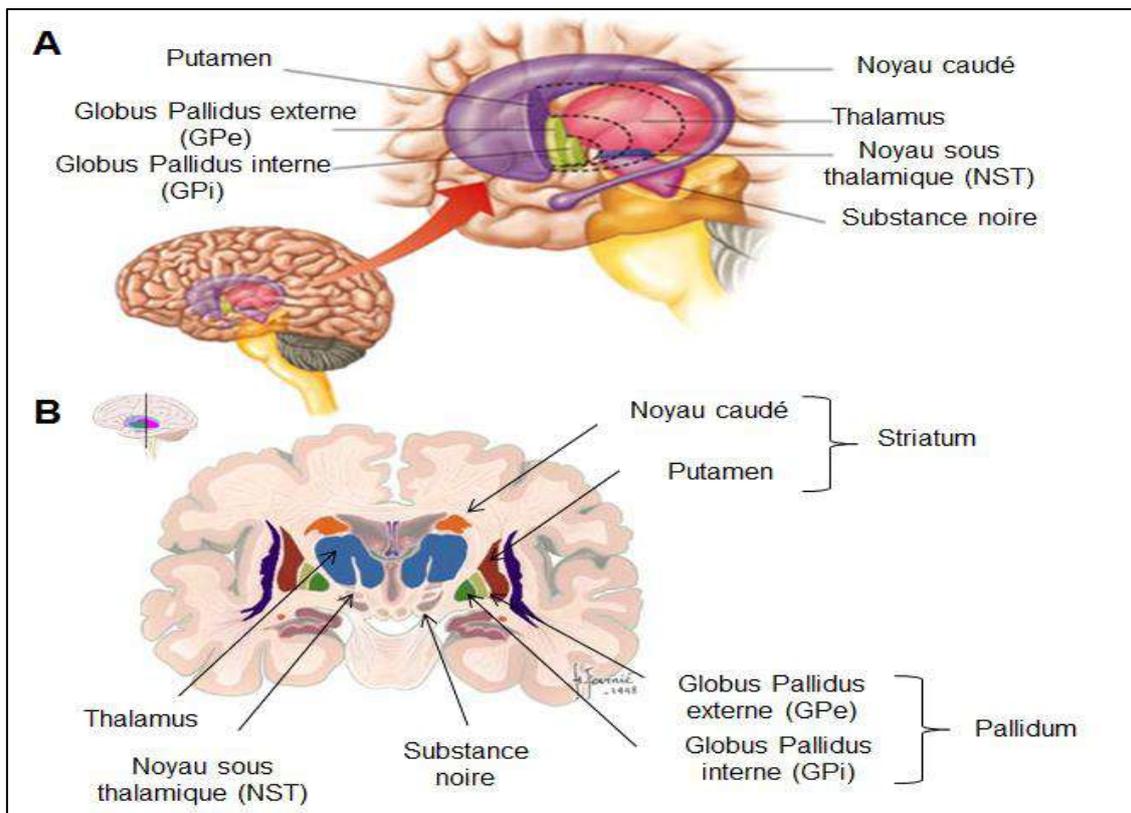


Figure 4. Anatomie des ganglions de la base [80].

A : vue totale dans le cerveau Humain ; B : coupe coronale de cerveau humain et position de certains éléments des ganglions de la base.

IV.1.2. Morphologie neuronale et neurobiochimie

IV.1.2.1. Les neurones du striatum

La majorité des neurones striataux (96%) sont des neurones épineux de taille moyenne, ayant des dendrites couvertes d'épines dendritiques. Ces neurones sont GABAergiques et contiennent aussi d'autres neurotransmetteurs en particulier des neuropeptides (substance P et dynorphine d'une part et enképhaline d'autre part) [81].

Les autres neurones striataux sont de petits inter-neurones GABAergiques qui agissent comme inhibiteurs des neurones épineux voisins, de gros neurones cholinergiques et des neurones leptodendritiques dont le rôle est encore inconnu [81].

IV.1.2.2. Neurones du pallidum et du locus niger

Ils reçoivent 90% de l'information striatale inhibitrice par leurs boutons synaptiques dendritiques à terminaison GABAergiques. Ils ont un effet inhibiteur sur les neurones cibles thalamiques [82]. Les neurones pallidaux ont une arborisation en forme de disque aplati alors que celle des neurones nigraux prend la forme d'un cône ramassé orienté perpendiculairement à la projection striatale. Les 10% restant de l'information proviennent du NST et du noyau pédonculo-pontin (NPP) avec un contrôle dopaminergique.

IV.1.2.3. Les neurones des noyaux sub-thalamiques

Ils sont homogènes de dimensions intermédiaires avec une arborisation dendritique comportant de rares épines. Ils reçoivent des afférences corticales. Ils utilisent le glutamate comme neuromédiateur et sont excitateurs des neurones cibles [83].

IV.1.3. Rôles des ganglions de la base

Les ganglions de la base forment avec le cortex cérébral et le thalamus un circuit striato-thalamo-cortical qui joue un rôle fondamental dans la motricité volontaire mais aussi dans de nombreuses autres fonctions : cognitives (comme l'apprentissage, la mémoire), émotionnelle et l'adaptation à l'environnement. L'importance des ganglions de la base est toute particulière dans le cas de l'exécution de mouvements volontaires automatisés. Lorsque l'on décide d'effectuer un acte moteur, la décision de réaliser cet acte est transmise à un centre cortical chargé de la préparation d'un programme moteur adéquat. Il initie l'exécution de ce programme moteur par l'activation des structures exécutives du cortex moteur. La diversité des fonctions assurées par les ganglions de la base, est due à leur position de boucle fonctionnelle entre le cortex associatif (lieu de conception des idées motrices ou mentales) et le cortex frontal moteur qui en assure l'exécution. Au sein de cette organisation, la dopamine joue un rôle clef dans la modulation du système.

IV.1.4. Organisation fonctionnelle des ganglions de la base

La circuiterie du système des ganglions de la base a été tracée en se basant sur les données morphologiques et électro physiologique. Ceci a permis de confirmer la réalité des voies anatomiques, et de préciser leur rôle fonctionnel.

Plusieurs modèles de fonctionnement des NGC ont été proposés en passant par les modèles classiques établis par certains auteurs tels que le modèle convergent [81], le modèle parallèle [84], le double circuit [85]. Le modèle actuel englobe le concept de « double circuit » et le concept de « circuits parallèles » [86]. Les NGC comportent des circuits parfaitement séparés qui ne communiquent pas les uns avec les autres tout au long de la boucle cortex-NGC-cortex. Au sein de chaque circuit existent deux voies, l'une directe qui stimule et l'autre indirecte qui inhibe la fonction traitée dans chaque circuit [86, 87] (Figure 5).

- La voie directe : Quand le système moteur est au repos, le globulus pallidus interne (GPi) envoie des flux inhibiteurs sur le thalamus par l'intermédiaire du neuromédiateur GABA. Pour initier un mouvement, le cortex cérébral envoie des signaux excitatrices de type Glutamate au striatum. Le striatum, stimulé par la substance noire compacta (SNc) via ses récepteurs D1 dopaminergiques, envoie un signal inhibiteur aux structures de sortie du système qui sont le globulus pallidus interne (GPi) et la substance noire réticulaire (SNr) par le neuromédiateur GABA et la substance P sécrétée par les neurones striataux. Le GPi inhibé, lève alors sa propre inhibition sur le thalamus qui envoie à son tour un signal stimulateur de type Glutamate au cortex. Le cortex cérébral peut initier alors le mouvement volontaire.

- La voie indirecte du mouvement est un circuit cérébral inhibant les mouvements par un circuit indirect. C'est la deuxième action de l'afférence dopaminergique nigrostriée qui est transmise via des récepteurs dopaminergiques de type D2 sur d'autres types de neurones inhibiteurs de la voie indirecte du putamen. Ces neurones exercent une action excitatrice sur les mêmes structures de sortie (GPi, SNr) mais de façon indirecte en inhibant les neurones GABAergiques du pallidum externe (GPe). Cette inhibition se fait par deux neurotransmetteurs GABA et l'enképhaline sécrétée par les neurones striataux. Les neurones du GPe inhibent aussi le noyau sous thalamique (NST), qui exerce une influence finale excitatrice par sa projection glutamatergique sur l'ensemble GPi- substance noire reticulata (SNr). La sortie principale du système correspond aux neurones GABAergiques inhibiteurs pallido-thalamiques et nigro-thalamiques.

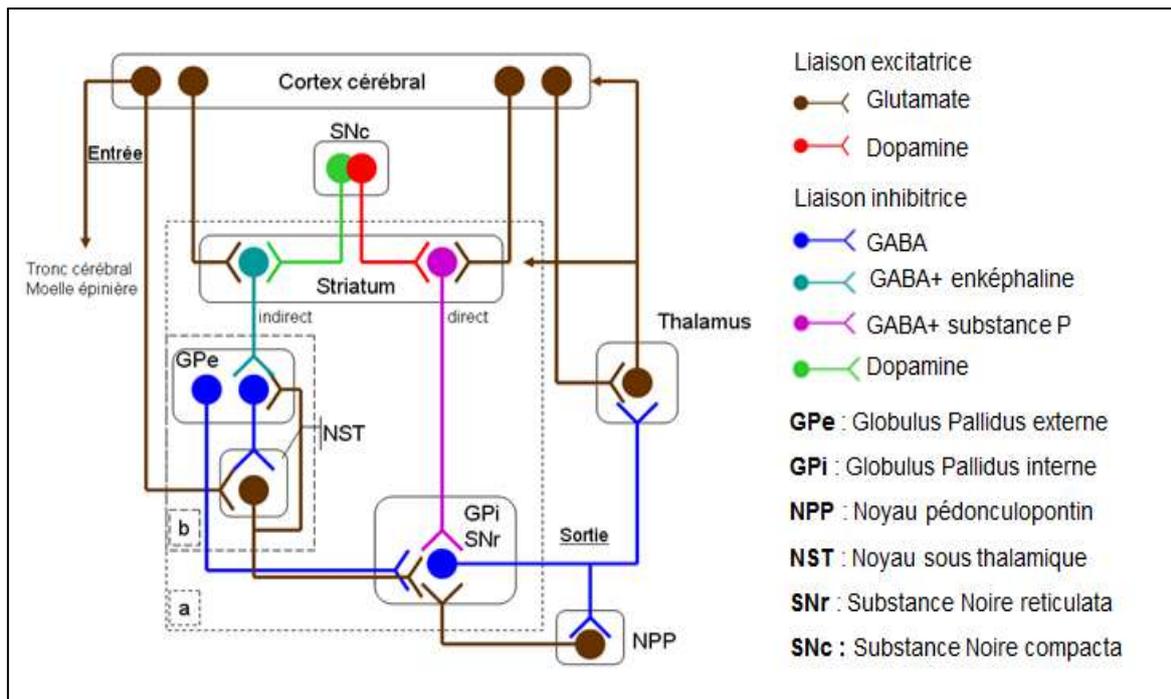


Figure 5. Diagramme schématique de la circuiterie fonctionnelle du système des ganglions de la base présentée par les neurotransmetteurs mis en jeu [113].

IV.2. Circuits neuronaux touchés par la maladie de Parkinson

Les symptômes de la MP sont principalement le résultat de la dégénérescence des neurones dopaminergique de la pars compacta de la substance noire des ganglions de la base. La défaillance en dopamine provoque la désactivation des voies directes et une excitation des voies indirectes, alors que ces deux voies sont régulées de façon opposée chez le sujet sain [88] (Figure 6).

- La voie directe : les récepteurs D1 du striatum ne sont plus excités, ce qui va réduire leur inhibition directe GABAergique et substance P sur le GPi et le SNr. Ceci renforce l'action inhibitrice de ces deux structures de sortie sur le thalamus. Cela va conduire à une inhibition renforcée du thalamus sur le cortex cérébral.
- La voie indirecte : les récepteurs D2 ne sont plus inhibés, ce qui provoque une augmentation de l'inhibition GABAergique et enképhaline du striatum sur le GPe. De ce fait, l'inhibition GABAergique du NST par les neurones GPe est diminuée. L'excitation glutamatergique exercé par le NST sur le GPi et le SNr est augmentée. Les neurones de ces deux structures vont exercer une inhibition GABAergique puissante sur le thalamus ce qui désactive son excitation sur le cortex cérébral. La perturbation de la voie indirecte est responsable de l'effet hypokinétique inhibant le mouvement chez le patient Parkinsonien

c'est-à-dire l'incapacité d'adapter les programmes moteurs pour celui qui est désiré à un instant donné.

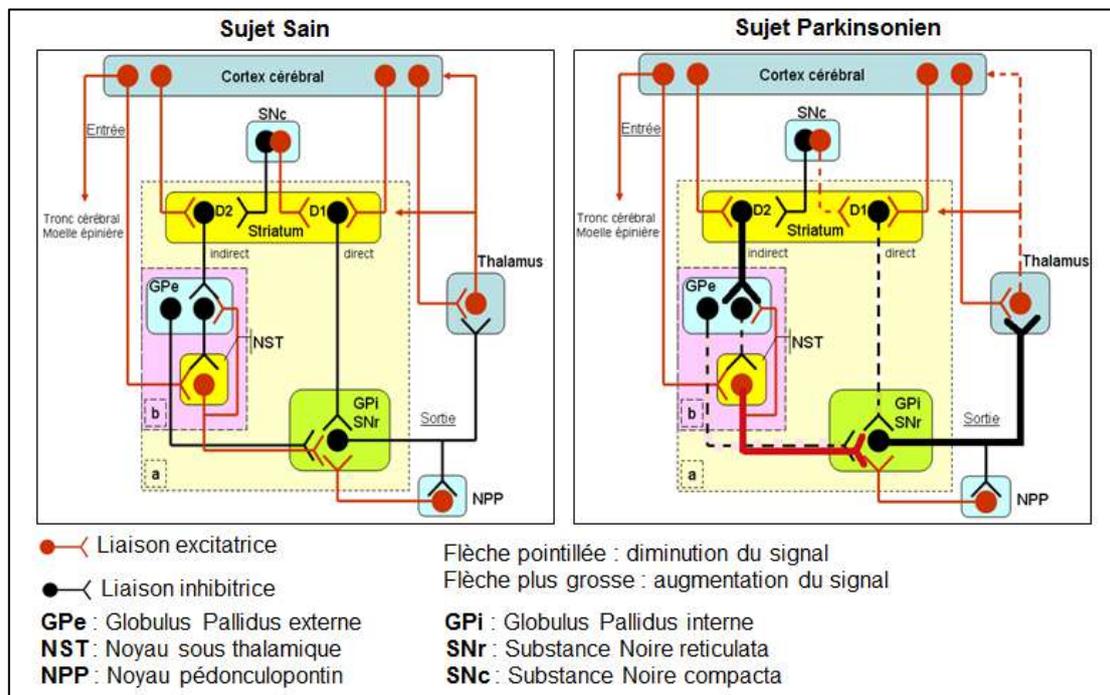


Figure 6. Physiopathologie de la maladie de Parkinson: circuits neuronaux touchés durant la maladie de Parkinson [112].

V. Anatomie pathologique de la maladie de Parkinson

Les lésions histologiques de la MP associent deux éléments majeurs à savoir la dégénérescence des neurones pigmentés du Locus Niger et la présence d'inclusions éosinophiles, les « *corps de Lewy* » [89]. Au sein du système nerveux central (SNC) les neurones dopaminergiques se retrouvent majoritairement au niveau du mésencéphale. Ces neurones sont retrouvés dans 9 noyaux chez l'être humain, nommés de A8 à A16 et répartis entre le mésencéphale et le bulbe olfactif [90].

V.1. Dégénérescence neuronale

V.1.1. Dégénérescences des neurones dopaminergiques

En 1919 Tretiakoff découvre que la dépigmentation de la substance noire est à l'origine de la MP (Figure 7). En 1960, Ehringer et Hornykiewicz a montré que ces lésions provoquent un déficit en dopamine dans le striatum, lui-même responsable des symptômes observés [91, 92]. La perte neuronale s'avère être hétérogène au sein du mésencéphale et elle est estimée à environ 60 % dans les zones ventrales et de 40 % dans les zones dorsales de la substance noire [93]. Elle prédomine au niveau de la pars compacta de la substance noire (plus de 75 %

de perte neuronale) où elle est plus sévère dans sa partie médio-caudale que rostro-latérale [94]. les symptômes moteurs de la MP apparaissent lorsque la mort neuronale atteint 30 % des neurones dopaminergiques, (60 % dans les études les plus antérieures) qui correspond à une dénervation striatale plus marquée de l'ordre de 50 à 70% [95].

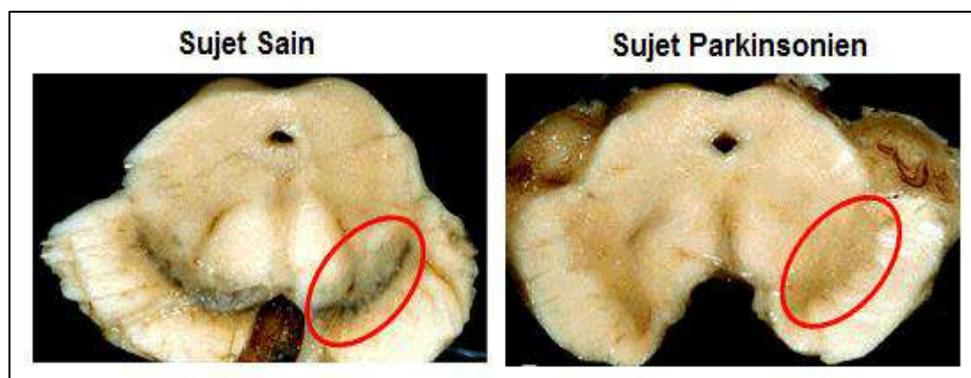


Figure 7. Aspect macroscopique du mésencéphale chez un sujet sain et un patient Parkinsonien montrant la dépigmentation du locus niger [96].

V.1.2. Dégénérescences des neurones non dopaminergiques

Hors du mésencéphale, d'autres neurones non dopaminergiques sont touchés au cours de la MP. La dégénérescence de ces neurones est en général responsable des troubles non moteurs.

On distingue :

- la perte neuronale dans certains noyaux du tronc cérébral tels que les neurones adrénergiques du locus coeruleus, le noyau basal cholinergique de Meynert [97], le noyau dorsal du vague [98], le noyau pédonculopontin [99] et le noyau sérotoninergique du raphe [100].
- Les pertes observées dans le système nerveux périphérique autonome [101] tels que :
 - Les fibres noradrénergiques cardiaques [102]
 - La région fovéale de la rétine qui joue un rôle dans la vision des contrastes, cette destruction explique les troubles de la vision [103].
 - La paroi intestinale, cette perte peut être impliquée dans les désordres digestifs fréquents durant la maladie [104].

V.1.3. Les corps de Lewy

Les corps de lewy sont un marqueur de la MP idiopatique mais ne sont cependant pas pathognomoniques de la MP et peuvent s'observer avec une moindre fréquence dans d'autres affection dégénératives comme la démence à *corps de Lewy*, mais aussi chez des sujets sains âgés de plus de 60 ans [105].

Ils sont des inclusions cytoplasmiques éosinophiles arrondies situées dans le corps cellulaire et au niveau des neurites (Figure 8) [106]. Les corps de Lewy classique du tronc cérébral sont des inclusions sphériques éosinophiles volumineuses (30-40 μm) à centre hyalin et à couronne périphérique pâle [107].

De multiples protéines ont été trouvées dans les corps de Lewy notamment l'ubiquitine, l' α -B-cristalline. Ce pendant la composante majeure des corps de Lewy est l'alpha-synucléine [107]. La nature de ces corps de Lewy n'est en faveur ni d'une séquelle d'atteinte virale, ni immunologique, ni inflammatoire, ni vasculaire. Elle oriente simplement vers une anomalie du métabolisme cellulaire neuronal [107]. En effet la formation des corps de lewy est le résultat de la non dégradation des protéines par le protéasome et l'agrégation de celles-ci au niveau du centrosome [107].

Les corps de lewy ont été mis en évidence initialement par des colorations standard de type éosine-hématoxyline. Les inclusions sphériques sont cernées d'un halo clair. Par contre, les techniques immunocytochimiques, sont devenues les techniques de choix depuis plusieurs années. L'immuno-marquage de l'alpha-synucléine par l'utilisation d'anticorps monoclonaux est plus sensible pour mettre en évidence la pathologie de Lewy. Ils ont un aspect rond caractéristique avec un noyau plus léger et un halo sombre. Elle permet notamment de mettre en évidence plus facilement les corps de Lewy corticaux dépourvu du halo clair en coloration éosine-hématoxyline [108].

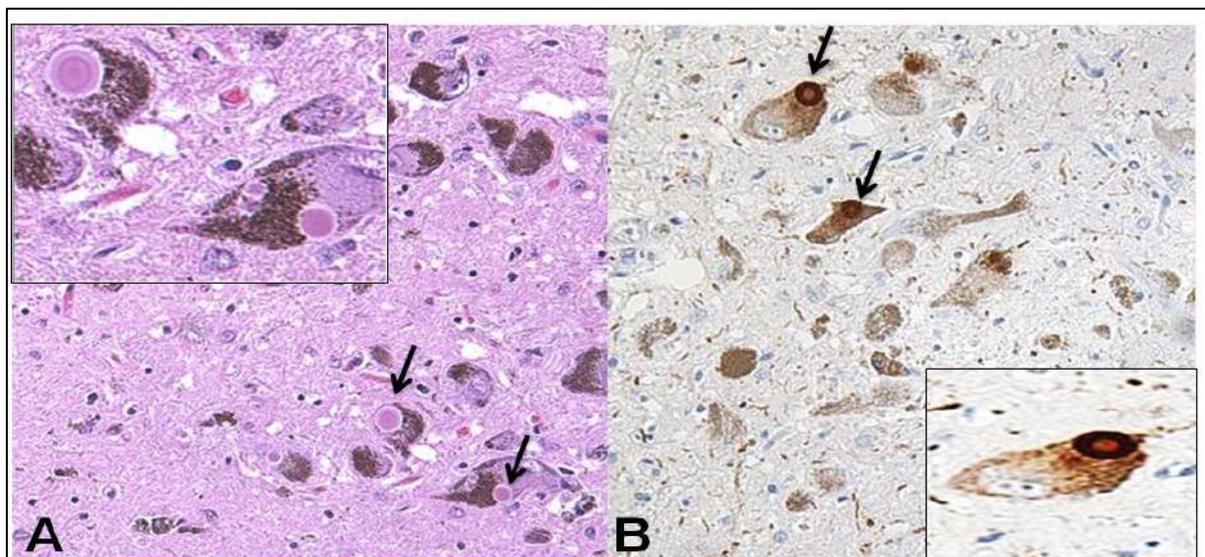


Figure 8. Corps de Lewy typiques du locus niger chez un patient Parkinsonien [108].

(A) Corps de Lewy colorés à l'hématoxyline et à l'éosine. Un agrandissement plus élevé dans le coin supérieur gauche. (B) L'immunohistochimie de l'alpha-synucléine, les corps de Lewy sont colorés avec un anticorps spécifique de la forme pathologique phosphorylée (sérine 129) de l' α -synucléine. Un grossissement plus élevé dans le coin inférieur droit. Barre d'échelle = 100 μm .

VI. Étiologie de la maladie de Parkinson

La MP était généralement considérée comme le résultat de facteurs de risque environnementaux et les facteurs génétiques [109, 110].

VI.1. Les facteurs de risque environnementaux [111, 112]

VI.1.1. Les agents toxiques

L'hypothèse selon laquelle l'exposition aux pesticides et autres produits chimiques de l'environnement augmente le risque de la MP a été suggérée par la découverte des effets neurotoxiques d'un métabolite de la 1-méthyl, -4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) chez les toxicomanes qui s'injectent des drogues contenant du MPTP [113]. De nombreux agents toxiques ont été aussi incriminés tels que l'exposition prolongée à des solvants organiques, les métaux lourds (mercure, plomb, cadmium), le manganèse et Roténone entrant dans la composition de très nombreux pesticides et insecticides [114]. Une exposition professionnelle aux pesticides augmente le risque de développer la MP d'environ 3 fois [115, 116]. En général, ils ont trouvé que les agents stressants oxydatifs, tels que le parquat, le perméthrin et le maneb avaient un rapport de risque un peu plus élevé que les inhibiteurs du complexe I mitochondrial [116, 117].

Une addiction à la méthamphétamine augment 2,8 fois le risque de développer la MP ($p < 0,01$) [118]. La méthamphétamine se lie au transporteur de dopamine présynaptique augmentant ainsi ses concentrations extracellulaires [119].

VI.1.2. Traumatismes crâniens

Les traumatismes cérébraux ont attiré beaucoup d'attention dernièrement après la découverte de changements cérébraux (Alzheimer, MP) chez les jeunes athlètes pratiquant des sports impliquant des blessures répétées à la tête, comme le football, le hockey et le box. Cependant, une lésion cérébrale traumatique légère à modérée, a également été associée au développement de la MP à un âge plus avancé [120]. Une lésion cérébrale traumatique peut causer une rupture de la barrière hémato-encéphalique, une inflammation cérébrale de longue durée, une perturbation de la fonction mitochondriale, une augmentation de la libération de glutamate et une accumulation d' α -synucléine dans le cerveau [121].

VI.1.3. Les facteurs protecteurs

Une méta-analyse regroupant de nombreuses études a montré que le tabac et le café réduisent le risque de la MP [122]. Pour le tabac, cette observation a été expliquée plutôt par la mortalité accrue chez les fumeurs généralement avant l'âge de développer la MP ou que la

nicotine masquent la manifestation clinique de la MP et aussi par le fait que les symptômes non moteurs de la MP, qui apparaissent souvent des années avant les symptômes moteurs, entraînent une diminution du goût et de l'odorat ce qui diminue l'envie de fumer [112].

Par contre, un effet neuroprotecteur de la caféine a été observé dans les modèles expérimentaux de la MP. La caféine, un antagoniste des récepteurs de l'adénosine, peut bloquer des récepteurs A2A de l'adénosine ce qui va protéger contre la toxicité des neurones dopaminergiques [123, 124]. De faibles doses de caféine présentent des avantages symptomatiques sur la congélation de la marche, et la bradykinésie ou la rigidité [125, 126].

Des niveaux élevés d'urate de sang (acide urique) ont également été associés à une diminution du risque de la MP [127]. Les patients ayant des taux d'urate de sang les plus élevés semblaient avoir la plus lente progression de la MP [128].

Des quantités modérées de vitamine E peuvent aussi réduire le risque de la MP, mais cet avantage peut être perdu avec des apports plus élevés [129].

VI.2. Les facteurs génétiques

Bien que la plupart des cas Parkinsonien soient sporadiques, Gowers a montré que 15% des patients présentaient une histoire familiale de la maladie [20]. L'étude des jumeaux a révélée des faibles taux de concordance (5-8%) obtenus autant chez les jumeaux monozygotes que dizygotes [130–132]. Etant donné que cette étude est la méthode la plus précise pour estimer la prédisposition génétique qui consiste à comparer les taux de concordance entre jumeaux monozygotes et dizygotes (un trait génétique autosomique dominant simple à pénétrance totale devrait correspondre à un taux de concordance de 100% chez les jumeaux monozygotes et de 50% chez les dizygotes), et en raison de l'absence de différences significatives entre les deux groupes, les premières études de ce type ont écarté l'hypothèse génétique dans la MP [130–132]. Il s'est avéré plus tard que ces travaux avaient sous-estimé l'impact de l'âge de début très variable de la MP sur leurs observations [133]. Chez les jumeaux monozygotes et dizygotes dont l'âge de début de la MP était inférieur à 50 ans, des taux de concordance de 100% et 16% respectifs ont été identifiés. Alors que ces taux étaient de 16% et 11% chez les jumeaux monozygotes et dizygotes lorsque l'âge de début n'était pas pris en compte [134]. Ces observations confirment la contribution significative de facteurs génétiques aux formes précoces de la MP et la complexité des formes plus tardives. L'analyse de 80 familles avec deux ou plusieurs individus affectés a montré que la co-ségrégation de la maladie est compatible avec un mode de transmission autosomique dominant avec une pénétrance réduite dans un sous-groupe [135].

L'analyse de liaison génétique du génome entier dans une grande famille d'origine italienne, a révélé une association sur un locus 4q21-q23 [136]. A l'exception d'un âge relativement précoce d'apparition de la maladie à 46 ± 13 ans, le phénotype dans la famille italienne a été bien typique de la MP, y compris les corps de Lewy [136]. La première mutation (Ala53Thr) qui cause la forme familiale de la MP a été identifiée dans le gène de l' α -synucléine (*SNCA*) dans la famille italienne et dans trois familles d'origine grecque avec une transmission autosomique dominante [137].

Durant ces 20 dernières années, des mutations dans autres gènes étaient fortement associées à la MP soit avec une transmission autosomique dominante (*LRRK2* et *VPS35*) ou une transmission autosomique récessive (*PARKIN*, *PINK1* et *DJI*). D'autres gènes ont été aussi rapportés comme responsables de Parkinsonisme ou MP atypique, y compris *ATP13A2*, *DNAJC6*, *FBXO7*, *GBA*, *PLA2G6*, *SPG11*, *SYNJ1* et *VPS13C*[138–141].

Globalement les formes monogéniques ne représentent que 10 à 20% des cas parkinsoniens et ces mutations sont plus fréquentes chez les patients avec un âge de début de la maladie <40ans, avec des antécédents familiaux de la MP ou de consanguinité parentale [142–144].

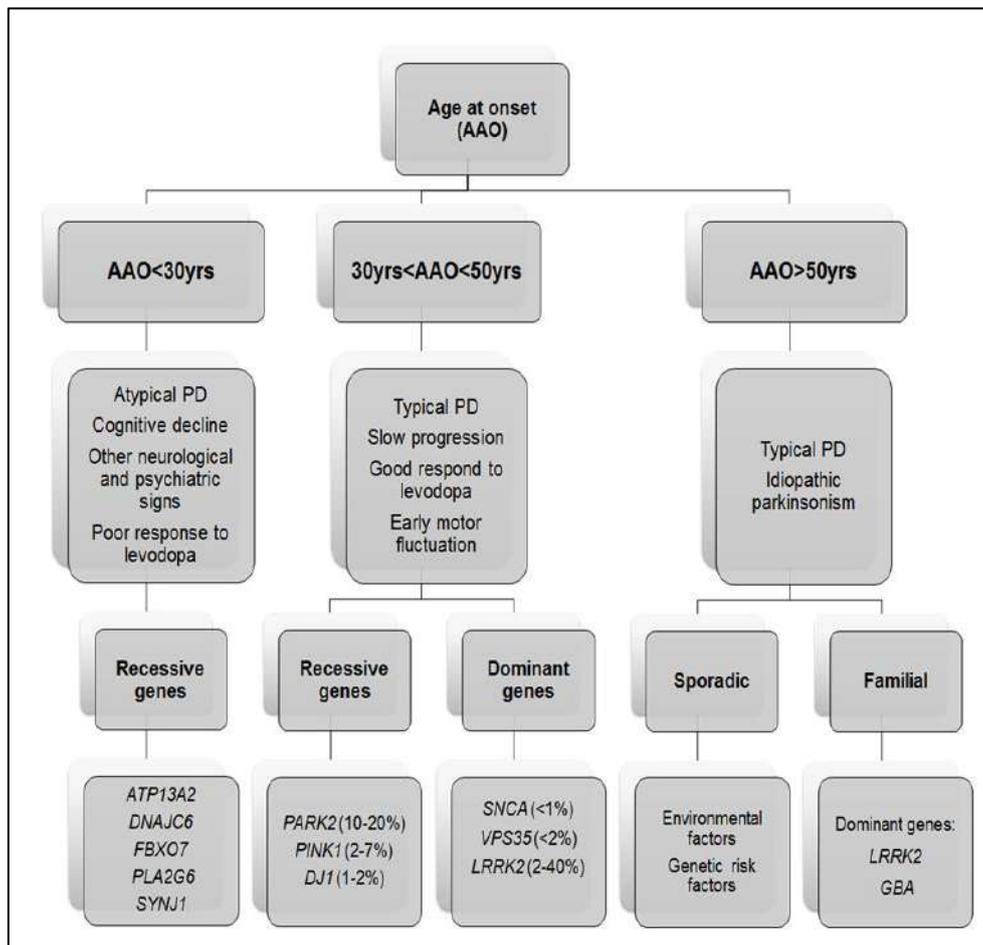


Figure 9. Etiologie et phénotype de la Maladie de Parkinson en fonction de l'âge de début [145].

VI.2.1. Les gènes autosomiques dominants

VI.2.1.1. Le gène Synuclein Alpha : SNCA (PARK1 et PARK4)

Le gène *SNCA*, localisé sur le locus 4q22.1, est constitué de 6 exons répartis sur 117kb et code pour la α -synucléine [146]. La α -synucléine est largement exprimée dans tout le cerveau des mammifères et elle est présente au niveau des terminaisons nerveuses présynaptiques [147]. Les terminaux présynaptiques libèrent des messagers chimiques, appelés neurotransmetteurs, à partir de compartiments connus sous le nom de vésicules synaptiques. La libération de neurotransmetteurs relaie les signaux entre les neurones et est essentielle pour le fonctionnement normal du cerveau. Des études suggèrent que la α -synucléine joue un rôle important dans le maintien d'un apport suffisant de vésicules synaptiques dans les terminaisons présynaptiques [148]. Elle peut également aider à réguler la libération de dopamine [149]. La α -synucléine peut aussi avoir un rôle inhibiteur sur la fusion des mitochondries, favorisant leur fragmentation [150].

L'accumulation de la α -synucléine est responsable d'une altération du transport vésiculaire entre le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi [151], d'une diminution de la libération des vésicules synaptiques, d'un dysfonctionnement mitochondrial avec perturbation énergétique et induction de la mort cellulaire et d'un dysfonctionnement des voies de dégradation protéiques par le système ubiquitine protéosome (UPS) [152].

Seulement trois mutations faux-sens (A53T, A30P et E46K) ont été identifiées comme pathogènes dans le gène *SNCA* (PARK1) [137, 153, 154]. Cependant les duplications et les triplications de la totalité du gène *SNCA* (PARK4) ont été identifiées dans 31 familles [139]. Le phénotype des patients est dose-dépendant, les patients avec une duplication présentent une MP non différenciable de la forme idiopathique alors que les porteurs d'une triplication ont un âge de début plus précoce et une fréquence élevée de démence [155].

VI.2.1.2. Le gène leucine rich repeat kinase 2: LRRK2 (PARK8)

Le gène *LRRK2* contient 51 exons couvrant 144 kb localisé sur le locus 12q12 [156]. Il code pour la dardarin (dérivée du mot basque dardara, qui signifie tremblement), une protéine tyrosine kinase-like de 286 kDa appartenant à la superfamille Ras/GTPase et plus particulièrement à la famille des ROCO [157]. Cette protéine est constituée de cinq domaines fonctionnels putatifs : un domaine de répétition riche en leucine N-terminal (LRR), un domaine Roc (Ras of complex proteins), un domaine COR (C-terminal de Roc), une protéine activée par la mitogen domaine de kinase kinase kinase (MAPKKK) et une répétitions C-terminales WD40 [158].

LRRK2 est hautement exprimé dans le système nerveux central [156]. Il est impliqué dans le contrôle de la longueur des neurites par un mécanisme d'autophagie [159]. Elle joue également un rôle d'endocytose et dans le trafic et la polarisation des vésicules synaptiques vers les axones [160–162]. *LRRK2* interagit avec d'autres protéines impliquées dans les MP familiales, notamment la parkine [163] et la α -synucléine [164].



Figure 10. Implication du gène *LRRK2* dans les mécanismes cellulaires [165].

LRRK2 peut affecter la fonction mitochondriale, le système ubiquitine-protéasome, la voie autophagie-lysosomale, la dynamique des microtubules ainsi que le trafic de vésicules et de protéines, la phosphorylation de l' α -synucléine et les cellules du système immunitaire.

En 2002, le locus PARK8 a été identifié à chez une famille Japonaise présentant une forme autosomique dominante de la MP [166]. En 2004, deux études simultanées ont découvert des mutations faux-sens du gène *LRRK2* dans plusieurs familles [156, 157]. Depuis, plus de 75 autres variations ont été révélées dans 5-15% des patients à ce jour. Cependant, les preuves génétiques de pathogénicité ne sont prouvées que pour p.R1441C, p.R1441G, p.Y1699C, p.G2019S, p.I2020T, p.R1628P et p.G2385R [167]. La mutation R1441G représente jusqu'à 20% des cas familiaux dans le nord de l'Espagne résultant d'un effet fondateur daté au septième siècle [168]. Alors que la mutation p.G2019S est présente dans 40% des patients d'Afrique du Nord [169] et 18% des cas juifs ashkénazes [170] et s'embble être le résultats de 3 évènements fondateurs indépendant [171].

Sur le plan clinique, les porteurs présentent un âge de début moyen de 58 ans et une MP asymétrique classique qui répond bien à la L-dopa. Leurs symptômes ne sont pas différenciables de ceux observés chez les patients idiopathique [172–174].

VI.2.1.3. Le gène vacuolar protein sorting 35: VPS35 (PARK17)

Le gène *VPS35* est présent sur le chromosome 16q13-q21 [175] et composé de 17 exons qui s'étendent sur 29,6 kb [176]. Le gène *VPS35* code une sous-unité du complexe multimérique des rétromères entre les endosomes [177]. *VPS35* intervient dans le recyclage membranaire, la voie de signalisation et la biogenèse des lysosomes [177].

Récemment, une mutation ponctuelle faux-sens dans le gène *VPS35* (D620N) a été identifiée par exome sequencing comme responsable d'une forme autosomique dominante d'une MP typique à début tardif [177, 178]. L'analyse d'une large cohorte a montré que cette mutation est responsable d'environ 1 à 1.2% des cas Parkinsoniens familiaux avec transmission autosomique dominante [179, 180]. Par contre cette mutation est considérée comme une cause rare de la MP, et sa fréquence est estimée à 0,1% chez les parkinsoniens [181].

VI.2.1.4. Acid beta-glucocerebrosidase : GBA

Le gène *GBA* est localisé sur la bande 1q22 et constitué de 11 exons [182]. Il code pour la glucocérébrosidase (62 kDa), une enzyme lysosomale impliquée dans le métabolisme des sphingolipides (glucosylcéramide) où elle hydrolyse le glucosylcéramide en glucose et en céramide [183]. La glucocérébrosidase (GCCase) est composée de trois domaines non continus: le domaine I constitué des résidus 1-27 et 383-414; le domaine II impliquant les résidus 30-75 et 431-497 et le domaine III englobant les résidus 76-381 et 416-430 [184]. Le domaine I est essentiel pour le repliement de la protéine par le biais de deux ponts disulfure (résidus 4-16 et 18-23) et pour l'activité catalytique par la glycosylation du résidu N19 [185]. Le domaine II ressemble à un repli d'immunoglobuline (Ig) et a un rôle structural important. Le domaine III est un domaine de tonneau TIM (β / α)₈ qui contient le site catalytique [184].

Une déficience du gène *GBA* provoque un trouble du stockage lysosomal autosomique récessif appelé maladie de Gaucher (GD) [186]. Chez la plupart des patients atteints de la GD et leurs apparentés porteurs des mutations *GBA* à l'état hétérozygotes, un risque accru de développer la MP a été identifié [187–190]. Le criblage du gène *GBA* chez des patients parkinsoniens a confirmé son association avec la MP à transmission dominante [191–193].

Une déficience de la GCCase entraîne une altération de la dégradation lysosomique des protéines à longue durée de vie, y compris la *SNCA*. L'accumulation de *SNCA*, à son tour, inhibe le transport de la GCCase vers les lysosomes [194].

Les patients porteurs des mutations *GBA* à l'état hétérozygotes présentent un âge de début légèrement plus précoce (55 ans contre 59 ans) que les formes idiopathiques de la MP. Ces patients présentent des symptômes en général similaires aux progression rapide de la maladie

et déclin moteur mais avec une progression plus rapide de la maladie et du déclin moteur et développent des troubles cognitives la plupart du temps [195–198].

VI.2.1.5. Autres gènes peu ou non répliqués

- **Les gènes responsables des ataxies héréditaires:** les expansions de trinuécléotides (CAG) dans *ATXN2* (ataxin-2) ou *ATXN3* (ataxin-3) provoquent habituellement une ataxie spinocérébelleuse qui peut inclure un parkinsonisme. Cependant il a été rapporté que ces gènes sont impliqués dans la MP proprement dit sans autres signes neurologiques, au moins pendant les années suivant la présentation initiale de la maladie [199, 200]. Un phénotype parkinsonien a également été décrit lorsque la séquence répétée CAG normale a été interrompue par des segments CAA dans le gène *ATXN2* [200, 201].

- **SPR/PARK3:** le gène *SPR* code pour la sepiapterine réductase, une des enzymes responsables de la synthèse de dopamine. Le locus *PARK3* était initialement lié à une région génomique incluant le gène *SPR* entier, mais une vaste étude du consortium GEO-PD n'a pas pu établir d'association entre le gène *SPR* avec la MP [202, 203].

- **UCHL1/PARK5:** Une mutation de l'ubiquitine carboxyl-terminale estérase L1 (Ile93Met) a été identifiée dans une famille allemande en 1998 [204]. Depuis, aucune autre mutation de ce gène n'a été observée dans des patients parkinsoniens [139].

- **GIGYF2/PARK11:** Des mutations de la protéine GYF interagissant avec GRB10 ont été identifiées dans 12 familles en 2008 [205], mais ces mutations ont été fréquentes chez des témoins ou ne co-ségrégent pas avec la MP dans d'autres familles [206–208].

- **HTRA2/PARK13:** Ce gène code pour une protéine impliquée dans l'apoptose mitochondriale. Deux mutations de la sérine peptidase 2 HtrA (G399S, A141S) ont été identifiées chez 4 patients allemands [209]. La plupart des études de réplique ont exclu l'association entre le gène *HTRA2* et la MP incluant une étude multicentrique du consortium GEO-PD sur 6378 patients parkinsoniens [210, 211]. Une seule étude de réplique a identifié chez un patient une mutation faux-sens dans ce gène [212].

- **GCHI :** La guanosine triphosphate cyclohydrolase 1 est responsable d'une dystonie dopa-réactive (dystonie-parkinsonisme). Une nouvelle mutation a été identifiée en 2009 chez un patient chinois [213].

- **Les gènes responsable de la démence frontotemporale:** Des mutations dans le précurseur de la granuline (progranuline/*GRN*) provoquent une dégénérescence lobaire frontotemporale sans taupathies [214]. Généralement, chez les patients porteurs des mutations dans le gène *GRN*, le Parkinsonisme se produit tard après le développement de la démence

frontotemporale. Cependant chez quelques patients, le parkinsonisme a été la manifestation clinique prédominante [215]. Récemment, des mutations dans le **TARDBP**, le gène causant la SLA familiale ou la démence frontotemporale, ont également été identifiées chez quelques patients atteints de la MP à début tardif [216].

- **MAPT** : Des mutations dans la protéine tau associée aux microtubules provoquent aussi une démence frontotemporale avec ou sans parkinsonisme et avec taupathies [217]. Certains patients porteurs des mutations MAPT pathogènes présentent un parkinsonisme; des signes de démence frontotemporale peuvent survenir des années plus tard [218]. Il s'agit généralement d'un syndrome parkinsonien atypique avec une réponse insatisfaisante à la L-dopa, des signes cortico-spinaux, une paralysie du regard vertical et perturbation des saccades (mouvements brusques), ou dystonie unilatérale [219].

- **POLG** : Des mutations de l'ADN polymérase mitochondriale gamma (POLG, POLG1) ont été rapportées chez des patients parkinsoniens, avec une perte de cellules dopaminergiques et une réponse partielle aux médicaments dopaminergiques. Tous ces patients présentaient également des signes neurologiques prononcés tels qu'une ophtalmoplégie externe progressive, une ataxie, une neuropathie sensorielle ou une perte auditive neurosensorielle, une faiblesse musculaire avec une créatine kinase élevée et une myopathie mitochondriale dans la biopsie musculaire et/ou un hypogonadisme [220–222].

- **EIF4G1/PARK18** : eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 appartient au complexe protéique chargé d'initier la traduction de certains ARNm impliqués notamment dans la régulation de l'activité mitochondriale. Cinq mutations dans ce gène ont été décrites chez des patients parkinsoniens en 2011 [223]. Par contre, la coségrégation n'a pu être démontrée que pour la mutation p.R1205H, retrouvée initialement dans une famille française puis chez des patients américains, canadiens, irlandais, italiens et tunisiens [223].

VI.2.2. Les gènes autosomiques récessifs

VI.2.2.1. Le gène Parkin (PARK2)

Le gène *Parkin* se localise sur la bande cytogénétique 6q25.2-q27 et est composé par 12 exons qui s'étend sur 1.380 kb [224]. *PARK2* code pour une E3 ubiquitine ligase contenant un domaine RING impliqué dans la dégradation des protéines par le protéasome. La *Parkin* est également impliquée pour le contrôle de la qualité mitochondriale par la dégradation des mitochondries endommagées par l'autophagie, ou mitophagie lysosomale [225]. En effet, la *Parkin* est recrutée par les mitochondries endommagées où elle active le système ubiquitin-protéasome (SUP) en vue de la protéolyse de la membrane mitochondriale externe [226].

Le locus *Parkin* a été le second gène lié à la MP et le premier lié à une forme récessive précoce par la découverte d'une délétion de l'exon 4 [227]. Depuis, plus de 204 mutations ont été identifiées incluant des mutations ponctuelles et des réarrangements exoniques (délétions, duplications ou triplications). Les mutations *Parkin* expliqueraient jusqu'à 50% des formes familiales et 18% des formes sporadiques récessives précoces de la MP [228].

Certaines mutations ponctuelles modifient la localisation cellulaire, la solubilité ou la propension à s'agréger de la *Parkin*[229–231]. D'autres mutations entraînent une perte de fonction de la *Parkin*. Les souris KO pour *PARK2* présentent une réduction des protéines de la phosphorylation oxydative mitochondriale, une diminution de la capacité respiratoire mitochondriale et une augmentation des dommages oxydatifs âge-dépendants [232]. La perturbation de l'élimination des mitochondries endommagées (mitophagie) semble être un des mécanismes principaux de la mort neuronale associée à la *Parkin*[232].

Les MP familiales liées à *PARK2* sont typiquement précoces, survenant avant 40 ans avec une progression lente et une bonne réponse à faibles doses de la L-dopa. Mais elles sont caractérisées par la fréquence élevée des signes dystoniques, une perte neuronale importante dans la substantia nigra et l'absence de corps de Lewy dans la majorité des cas [139, 233].

VI.2.2.2. PTEN-Induced Putative Kinase 1: PINK1 (PARK6)

PARK6 a été d'abord localisée sur le chromosome 1p35-p36 dans une grande famille italienne consanguine avec une MP à début précoce à transmission autosomique récessive [234]. Par la suite, *PINK1* (phosphatase and tensin homolog (PTEN)-induced putative kinase a été identifié comme le gène responsable [235]. Le gène *PINK1* code pour une sérine/thréonine kinase mitochondriale située dans la matrice et l'espace intermembranaire [236]. Cette protéine a un rôle essentiel dans l'homéostasie des mitochondries en intervenant dans l'autophagie des mitochondries endommagées ou dépolarisées [237] (Figure 11).

Le potentiel membranaire mitochondrial entraîne l'importation de *PINK1* à travers le complexe TIM où les protéases MPP et PARL clivent la séquence de ciblage mitochondrial de *PINK1* et le domaine transmembranaire entre Ala103 et Phe104. Ce clivage crée une phénylalanine N-terminale libre qui est identifiée par des ligases d'ubiquitine E3 ciblant *PINK1* au protéasome ubiquitine. La dépolérisation des mitochondries ou le blocage de l'importation mitochondriale provoque l'accumulation de *PINK1* sur la membrane mitochondriale externe. Tomm7, une sous-unité accessoire du complexe TOM, retient *PINK1* sur la membrane mitochondriale externe. L'accumulation de *PINK1* provoque le recrutement de la *Parkin* qui sera activée suite à sa phosphorylation par *PINK1*. La *Parkin* ubiquitine des protéines sur la membrane

mitochondriale externes pour l'initiation de l'autophagosome. L'autophagosome est ensuite délivré au lysosome pour dégradation [238].

La déficience en *PINK1* entraîne des anomalies mitochondriales associées au stress cellulaire, un phénotype pathologique, qui peut être amélioré par l'expression accrue de la *Parkin* [239]

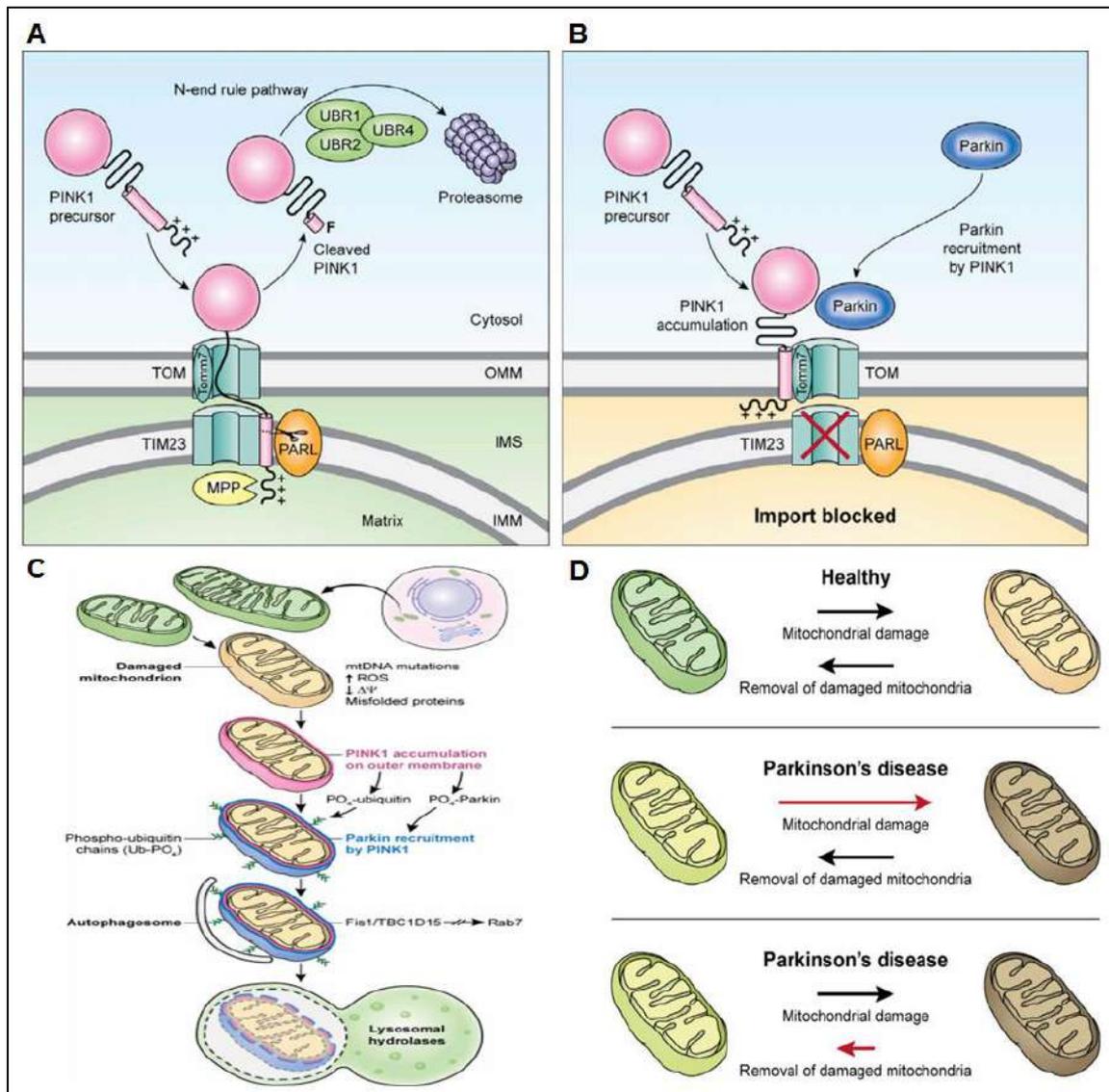


Figure 11. Autophagie des mitochondries endommagées via *PINK1* et *PARK2* [238].

(A) Rôle de *PINK1* et *PARK2* dans le cas d'une mitochondrie normale. *PINK1* est importé au niveau des mitochondries normales où MPP et PARL clivent sa séquence de ciblage mitochondrial puis il sera dégradé par une protéasome ubiquitine. (B) Rôle de *PINK1* et *PARK2* dans le cas d'une mitochondrie endommagée. *PINK1* est retenu par Tomm7 et s'accumule sur les mitochondries endommagées, ce qui va provoquer le recrutement du *PARK2*. (C) Modèle de mitophagie induite par la *PARK2*. Le recrutement du *PARK2* qui initie l'autophagosome. Fis1 est un récepteur sur la membrane externe qui lie deux protéines TBC1D15 / TBC1D17 pour gouverner la membrane d'isolement LC3 pour générer l'autophagosome autour des mitochondries endommagées. L'autophagosome est ensuite délivré au lysosome pour dégradation. (D) L'équilibre entre les mitochondries endommagées et leur phagocytose contribuant à la pathogenèse de la MP.

VI.2.2.3. Le gène Oncogène DJ1 (PARK7)

DJ1 est une protéine cytoplasmique, mais qui peut également se transloquer dans les mitochondries [240]. DJ1 joue un rôle important dans la lutte contre le stress oxydatif [241]. Ses propriétés antioxydantes dépendraient d'un résidu de cystéine en position 106, qui sous forme oxydée forme une liaison disulfure [242].

Des mutations du gène *DJI*, constituent la troisième cause connue de MP récessive précoce. Une délétion des cinq premiers exons du gène et une mutation faux-sens ont été d'abord identifiées dans deux familles consanguines [243]. Les MP liées à *DJI* semblent très rares et ne présentent qu'environ 1% des formes récessives de la MP [143]. Les manifestations cliniques des patients sont similaires à celles observées chez les autres formes causées par *PARK2* ou *PINK1*. Une seule famille italienne présentant un syndrome parkinsonien avec démence et d'une sclérose latérale amyotrophique [244].

VI.2.2.4. Autres gènes rares

- ***ATP13A2/PARK9***: *ATP13A2* est une protéine membranaire lysosomale avec un domaine ATPase qui est principalement exprimée dans le tissu cérébral et surtout dans le mésencéphale ventral [245]. Des mutations homozygotes et hétérozygotes composites dans le gène *ATP13A2* ont été découvertes dans une famille jordanienne et une famille chilienne ayant un syndrome de Kufor-Rakeb [245]. C'est une forme de MP atypique caractérisée par un âge de début très précoce (11-16 ans), un syndrome parkinsonien dopa-sensible, des signes pyramidaux, une démence et une paralysie supranucléaire du regard [246].

- ***PLA2G6/PARK14*** : ce gène a été identifié chez 2 familles non apparentées avec un syndrome parkinsonien avec dystonie. Le trouble était caractérisé par un déclin cognitif progressif rapide, une bradykinésie, une rigidité et une dystonie [247].

- ***FBXO7/PARK15*** : des mutations de la protéine F-box 7 provoquent un syndrome pyramidal qui est également très différent de la MP. Les patients ont une difformité Pied bot depuis l'enfance, développe une spasticité dans les membres inférieurs et parfois les membres supérieurs, et un parkinsonisme sensible à la L-dopa qui se produit après 5 à 20 ans de la apparition de la spasticité [248].

- ***DNAJC6/PARK19*** : ce gène a été identifié chez des familles consanguines qui présentent un parkinsonisme juvénile ou à âge de début précoce. *DNAJC6* parkinsonisme est souvent associée à des troubles cognitifs ou psychiatriques [249–251].

- ***SYNJ1/PARK20*** : en 2013, deux équipes indépendantes ont identifié la même mutation homozygote p.R258G dans le gène *SYNJ1* associée à une MP juvénile dans deux

familles consanguines d'Italie et d'Iran [252, 253]. Les variations entraînant une perte de l'activité phosphatase du *SYNJ1* conduisent à un phénotype sévère d'encéphalopathie épileptique infantile précoce type 53, tandis que les variations entraînant une perte de l'activité de déphosphorylation limitée au domaine Sac1 provoquent une MP juvénile associée généralement à une épilepsie [254].

- **VPS13C** : en 2016, Lesage et al. ont rapporté trois cas sporadique avec des mutations dans le gène *VPS13C*[256]. Les patients avaient tous un phénotype relativement similaire débuté à l'âge de 25, 33 et 46 ans. La progression a été rapide et sévère. Les trois patients ont développé des troubles cognitifs sévères [256].

- **SPG11** : ce gène est responsable de la paraplégie spastique type 11. Une mutation (p.H235RfsX12) a été identifiée chez deux patients d'une famille turque qui ont développé un parkinsonisme à l'âge de 12 et 15 ans respectivement. Les deux patients présentaient un tremblement de repos avec une akinésie légère et une réponse modérée à la L-dopa [257]. Un autre cas une mutation hétérozygote composite (c.3664insT /c.6331insG) a été identifiée avec un parkinsonisme à l'âge de 16 ans [255]. Ce pendant les patients ont rapidement développé une paraplégie spastique type 11 [255].

VII. Pathogénèse moléculaire

La découverte de formes monogéniques a énormément contribué à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la pathogénèse de la MP.

La cause de la mort des neurones dopaminergiques est encore inconnue. Cependant, les preuves actuelles concordent avec l'idée que le stress oxydatif, la dysfonction mitochondriale et la neuroinflammation sont les principaux facteurs impliqués dans l'étiologie de la MP [258–261]. Il a été proposé que divers facteurs génétiques et environnementaux entraînant un dysfonctionnement mitochondrial, provoquent une accumulation anormale de protéines mal codées et la génération de stress oxydatif dans le cerveau des sujets Parkinsoniens [261–263]. Dans la MP, la production d'agrégats de protéines peut perturber le potentiel membranaire mitochondrial et induire un afflux anormal de Ca^{2+} , des activités enzymatiques respiratoires altérées, une génération réduite d'ATP et des niveaux accrus d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). De plus, une libération anormale du cytochrome C par des mitochondries endommagées peut déclencher l'activation des cascades de signalisation apoptotiques et la libération de caspases 3, entraînant la mort des cellules neuronales. La génération de radicaux libres peut alors entraîner la nitrosylation, l'oxydation et la peroxydation d'autres macromolécules contribuant directement à la lésion neuronale [109].

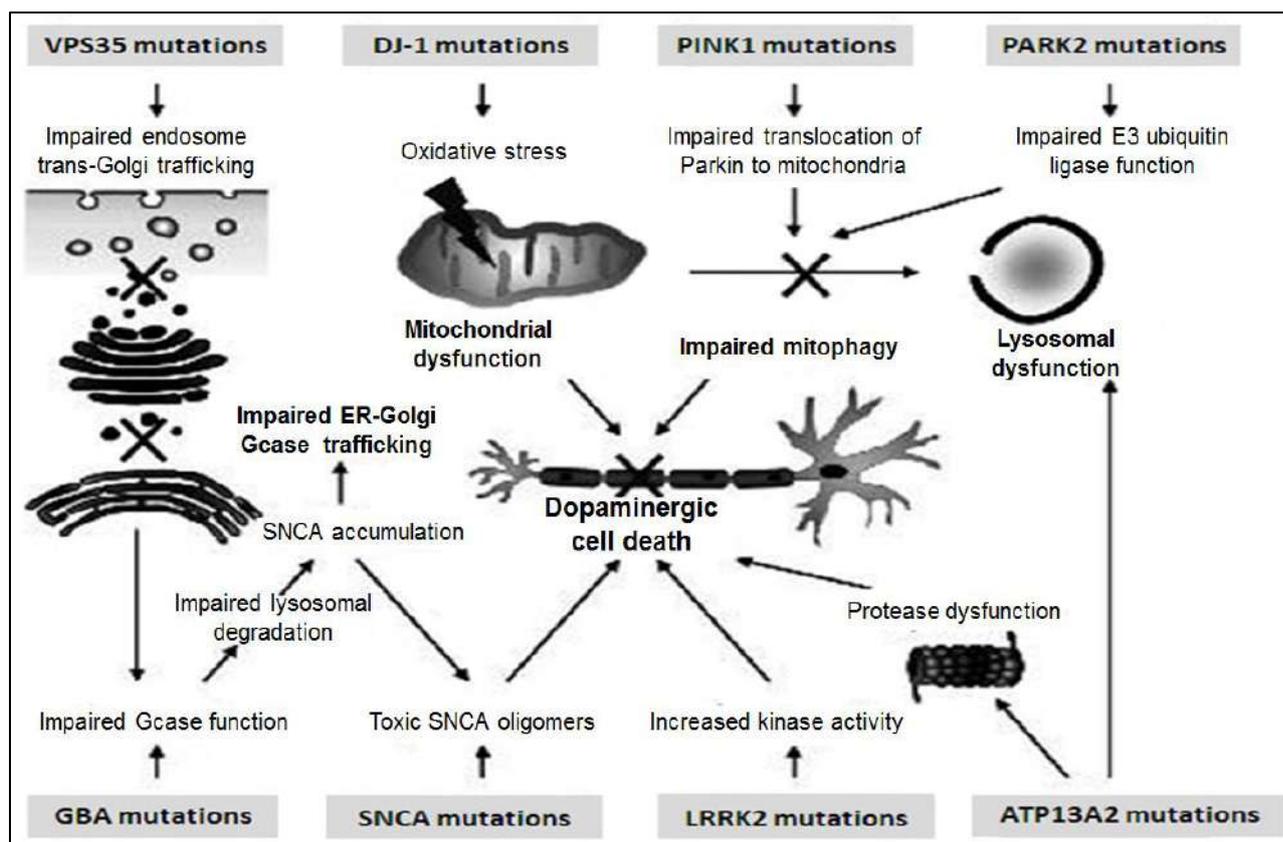


Figure 12. Mécanismes moléculaires impliqués dans la pathogénèse de la maladie de Parkinson [151]. Une déficience du *VPS35* altère l'endocytose vers l'appareil de Golgi et par conséquent le transport de la GCase aux lysosomes. Une déficience de la GCase altère la dégradation de la *SNCA*. L'accumulation de *SNCA*, à son tour, inhibe le transport de la GCase entre le réticulum endoplasmique (ER) et l'appareil de Golgi et l'induction de la mort cellulaire. L'inhibition de la mitophagie causée par des mutations *Parkin* et *PINK1* entraîne un stress oxydatif résultant aussi par des mutations *DJI*.

VIII. Traitement

VIII.1. Dopa thérapie et agonistes dopaminergiques

La dopamine (3,4-dihydroxyphénylalanine) ne pouvant pas directement être utilisée en thérapeutique, du fait de son incapacité à passer la barrière hémato-encéphalique, c'est la L-dopa, son précurseur, qui est utilisée. La L-dopa, découverte dans les années 60, fut une véritable révolution thérapeutique de la MP [264]. La L-dopa est généralement efficace sur les signes moteurs de la maladie, mais elle est responsable de complications motrices, qui apparaissent au bout de quelques années d'évolution [265]. Elle est administrée associée à un agoniste de la décarboxylase pour diminuer sa conversion périphérique en dopamine, et ainsi les effets indésirables qui sont liés à la stimulation des récepteurs dopaminergiques périphériques. La L-dopa peut être initialement avantageusement remplacée par les agonistes

dopaminergiques chez les patients les plus jeunes (avant 60 à 70 ans), afin de retarder l'apparition des complications motrices.

VIII.2. Anti cholinergiques

Aux phases très précoces de la maladie, on peut utiliser transitoirement chez les sujets jeunes les anticholinergiques qui ont surtout un effet sur le tremblement, et l'amantadine, qui a un effet sur le syndrome akinéto-rigide. Ces 2 traitements ont un effet symptomatique très limité. Ils sont représentés par les molécules suivantes : Trihexyphenidyle chlorhydrate et Trihexyphenidyle pour lesquelles nous avons précisé la dose ainsi que la durée de leur prise.

VIII.3. Stimulation cérébrale profonde

Seuls 5 à 10% des patients parkinsoniens seraient candidats à la Stimulation cérébrale profonde (SCP). La SCP s'adresse aux patients :

- présentant une MP idiopathique.
- Se manifestant par des symptômes invalidants malgré un traitement optimisé et/ou présentant des effets indésirables sévères secondaires aux médicaments antiparkinsoniens.
- Présentant une excellente dopasensibilité, c'est-à-dire une excellente réversibilité de la symptomatologie parkinsonienne au maximum d'effets du traitement dopaminergique.
- les patients ne doivent pas présenter : de démence, d'anomalies à l'IRM encéphalique pouvant augmenter le risque hémorragique lors de l'implantation, de troubles psychiatriques florides et non contrôlés.

Trois cibles différentes peuvent être proposées : le noyau sous-thalamique (NST) ; le pallidum interne (GPi) et le noyau intermédiaire du thalamus (Vim). Le choix se porte habituellement sur le NST. Cette approche est remarquablement efficace sur les signes cardinaux de la MP et permet de réduire de 50% les doses en dopamine, diminuant ainsi indirectement les dyskinésies.³ Il s'agit de l'intervention la plus délicate (petites dimensions de la cible) et qui nécessite un suivi neurologique postopératoire rapproché (ajustement fin des paramètres de stimulation et du traitement médicamenteux).

B. La population Tunisienne

I. Historique de la population Tunisienne

I.1. Préhistoire de la Tunisie [266]

Les premières traces de présence humaine en Tunisie datent d'environ 8.000 ans av. JC, à vingt kilomètres à l'est de Gafsa, dans l'oasis d'El Guettar. Cette population est connue sous le nom de « Capsian » (issu du latin Capsa : actuelle Gafsa). Les descendants de la culture capsienne et d'une population autochtone locale préexistante (apparue in situ en Afrique du Nord de culture paléolithique Ibéro-maurusienne) et sont généralement considérés comme "Les Berbères" [267]. Les données archéologiques indiquent une occupation Berbères de l'Afrique du Nord depuis au moins 4500 ans av. JC.

Par son emplacement stratégique au cœur du bassin méditerranéen, la Tunisie a vu une grande variété d'envahisseurs, de migrants et de colons qui comprenaient des Phéniciens (814–146 av. JC), des Grecs, des Romains (146–439 av. JC), des Vandales (439–534 av. JC), des Byzantins. La province d'Afrique a été après abandonnée en grande partie par leurs habitants romains et grecs, et investies par les Berbères descendus des montagnes ou montés du désert. Cependant, le changement le plus important dans l'histoire Tunisienne est dû à l'afflux d'Arabes et de Bédouins qui a conduit à la conversion de la majeure partie de la population originelle à l'Islam et à l'arabisation. La troisième expédition Arabe est menée en 670 par "Oqba Ibn Nafi" qui a fondé la ville de Kairouan ainsi que sa Grande mosquée. Cette ville devient la base des expéditions contre le nord et l'ouest du Maghreb. Les Arabes ne se contentent pas d'occuper la côte et entreprennent de conquérir l'intérieur du pays. L'onzième siècle a été marqué par l'arrivée d'environ 400000 Bédouins appartenant aux tribus orientales de Beni Hilal et Beni Souleim. Le deuxième événement démographique le plus important de l'histoire récente de la Tunisie était l'arrivée des Morisco andalous, expulsés d'Ibérie au début des années 1600. Plus de 80000 Andalous se sont installés dans la partie la plus septentrionale de la Tunisie comme le village de Zaghuan. Pendant la période coloniale (vers 1881-1921), environ 116000 Européens (d'Italie, d'Espagne, de Malte, de Grèce, d'Autriche, de Russie et de Belgique) vivaient en Tunisie, dont environ 99000 dans la capitale, Tunis. Dans le même temps, la Tunisie était un refuge pour les Marocains, les Algériens et les Libyens.

1.2. La Tunisie d'aujourd'hui

La population tunisienne actuelle est composée d'un ancien fond berbère et des influences des différentes civilisations établies dans cette région à l'époque historique. Les seules populations berbères qui ont échappé à l'influence Arabe sont des tribus qui ont été forcées de retourner dans les montagnes ou de s'installer dans des villages reculés du nord et du sud de la Tunisie et de maintenir leurs structures tribales. En résultat, dans la Tunisie actuelle, on distingue deux grandes tribus berbères : le Zenata et le Ketama [268]. Ces tribus représentent à nos jours le 1 % de la population qui parlent encore le "chelha" (langue berbère) situés principalement dans les villages semi-berbérophones du sud (Chenini, Douiret, Matmata, Tamezret), ainsi que dans quelques villages de l'île de Djerba (Guellala/Iquallalen, Ajim, Sedouikech/Azdyuch et Ouirsignen/At Ursighen) [269, 270]. De nos jours, les familles andalouses sont souvent identifiables par leurs noms, comme Zbiss, Marco et Blanco [269]. Actuellement, la quasi-totalité de la population parle l'arabe tunisien qui est influencé par les langues des peuples ayant vécu ou administré cette région au cours de l'histoire, dont notamment l'arabe, le turc, l'italien, l'espagnol et le français.



II. Structure génétique de la population Tunisienne

Depuis 10 ans une nouvelle forme de généalogie a été développée et a été considérée comme une alternative probante aux reconstructions préhistoriques à base de fossiles. Il s'agit de la généalogie génétique, c'est-à-dire l'utilisation de l'ADN pour l'identification de nos ancêtres. La classification des haplogroupes humains basée sur les marqueurs génétiques a rapidement évolué. Parmi les différents marqueurs génétiques disponibles actuellement, les plus intéressants sont les séquences d'ADN héritées unilatéralement d'un seul des parents : l'ADN mitochondrial (ADNmt) et le chromosome Y.

II.1. Les différents haplogroupes du chromosome Y

II.1.1. L'arbre phylogénétique du chromosome Y

Le chromosome Y présente une grande partie centrale non recombinante qui lui est spécifique [271]. Par conséquent, comme le chromosome Y ne se transmet que du père en fils, la partie non recombinante est idéale pour en déterminer une phylogénie à travers le monde et évaluer les origines de la diversité de la population. En 2000, Underhill et ses collaborateurs ont commencé à étudier les haplogroupes du chromosome Y [272, 273]. Ces haplogroupes sont définis par une série d'allèles situés sur la partie non-recombinante du chromosome Y. Un ensemble de 218 polymorphismes a été utilisé pour construire une généalogie parcimonieuse [274] (Figure 14). Un total de 131 haplotypes uniques a été défini qui retracent la trajectoire évolutionnaire mondiale de la diversité génétique humaine moderne (Figure 14) [272, 273]. Le chromosome porté par "Adam" a été représenté comme la racine de tous les lignées. L'Haplogroupe A et l'Haplogroupe B représentaient les lignées des deux descendants mâles d'Adam.

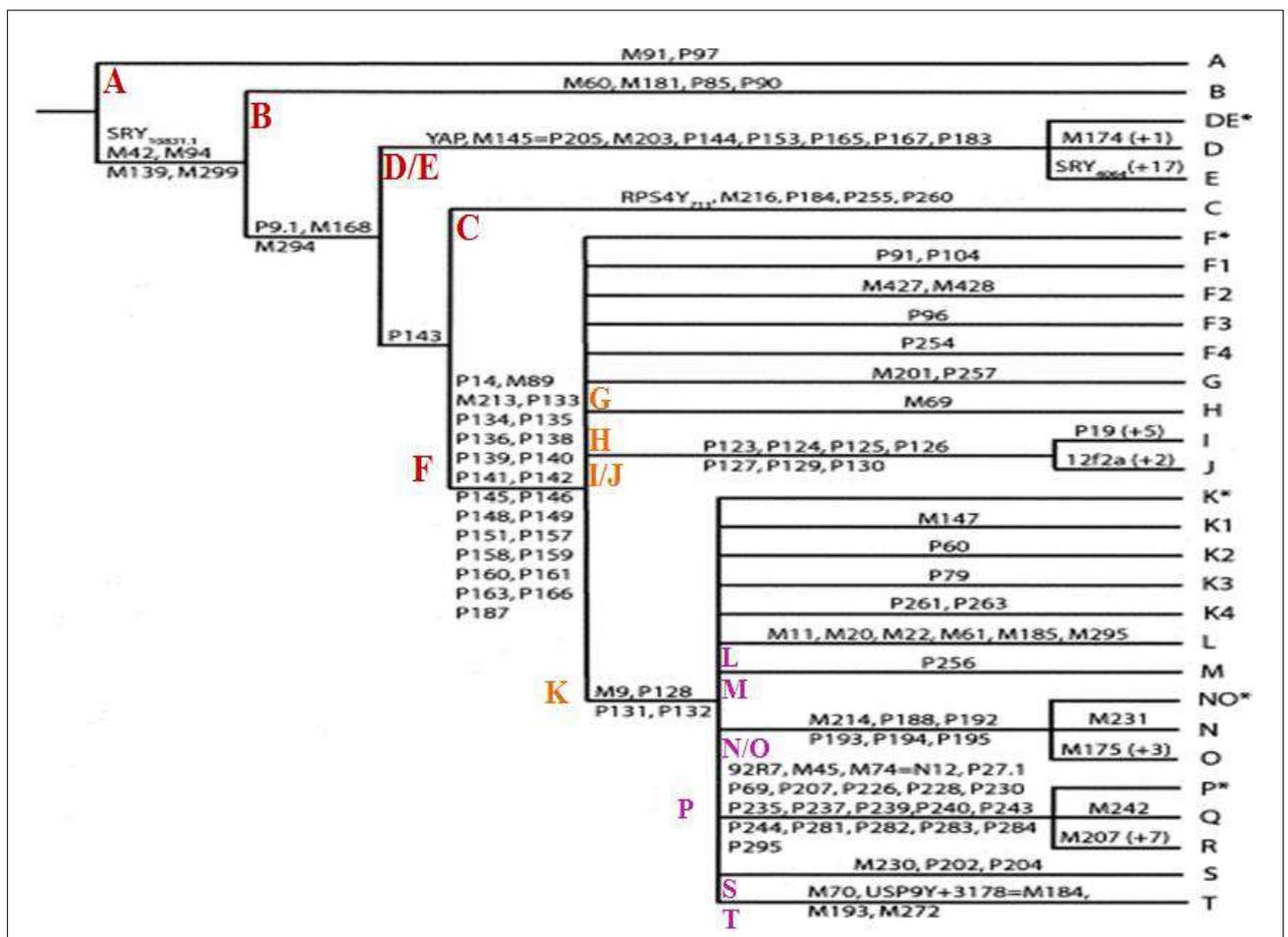


Figure 14. L'arbre phylogénétique du chromosome Y défini par les SNPs caractéristiques de chaque haplogroupe [275].

- **L'haplogroupe A** : Il est originaire d'Afrique subsaharienne il y a plus de 140000 ans [275]. Les populations modernes avec les pourcentages les plus élevés d'haplogroupe A sont les Khoisan (comme les Bushmen) et les Sud-Soudanais [275]. Le clade A semblé être défini par seulement deux marqueurs qui sont M91 et P97 [272].
- **L'haplogroupe B** : L'haplogroupe B est défini par le SNP (M60). L'origine et la plus grande diversité de ce clade se trouvent en Afrique et les populations Pygmées présentent la fréquence la plus élevée [272].
- **L'haplogroupe C** : L'haplogroupe C est une lignée extrêmement ancienne dont on pense qu'elle est apparue avant ou peu après la première migration de l'Homo Sapiens en dehors de l'Afrique, il y a environ 66000 ans [276]. Les hommes appartenant à l'haplogroupe C seraient partis d'Afrique de l'Est pendant l'ère glaciaire et auraient suivi les côtes de l'océan Indien, s'installant dans la péninsule arabique, le sous-continent indien, l'Asie du sud-est, l'Asie du nord-est et l'Océanie [276].
- **L'haplogroupe D** : Deux SNPs définissent ce clade (M174 et JST021355) [273]. L'Haplogroupe D n'été trouvé nulle part en dehors de l'Asie, le lieu probable d'origine. Les lignées D se rencontrent le plus souvent en Asie centrale (Tibet) et au Japon, et sont également présentes à basse fréquence en Asie du Sud-Est et chez les Andamaniens [273].
- **L'haplogroupe E** : L'insertion d'une séquence alu (YAP ou M1) est la mutation caractéristique de ce clade qui est apparu en Afrique du Nord il y'a 62,500 ans[273]. Par contre il y a un total de 83 SNPs qui marquent ses 56 sous haplogroupes distincts [274]. Ils peuvent être trouvés à des fréquences élevées en Afrique, à des fréquences modérées au Moyen-Orient et en Europe du Sud, et occasionnellement en Asie centrale et du Sud [273].
- **L'haplogroupe F** : L'haplogroupe F est défini par la variation (M89). Il a été observé principalement sur le sous-continent indien à une fréquence faible ou modérée [274]. Il est dérivé de la même branche que l'haplogroupe C et il est l'haplogroupe ancestral des haplogroupes G, H, I, J, K, F1, F2, F3, F4 et F*.
 - **L'haplogroupe G** : Il est défini par deux SNPs (M201 et P257) et apparu il y a 48,000 ans. Le clade G n'est pas largement distribué, étant présent principalement au Moyen-Orient, en Méditerranée et dans les montagnes du Caucase [274].
 - **L'haplogroupe H** : L'haplogroupe H est défini par l'état dérivé au niveau d'un seul marqueur (M69). Sa distribution est entièrement limitée au sous-continent indien [273].
 - **L'haplogroupe I** : Le clade I (M170), apparu il y a 43,000 ans, représente l'un des deux principaux Y-haplogroupes européens et il est pratiquement absent ailleurs [277]. Le

sous-clade I1 se trouve principalement en Europe du Nord [278]. Le sous-clade I2 est l'haplogroupe le plus fréquent en Europe de l'Est et dans les Balkans [278].

- **L'haplogroupe J** : Trois polymorphismes (12f2a, M304 et P209) définissent ce clade. Le sous-clade J-M172 (J1) étant l'haplogroupe J le plus répandu en Europe. Il est apparu il y a 13200 ans autour de la région du Caucase et de l'Anatolie orientale. Le sous-clade J-M267 (J2) est apparu au Moyen-Orient il y a 22.000 ans. Il prédomine au Moyen-Orient, Afrique du Nord et Ethiopie [279].
- **L'haplogroupe K** : L'haplogroupe K (M9) est apparu en Iran ou en Asie centrale il y a environ 46,000 ans [273]. Il est l'haplogroupe ancestral des haplogroupes L, M, NO, N, O, P, Q, R, S et T.
 - **L'haplogroupe L** : Il est défini par six SNPs (M11, M20, M22, M61, M185 et M295). La majorité des haplogroupes L se trouvent sur le sous-continent indien. Les chromosomes de l'haplogroupe L sont également présents au Moyen-Orient, en Asie centrale, en Afrique du Nord et en Europe le long de la côte méditerranéenne [273].
 - **L'haplogroupe M** : la répartition géographique de l'haplogroupe M est limitée à l'Océanie proche et lointaine et à l'Indonésie orientale. La branche M-P87* est presque entièrement limitée à la Mélanésie [280].
 - **L'haplogroupe N** : l'haplogroupe N est défini par un SNP nouvellement découvert (M231). Apparu il y a plus de 20000 ans, ce clade se retrouve principalement en Eurasie septentrionale [277].
 - **L'haplogroupe O** : Ce clade très diversifié, est défini par quatre SNPs (M175, P186, P191 et P196) et contient 30 sous-haplogroupes. Le clade O est l'haplogroupe majeur en Asie de l'Est. Il est également présent en Asie centrale et en Océanie à des fréquences moyennes ou basses [273].
 - **L'haplogroupe P** : L'haplogroupe P se compose de deux lignées Q et R largement distribuées :
 - **L'haplogroupe Q** : Il est défini par la mutation M242. Il est subdivisé en 13 sous-haplogroupes marqués par 17 SNPs. L'Haplogroupe Q est largement répandu en Eurasie du Nord et se retrouve à haute fréquence dans certains groupes sibériens et à basse fréquence en Europe, en Asie de l'Est et au Moyen-Orient. Le sous-clade Q-M3 (Q1a3a) étant presque entièrement limité aux Amériques [281].

- **L'haplogroupe R** : l'haplogroupe R (M207) est subdivisé en 28 sous-clades. Il représente le deuxième haplogroupe principale en Europe avec l'haplogroupe I [273].
- **L'haplogroupe S** : Le clade S (M230) est principalement présent en Océanie et en Indonésie[280].
- **L'haplogroupe T** : Clade T est défini par quatre marqueurs (M70, M193, M272 et M184). Il a été observé à basse fréquence au Moyen-Orient, en Afrique et en Europe [273].

II.2. Distribution à travers le monde des Y-haplogroupes

- Afrique du Nord : Haplogroupe E (sous-clade E1b1b1), J (J1, J2) et R (R1b)
- Afrique subsaharienne : Haplogroupe E, A (Sud-Soudanais), B (Pygmées), J (Ethiopie), R (sous-clade R1b-V88)
- Europe du Nord : Haplogroupe I (sous-clade I1) et N (sous-clade N1)
- Europe de Sud : Haplogroupe R (sous-clade R1b), E, L (côte méditerranéenne), S
- Europe de l'Est : Haplogroupe I (sous-clade I2), R (sous-clade R1a)
- Europe de l'ouest : Haplogroupe G
- Asie centrale : Haplogroupe D (Tibet), L, J, O, R (sous-clade R1a)
- Asie du nord : Haplogroupe N, Q (sibérie)
- Sous-continent indien: Haplogroupe C, F, H, J, K, L, Q, R (sous-clade R1a)
- Asie de l'Est : Haplogroupe C, D (Japon), K, O, Q
- L'Océanie : Haplogroupe C, K, M (Mélanésie), O, S
- Moyen orient : Haplogroupe E, G, J (sous-clade J1), L, T
- Asie de l'Ouest : Haplogroupe G (Caucase), L, R (sous-clade R1a)
- Australie : Haplogroupe K, C, R
- Amérique du Nord : Haplogroupe Q, R (sous-clade R1b1b)
- Amérique du sud : Haplogroupe Q (sous-clade Q1a3a)

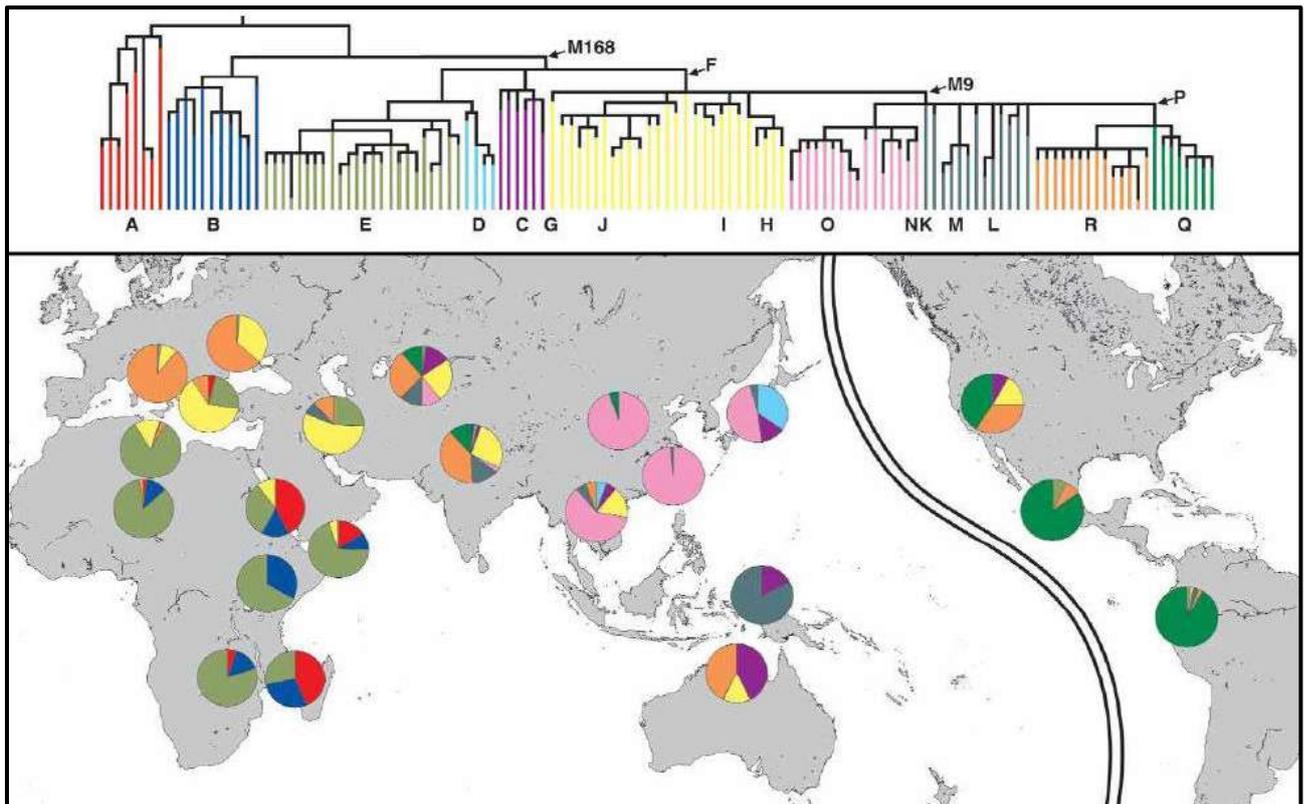


Figure 15. Distribution à travers le monde des haplogroupes Y-ADN [272, 273].

II.3. Structure génétique de la population Tunisienne révélée par les lignées paternelles

Bien que de nombreux Tunisiens s'identifient comme Arabes, ils descendent principalement de groupes berbères avec une contribution substantielle phénicienne/punique, arabe et occidentale [282]. De nombreuses études ont tenté de décrire la structure génétique de la population tunisienne en utilisant différents marqueurs autosomiques:

- Les allotypes d'immunoglobulines (GM et KM) [283, 284],
- Les polymorphismes HLA de classe II [285, 286] : HLA-DRB1 and -DQB1
- Court répétitions en tandem (STR) [287, 288]
- Les insertions polymorphes d'Alu [289, 290]
- Court répétitions en tandem (STR) marqueurs STR et chromosome Y [291].

Ces résultats ont suggéré une certaine diversité inter-population en Tunisie par rapport à l'Europe et à l'Afrique subsaharienne. Par contre, ces études ont été limitées à l'île de Djerba.

D'une autre part, l'analyse du chromosome Y de 159 hommes sains non apparentés appartenant aux communautés suivantes: un échantillon urbain d'arabophones de la capitale Tunis (n = 33); une communauté "andalouse" (Zaghouan n = 32); et quatre petites communautés berbères (Sened n = 35, Jradou n = 32, Chenini-Douiret n = 27) ; a montré que

la lignée la plus commune était l'haplogroupe nord-africain Berbère E-M81 (71%) et le sous-haplogroupe d'origine Proche-Orient (J-M267 supérieure à 29%) [269, 292]. Cependant, aucune influence majeure en Afrique sub-saharienne ou en Europe n'a été trouvée.

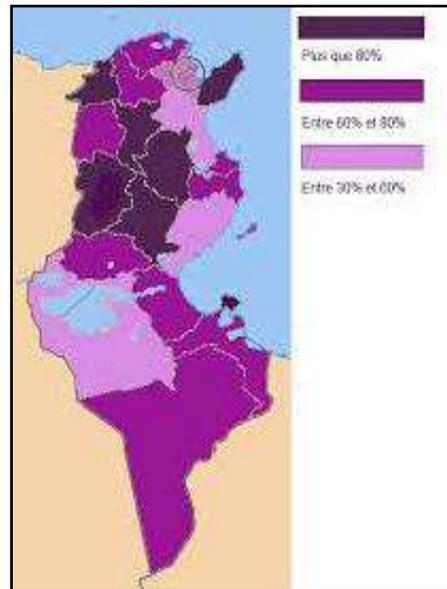


Figure 16.Répartition géographique de l'haplogroupe E1b1b1b d'origine berbère en Tunisie [269, 292].

Patients & Méthodes

I. Cohorte d'étude

- Patients : Notre étude a porté sur 250 patients atteints par la maladie de Parkinson appartenant à 245 familles différentes. Les données épidémiologique, cliniques et les échantillons sanguins ont été collectés auprès du:
 - Service de Neurologie de l'Hôpital Habib Bourguiba de Sfax : 189 patients
 - Service de Neurologie de l'Hôpital Razi Mannouba : 61 patients
- Témoins : Nous avons recruté 60 témoins sains non apparentés (60% des hommes). Aucune histoire de maladie neurodégénérative n'a été mentionnée pour ces témoins. Ils étaient essentiellement originaire du sud Tunisien. L'âge moyen des témoins est de 56 ans.

1.1. Recrutement et collecte des données

Le recrutement des patients était d'une façon aléatoire et non ciblé. Tout patient qui répond au critère du diagnostic de la MP selon la société internationale de Parkinson et les troubles de mouvements (International Parkinson and Movement Disorder Society : MDS) a été inclus dans notre étude [65]. La présence de signes d'alerte ou de drapeaux rouges pouvant mettre en doute le diagnostic de la MP ou l'existence probable d'une autre étiologie pouvant expliquer les signes observés ont été considérées comme des critères d'exclusion [66].

Le recueil de toutes les données ainsi que l'évaluation clinique des patients ont été réalisés par le même investigateur. Tous les patients ont accepté de donner un consentement écrit pour participer à l'étude. Nous avons établi une fiche de diagnostic individuelle (Annexe 1) afin de recueillir les données épidémiologiques, cliniques et para cliniques de chaque patient. Cette fiche de diagnostic comportait les éléments suivants :

- Les données épidémiologiques : l'âge, le sexe, l'origine géographique, les antécédents personnels et familiaux, les habitudes, le pedigree de la famille
- Critères de diagnostics cliniques de la maladie de Parkinson selon la MDS : syndrome parkinsonien et critères d'exclusion
- L'âge et les symptômes de début de la maladie
- La durée d'évolution
- Signes moteurs actuels lors de l'examen : tremblement de repos, akinésie, hypertonie plastique, instabilité posturale évaluée par l'épreuve de la poussée
- Signes non-moteurs : identifier à l'aide d'un bref questionnaire évaluant les douleurs et les signes sensitifs (crampes et contractions musculaires brûlures, syndrome des jambes sans repos, douleurs), les troubles du sommeil (insomnie, fragmentation du sommeil), les troubles neurovégétatifs (hypersudation, troubles digestifs, troubles

vésicosphinctériens, troubles urinaires, hypotension orthostatique), les troubles cognitifs (score MMSE), troubles psychiatriques (échelle de dépression Beck)

- Traitement : dose, réponse au traitement, complications (fluctuations motrices, phénomène ON-OFF, dyskinésie), agonistes
- Scores cliniques moteurs réalisé en phase « ON » après l'administration du traitement pour évaluer la sévérité de la maladie (UPDRS III et stage Hoehn et Yahr).

I.2. Données épidémiologiques

Les 250 patients provenaient du sud, centre et du nord tunisien. La plupart (n=155, 62%) étaient originaires du gouvernorat de Sfax. La répartition géographique des patients est détaillée dans la Figure 17.



Figure 17. Répartition géographique des patients.

Notre cohorte avait un âge moyen relativement jeune et la majorité des patients est issue d'un milieu rural où les mariages consanguins sont fréquents (Tableau 1).

Tableau 1. Les données démographiques et épidémiologiques de notre cohorte

Données démographiques	
Age moyen	61.78 ± 12.8 ans
Age de début moyen	54 ± 12.74 ans [16-81 ans]
Taux de consanguinité	55,70%
Sexe mâle	61%
Cas familiaux	44%
Cas avec âge de début précoce (<50ans)	34%

I.3. Données cliniques

I.3.1. Age de début

Selon l'âge de début de la maladie, les patients étaient subdivisés en 3 groupes:

- Parkinson juvénile : les premiers symptômes de la MP apparaissent ≤ 30 ans,
- Parkinson à début précoce : l'âge de début de la maladie ≤ 50 ans,
- Parkinson à début tardif ou parkinson idiopathique : l'âge de début de la maladie > 50 ans.

La répartition des différentes formes cliniques de la maladie en fonction de l'âge de début sont résumées dans la Figure 18.

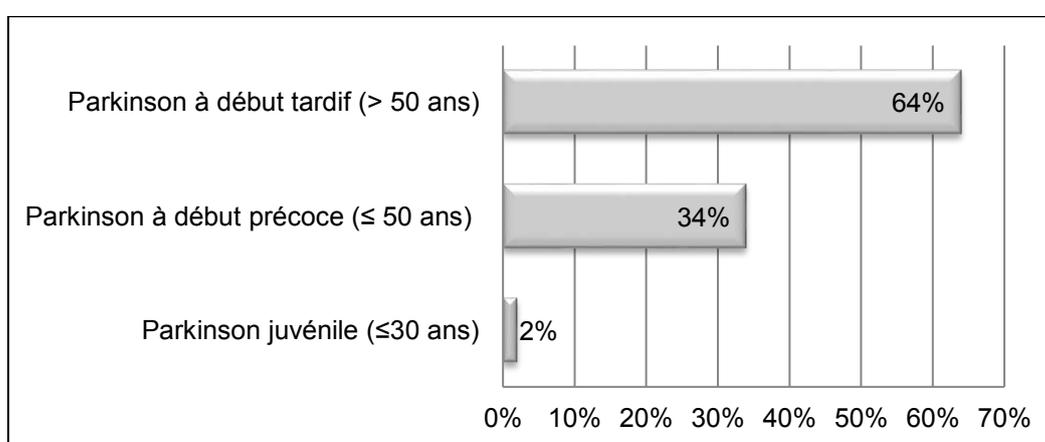


Figure 18. Répartition des formes de la MP selon l'âge de début dans notre cohorte.

I.3.2. Scores cliniques

L'examen neurologique a été réalisé après une durée d'évolution moyenne de 5 ans [3 mois - 43 ans] et sous traitement en période « ON ». Nous avons procédé à l'évaluation du degré de sévérité de la maladie et le degré d'autonomie des patients ainsi que le retentissement des différents symptômes de la MP sur la vie quotidienne et sur la qualité de vie. La recherche des signes associés et des complications de la MP a été réalisée par l'interrogatoire et confirmée par l'examen clinique et l'utilisation dans certains cas d'échelles cliniques et de tests standardisés.

I.3.2.1. Score UPDRS III

Ce score évalue les symptômes moteurs et leur intensité au moment de l'examen sur la base de 27 items (Total /108):

- Tremblement de repos : Présence du tremblement au repos et son siège (membre supérieur (MS), membre inférieur (MI), région péribuccale...).
- Akinésie :

- Un faciès figé.
- Une rareté du clignement des paupières.
- Des signes à la marche: une diminution du balancement des bras, une marche à petits pas, un freezing, une lenteur des gestes.
- Un ralentissement des mouvements alternatifs par les manœuvres suivantes : opposition pouce-index, ouverture - fermeture de la main et la marionnette.
- Etude de la voix et de sa fluence.
- Des troubles de l'écriture avec micrographie.
- **Hypertonie plastique:**
 - Son siège.
 - L'existence d'une rigidité plastique en tuyau de plomb.
 - Le renforcement de la résistance par à-coups successifs ou le phénomène de la roue dentée.
 - La diminution du ballancement des mains.
 - Le test du poignet figé duFroment.
- **Autres signes :**
 - Une exagération des réflexes de posture.
 - Une instabilité posturale évaluée par l'épreuve de la poussée.

1.3.2.2. Hoehn and Yahr scale

Ce score évalue la sévérité globale du syndrome parkinsonien (5 stades).

1.3.2.3. MMSE

Les troubles cognitifs ont été estimés à l'aide de la version arabisée du MMSE (Annexe 2). Tout score MMSE supérieur ou égal à 21 pour les patients avec un niveau scolaire collègue (<6 ans d'étude), 23 pour un niveau secondaire (6-13 ans d'étude) et 24 pour un niveau universitaire supérieur (> 13 ans) a été considéré comme normal [293].

1.3.2.4. Beck Depression Inventory

La dépression a été évaluée par l'échelle de Beck (Annexe 3). Pour nos patients adultes et non hospitalisés, la dépression est considérée seulement quand le score est supérieur ou égal à 20 (sévèrement déprimés) [294].

1.3.3. Traitement

La dose quotidienne équivalente de lévodopa a été calculée selon la table de conversion proposée par Tomlinson et al. [295]. Pour déterminer le degré d'amélioration, le score UPDRS a été calculé le matin avant la prise du médicament et toutes les 30 minutes après l'ingestion

du traitement jusqu'à l'obtention du score UPDRS le plus bas. Le pourcentage d'amélioration a été calculé comme suit:

$$\% \text{ Amélioration} = \frac{\text{UPDRS de base} - \text{UPDRS le plus bas après le médicament}}{\text{UPDRS de base}} \times 100$$

1.3.4. Symptômes non moteurs

Les fonctions autonomiques et sensorielles et le sommeil ont été systématiquement évalués par un bref questionnaire et rapportés dans la fiche individuelle de diagnostic.

1.3.5. Classification des patients en fonction de la forme clinique

Les patients ont été classés en sous-types moteurs selon la méthodologie décrite précédemment [296]. On se basant sur l'UPDRS III, nous avons calculé un score moyen de huit éléments du tremblement (auto-évaluation du tremblement, tremblement du menton, tremblement au repos des bras droit et gauche, tremblement au repos des jambes droite et gauche et tremblement d'action des bras droit et gauche à l'examen), ainsi qu'un score moyen de cinq items de l'instabilité posturale et le trouble de la démarche PIGD (chute, congélation, difficulté à marcher, démarche et instabilité posturale à l'examen).

Un rapport du score de tremblement divisé par le score PIGD a été ensuite calculé. À l'aide de ce score, les patients ont été classés en trois groupes:

- Le phénotype tremblant (TD) : ratio $\geq 1,5$
- Le phénotype de l'instabilité posturale et le trouble de la démarche (PIGD) : ratio ≤ 1
- Les phénotypes indéterminés : ratio entre 1-1,5

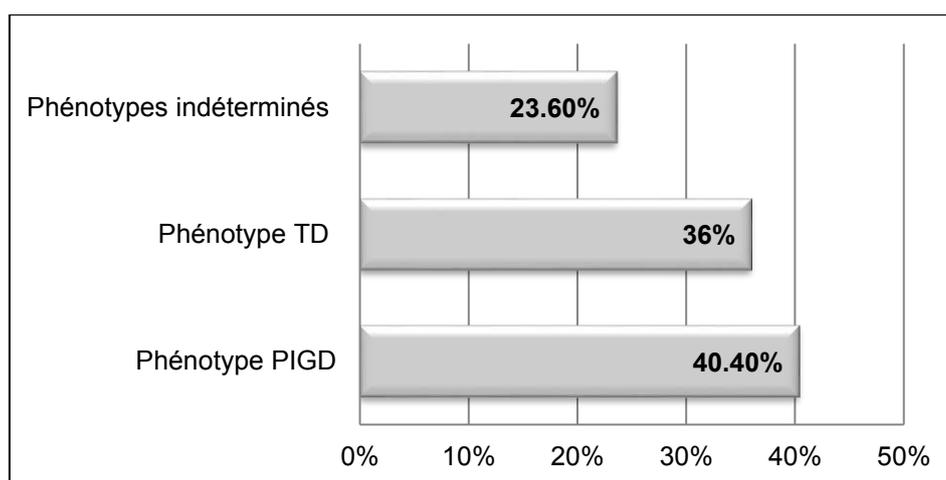


Figure 19. Répartition des malades selon les formes cliniques motrices dans notre cohorte classée en se basant sur le score UPDRS-III.

II. Méthodes

II.1. Stratégie générale d'étude

Au cours de notre étude, nous nous sommes intéressés à l'étude moléculaire des gènes impliqués dans la maladie de Parkinson. Etant donné que la mutation p.G2019S sur le gène *LRRK2* est la mutation la plus fréquente dans la population Nord-Africaine [191]; nous avons criblé cette mutation en première étape par la méthode de Taqman. Chez les porteurs de la mutation p.G2019S, nous avons étudié le phénotype associé à cette mutation et les facteurs qui peuvent influencer l'âge de début de la maladie. Puis, nous avons recherché d'autres mutations causales au niveau des 22 gènes impliqués dans la MP par Target sequencing. Les CNVs et les mutations identifiées ont été validés par MLPA et séquençage Sanger respectivement. Vu qu'il existe plusieurs pseudogènes du gène *GBA* qui peuvent gêner sa capture au cours du Target sequencing, les exons et les régions introniques de ce gène ont été séquencés chez tous les patients par la méthode de Sanger. Nous avons aussi recherché l'effet fondateur et l'origine ethnique des deux mutations fondatrices *LRRK2*-p.G2019S et *PINK1*-p.Q456*. Finalement la recherche des nouveaux gènes impliqués dans la maladie de Parkinson a été réalisée par exome sequencing chez des patients consanguins ayant un âge de début de la maladie inférieur à 40 ans.

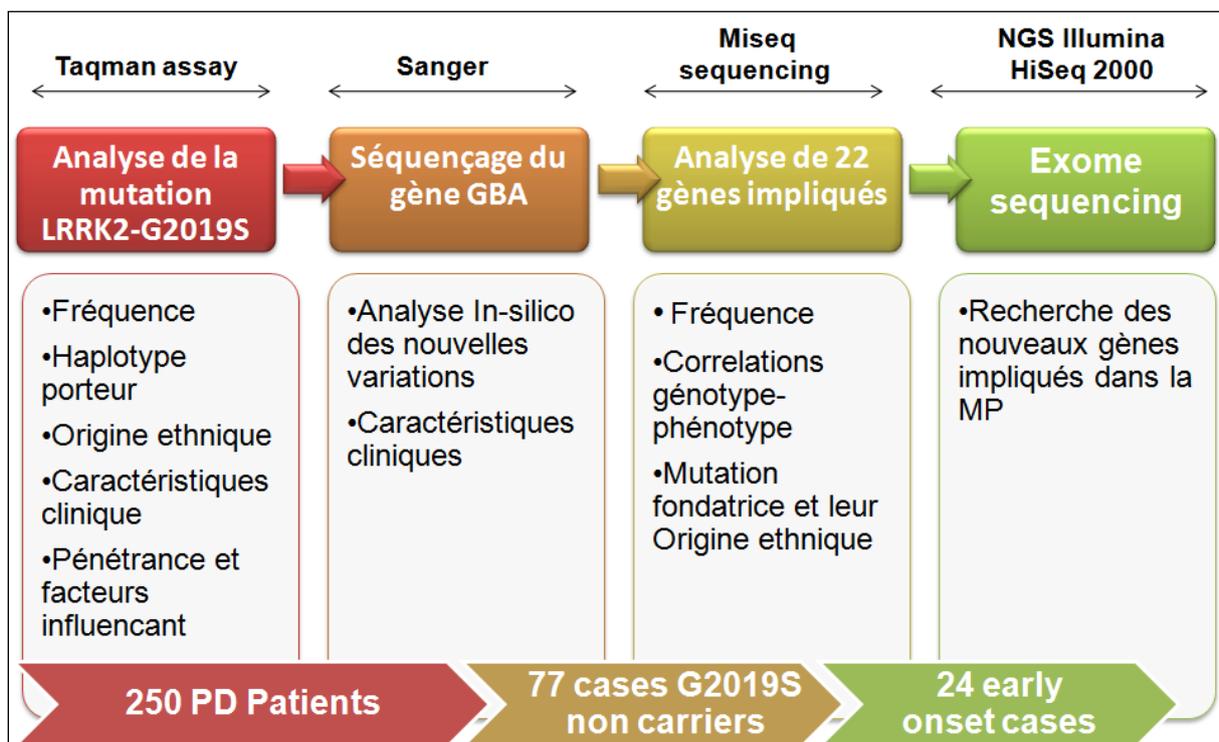


Figure 20. Stratégie générale de l'étude génétique de la MP dans notre cohorte.

II.2. Extraction de l'ADN génomique total à partir du sang

L'extraction de l'ADN total a été faite à partir de 10ml du sang prélevé sur l'agent anticoagulant EDTA. La lyse des globules rouges a été réalisée pendant 20min dans 40ml de tampon de lyse rouge (1X). Une centrifugation pendant 10min à 3500rpm a permis la récupération des globules blancs dans le culot qui a été suspendu dans 5ml de tampon de lyse des noyaux (1X). L'ensemble a été homogénéisé pendant 20min sur un rotor. La déprotéinisation de la solution a été réalisée au moyen de 5ml du phénol/chloroforme suivit d'une homogénéisation pendant 10min sur un rotor. La séparation des phases a été faite par centrifugation pendant 10min à 3500tr/min. La phase aqueuse a été récupérée et l'ADN a été précipité en ajoutant deux volumes d'éthanol absolu (10ml). La méduse d'ADN observée, a été lavée avec une solution d'éthanol-TE (80% ; 20%), puis séchée pendant environ 1 heure. L'ADN a été suspendu ensuite dans une solution TE et conservé à - 20°C.

La composition des tampons utilisés est la suivante :

- Tampon de lyse des globules rouges (pour préparer un litre d'une solution 20X) : NH₄Cl 155mM (165,8g) ; KHCO₃ 10mM (20g) ; EDTA (0.5M pH=7,4) 40ml.
- Tampon de lyse des noyaux (pour préparer un litre d'une solution 1X): Acétate de Lithium dihydrate (CH₃COOLi·2H₂O) 0,3M (35g) ; NaEDTA 1mM (10 ml d'une solution 100mM) ; Tris-HCl 10mM (10ml d'une solution 1M pH=8) ; SDS 20g après autoclavage.
- TE: Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM.

La qualité de l'ADN a été contrôlée par visualisation sur gel d'agarose 0.8 % et la concentration a été mesurée en utilisant un spectromètre à UV pour des micro-volumes (NanoDrop™ 8000 Thermo Scientific) selon les recommandations des fournisseurs. La pureté de l'ADN a été estimée par la mesure du rapport DO260nm/DO280nm dont une valeur comprise entre 1,8 et 2 est synonyme d'un ADN pur. Les ADNs contaminés par le phénol ou des protéines ont été purifiés en utilisant le kit « Genomic DNA Clean & Concentrator® - Zymo Research » selon le mode opératoire recommandé par le fournisseur.

Pour utilisation en Target ou exome sequencing, les ADNs ont été dosés par un fluomètre (Qubit, Quant-iT kits, Invitrogen).

II.3. Criblage de la mutation *LRRK2-p.G2019S* par Taqman

La mutation p.G2019S sur le gène *LRRK2a* a été criblée chez tous les patients par la technique de Taqman en utilisant un ensemble de sondes et d'amorces spécifique (TaqMan® Assays

and Arrays : catalogue number 4351379). La sonde spécifique à la séquence sauvage a été marquée par un fluorophore VIC à son extrémité 5', alors que la sonde spécifique à la séquence mutée a été marquée par un fluorophore FAM. La réaction a été réalisée dans un volume final de 5µl contenant 0.25µl des sondes spécifiques, 2.25µl Applied Biosystems™ TaqMan™ Multiplex Master Mix, 0.5µl H₂O-DEPC, 2 µl ADN (20ng/µl). Le génotypage a été fait dans un appareil Applied Biosystems™ 7500 Fast Dx Real-Time PCR selon le programme suivant : 95°C pendant 30s, 50 cycles : 3s à 95°C, 30s à 60°C.

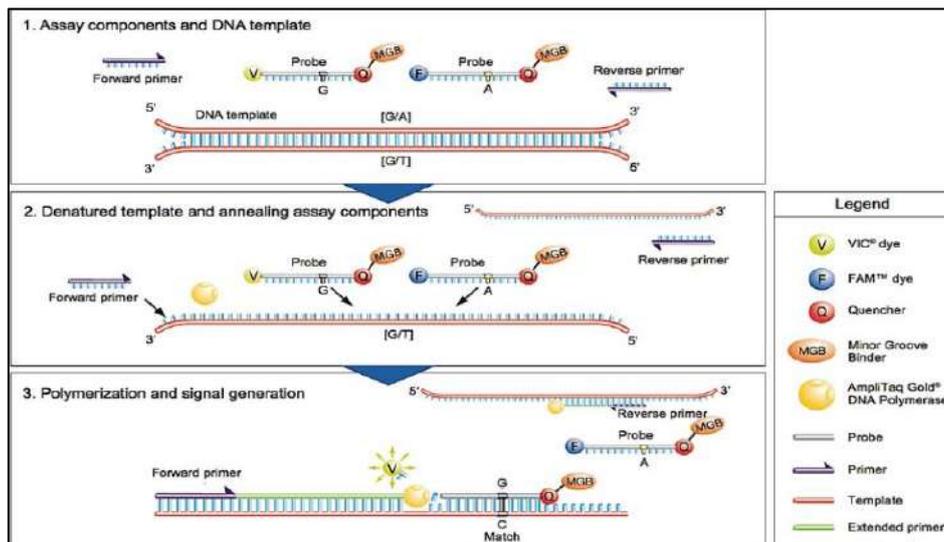


Figure 21. Principe de la technique de Taqman utilisée pour le génotypage de la mutation p.G2019S.

II.4. Double capture de Target Sequencing et Next Generation Sequencing

Parmi les patients non porteurs de la mutation p.G2019S, les cas familiaux ou sporadiques avec un âge de début de la maladie précoce (77 cas) ont été le sujet d'analyse de 22 gènes impliqués dans la MP par Target sequencing. Les gènes ciblés étaient : *ATP13A2*, *DCTN1*, *DNAJC13*, *DNAJC6*, *SPG11*, *EIF4G1*, *FBXO7*, *GBA*, *GCH1*, *LRRK2*, *PANK2*, *PARK2*, *DJ-1*, *PINK1*, *PLA2G6*, *POLG*, *SNCA*, *SYNJ1*, *TH*, *UCHL1*, *VPS13C* et *VPS35*. Le design des sondes spécifiques contre tous les exons codants des 22 gènes a été réalisé en utilisant le logiciel NimbleDesign1 et la longueur des amplicons variait entre 250 et 500 pb. Le kit custom Design KAPPA Library Preparation Kit (Roche) a été utilisé pour hybrider et double capturer les séquences d'ADN cibles. La librairie des échantillons d'ADN multiplexés a été séquencée directement sur le séquenceur MiSeq Illumina. Un run de 24 échantillons a été effectué en suivant les étapes suivantes (Figure 22):

- Fragmentation de l'ADN génomique: 200ng d'ADN génomique ont été fragmentés par sonication afin d'obtenir des fragments de 150 à 1500 pb.

- Réparation des extrémités : la réparation enzymatique des extrémités a été réalisée en utilisant le kit « KAPA end repair enzymes » durant une incubation de 30min à 20°C.
- A-Tailing et la ligation des adaptateurs : en utilisant le kit « KAPA », une séquence poly-adénine a été ajoutée aux fragments d'ADN. Cette séquence a servi à la ligation des adaptateurs inclus dans les deux kits KAPA Single-Indexed Adapter Kit, Set A + B. Chaque adaptateur contient : une séquence spécifique pour la fixation des fragments de la librairie sur la puce (P5, P7), une séquence complémentaire des amorces utilisées lors de l'amplification et une séquence permettant l'identification des échantillons pendant le séquençage (séquence index). Chaque kit (set A et set B) contient 12 séquences index spécifiques.
- Double sélection des fragments: les fragments ont été sélectionnés en fonction de la taille en utilisant des billes magnétiques « Agencourt® AMPure® Xtra Performance (XP) reagent ». Au cours du premier lavage les fragments avec une taille supérieure à 450 ont été fixés sur les billes. Au cours du deuxième lavage les fragments de taille inférieure à 250 étaient capturés. Finalement seulement les fragments avec une taille entre 250 et 450pb ont été retenus.
- Double capture : cette étape consiste à l'enrichissement de la librairie :
 - Ligation mediated PCR (LM-PCR) : les fragments ont été amplifiés (PCR de 7 cycles) en utilisant des amorces (Pre LM-PCR Oligo1&2) complémentaires des séquences situées sur les adaptateurs. Cette réaction est assurée par le KAPA HiFi HotStart Ready mix DNA polymerase. La librairie amplifiée est ensuite purifiée en utilisant des billes magnétiques.
 - Multiplexage : Les 12 échantillons de chaque KAPA Single-Indexed Adapter Kit, Set A + B ont été mélangés dans un seul tube en utilisant la même quantité de chaque échantillon.
 - Hybridation : les sondes biotinylées ont été hybridées aux fragments amplifiés et multiplexés pendant une nuit à 47°C.
 - Capture : les fragments biotinylés ont été ensuite capturés pendant 45min à 47°C en utilisant des billes prè-traitées par le streptavidin. Plusieurs étapes de lavage sont effectuées après pour l'élimination des fragments non spécifiques.
 - Post capture LM-PCR: cette étape (5 cycles de PCR) permet d'amplifier les fragments capturés qui correspondent aux exons des gènes incorporés dans le panel.
 - Deuxième capture : pour augmenter la qualité et la spécificité des fragments sélectionnés.
- Préparation de la librairie pour le Miseq sequencing : les deux librairies du SeqCap kit A et B ont été mélangés et dénaturés. Le mélange a été transféré ensuite sur la puce illumina.
- Miseq sequencing : Le système de séquençage MiSeq permet le séquençage en simultané de plusieurs millions de fragments d'ADN. La technologie utilisée repose sur une amplification

en ponts des fragments d'ADN sur support solide (flow cell) suivi d'un séquençage par synthèse chimique (SBS) des colonies d'ADN préalablement amplifiés.

- Read1 : les fragments se fixent sur la puce par l'intermédiaire des séquences P5 et P7 des adaptateurs. Le premier séquençage consiste à séquencer que les fragments rattachés par le P7 en utilisant des amorces complémentaires des séquences incorporées dans les adaptateurs.
- Identification du patient : à la fin de read 1, des amorces ont été ajoutées. Ces amorces se fixent sur l'extrémité de P7 et elles servent au séquençage de la séquence index.
- Read 2 : séquençage des fragments rattachés par leur séquence P5.

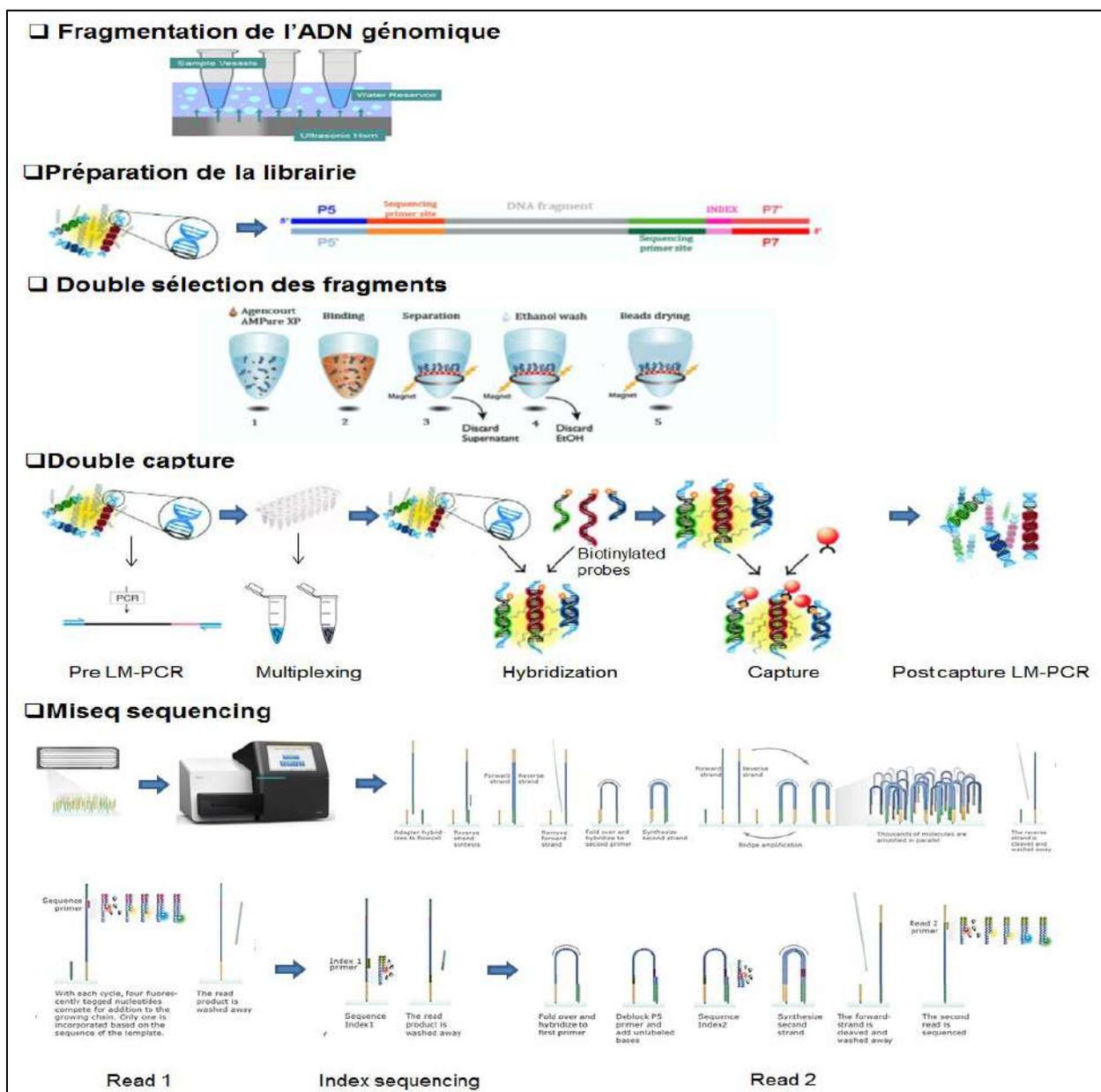


Figure 22. La technique de double capture de Target Sequencing et Next Generation Sequencing utilisée pour le séquençage de 23 gènes impliqués dans la maladie de Parkinson.

II.5. Exome sequencing

Parmi les 54 patients pour lesquels aucune mutations n'a été identifiée, nous avons choisi 24 patients dont l'âge de début de la maladie est <40ans pour la recherche des nouveaux gènes impliqués dans la maladie de Parkinson par exome sequencing. La capture des séquences, l'enrichissement et l'éluion ont été effectués selon le protocole et les recommandations du fournisseur en utilisant le kit Illumina TruSeq Exome Enrichment. 3 µg d'ADN génomique ont été fragmentés par sonication, et purifiés afin d'obtenir des fragments de 150 à 200 pb. Les extrémités ont été ensuite réparées, modifiées par l'ajout d'une poly-adénine aux extrémités 3' qui a servi ensuite pour liguer les adaptateurs oligonucléotidiques de séquençage à chaque extrémité. Ces fragments sont alors de nouveau purifiés et amplifiés par 4 à 6 cycles de PCR. Les librairies purifiées sont alors hybridés à la banque de sondes oligonucléotidiques de capture pendant 24h. Après hybridation, lavage et élution, les fragments capturés de chaque échantillon ont été de nouveau amplifiées (10 à 12 cycles de PCR) avec l'ajout d'un index spécifique de chaque échantillon. La fraction obtenue a été alors purifiée et quantifiée par PCR quantitative afin d'obtenir suffisamment d'ADN matrice pour la suite du processus en aval. Le pool des échantillons a été ainsi réalisé, quantifié et déposé sur le HiSeq 2000® d'Illumina pour séquençage.

II.6. Analyse bio-informatique

II.6.1. Alignement des séquences et détection des variations

Le séquençage réalisé est un séquençage à une profondeur moyenne de 60X (chaque base est lue en moyenne 60 fois). La couverture moyenne était de 1128X (137-2038 X) et le pourcentage moyen de couverture à 30X était de 98,7% (de 96,5 à 99,6%) pour tous les individus testés. Les données de sortie (output data) du MiSeq et HiSeq sont des séquences (reads) séparées en fonction de leurs codes à barres (index). Les fichiers bruts de format BCL ont été d'abord convertis, en utilisant le logiciel CLC Genomics Workbench 7.0, en fichiers de format FASTQ qui permettent de stocker les séquences nucléiques et leurs scores de qualité. L'alignement de ces séquences sur le génome Humain de référence (GRCh37/hg19) a été réalisé en utilisant Burrows-Wheeler Aligner (BWA, v0.7.12) pour la détection des variations. Ces fichiers ont été ensuite compressés, indexés et convertis en fichiers BAM, permettant de visualiser les séquences alignés par IGV ou Alamut. Les reads dupliqués ou avec une qualité d'alignement trop faible ont été éliminés en utilisant le logiciel Picard. Les fichiers BAM ont subi un nouveau réalignement à l'aide de l'outil Genome Analysis Toolkit (GATK). Les variations ont été annotées avec le logiciel ANNOVAR.

A l'issue de cette analyse, pour chaque échantillon, un fichier Excel recensant les données suivantes a été généré: la variations, le gène et l'exon dans lequel la variation a été détectée, le chromosome, la région, l'allèle de référence et l'allèle trouvés dans les lectures, zygosité, compte, couverture, fréquence, nombre de lectures forward, nombre de lectures reverse, qualité moyenne, nom du gène, référence ENSEMBL, changement en acide aminé, la nomenclature de la variation non-synonyme, l'effet sur l'épissage, filtre de qualité (PASS/LowQual), fréquences dans les bases de données, fréquence allélique mineure (MAF).

II.6.2. Filtrations et sélection des variations

Les variations ont été filtrées en utilisant le programme PolyWeb (Imagine Institute - Paris Descartes University). Les variations retenus sont ceux qui affectent la séquence codante ou les sites d'épissage, qui sont rares (MAF < 1%) et qui sont bien couverts (PASS).

The screenshot displays the PolyWeb interface. On the left, there is a table with columns: Chr, Genes, Sub, Del, Ins. The main area shows a table with columns: Patients, Sub, Del, Ins, He, Ho, Genes, Cov, 15x, 30x, He, Ho, St. Below this, there are several filter sections. The 'Main Filters' section includes 'DB Public' (Options: All), 'Check Deja Vu' (None), 'Others Projects: 114', 'Impact Factor' (High, Medium, Low, All), 'Mature miRNA', 'Splice Aco/Don', 'Frameshift', 'Stop-gained', 'Start/Stop-lost', 'ncRNA', 'Splice Region', 'Missense', 'No-frameshift', 'Pseudogene', 'Utr', 'Synonymous', 'Intronic', 'Intergenic'. The 'Others Filters' section includes 'Global', 'Variants Type (All)', 'Predictions' (Surely, Probably, Possibly, All), 'Run Option', and 'LIST ALL Genes'. The filter settings section is highlighted with a red border.

Figure 23. Analyse des résultats de target sequencing sur Polyweb. Les filtres utilisés pour l'analyse sont encadrés en rouge.

II.6.3. Analyse de la couverture et des CNVs

La couverture a été analysée en utilisant le programme PolyDiag de Polyweb. Ce programme indique des informations spécifiques sur la couverture telles que la longueur de la région ciblée, le nombre des lectures, le nombre de base, la couverture minimale, la couverture maximale, la couverture moyenne et les bases à couverture nulles. L'analyse de la couverture est importante pour prendre en compte les variations qui peuvent être situés sur les exons qui ont été mal couverts et pour la détection des délétions ou duplication des exons (copie number variation : CNV).

Les CNVs ont été détectés à l'aide de la fonction Dup/Del beta qui calcule un score CNV en utilisant le nombre des lectures (couverture moyenne) pour chaque exon et chaque patient selon la formule ci-dessous (Figure 24). Pour un gène donné si tout un exon est mal couvert chez tous les patients (une ligne de couverture toute rouge comme le montre la Figure 24 A) aucun CNV ne sera calculé puisque cela est dû à une mauvaise conception des amorces ou une région riche en GC. D'autre part, si les exons d'un ou plusieurs gène sont mal couvert chez le même patient (une colonne de couverture rouge), les CNVs calculés sont préalablement non significatifs, vue que cela est due à une mauvaise qualité d'ADN.

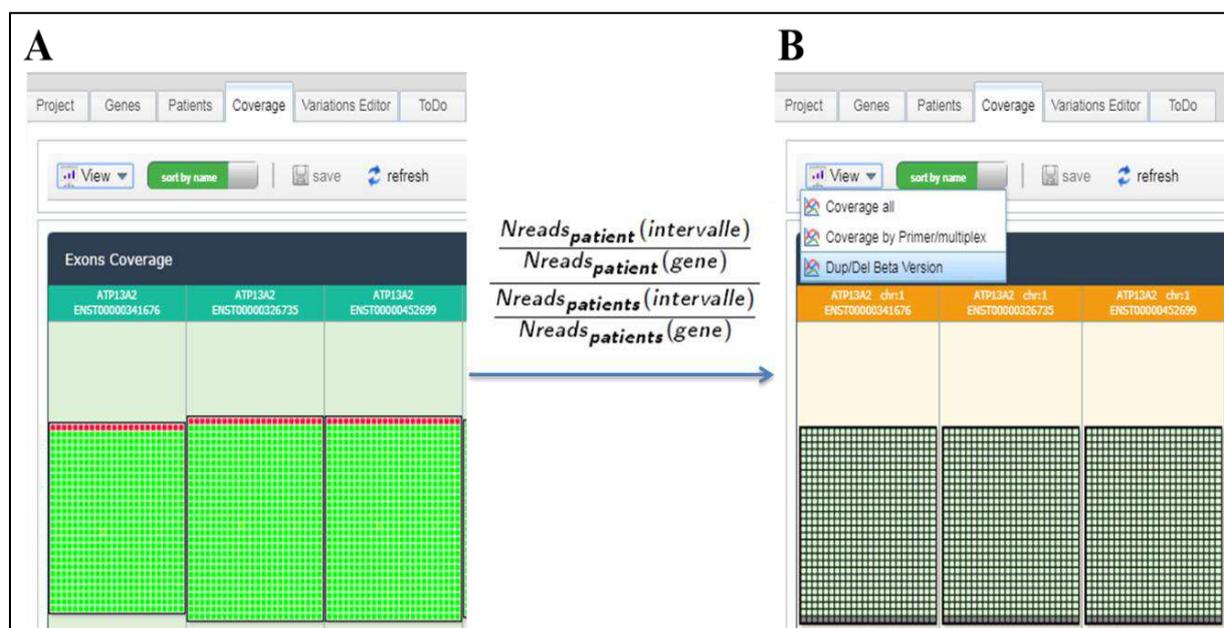


Figure 24. Analyse de la couverture sur PolyDiag et l'équation établie pour le calcul des CNVs, (A) Analyse de la couverture sous la fenêtre coverage du PolyDiag; (B) Analyse des CNVs sous la fenêtre Dup/Del beta du PolyDiag.

II.6.4. Analyse in-silico de la pathogénicité des variations

Le logiciel Alamut® Visual a été utilisé pour visualiser les fichiers BAM afin d'étudier directement les variations détectées par NGS et pour analyser la pathogénicité de celles sélectionnées. La base de données d'Alamut® Visual contient plus de 28000 gènes codants, non codants ainsi que des pseudogènes. Les informations sont recueillies à partir de différentes bases de données publiques telles que le NCBI, l'UCSC et l'EBI et d'autres bases de données telles que gnomAD, ESP, Cosmic, ClinVar, HGMD et CentoMD.

Alamut fournit des données de conservation des acides aminés à travers de nombreuses espèces et des informations sur les domaines protéiques de chaque protéine. De plus, il intègre plusieurs outils et algorithmes de prédiction de la pathogénicité des variations faux-sens (SIFT, PolyPhen, AlignGVGD ou MutationTaster). Il propose aussi une fenêtre dédiée à

l'étude de l'effet des variations sur l'épissage de l'ARN, permettant de mesurer l'impact potentiel sur les sites consensus et de visualiser les sites cryptiques ou de novo (Splice Site Finder, MaxEntScan, NNsplice, Genesplicer, Human Splicing Finder).

De plus de Alamut différents autre programmes pour l'étude de la conservation et la prédiction de la pathogénicité ont été utilisés (Tableau 2).

Tableau 2. Description des logiciels de prédiction in-silico utilisés.

Programme	Type	Out-put	Réf
ConSurf Prediction	Conservation entre les espèces	1 : Variable 9 : Hautement Conservé	[288]
GVGD	Conservation évolutive et caractéristiques biophysiques des acides aminés	C0 : non délétère C65 : hautement délétère	[289]
Provean	Conservation évolutive	Score >-2.5 : neutre Score <-2.5 : délétère	[290]
Poly-phen2	Séquence et structure protéique	<0.5 : neutre >0.9 : probablement endommageant	[291]
PMUT	Localisation de la variation par rapport aux autres mutations causales	<0.5 : neutre >0.5 : pathogène	[292]
PhD-SNP	Algorithme de formation supervisé à partir de la séquence protéique en question	Variation neutre ou liée à un phénotype pathogène	[293]
SNPs&GO	Séquence, profil et fonctions protéiques	Variation neutre ou mutation causale	[294]
Mutation Taster	Localisation de la variation et sa fréquence dans les bases de données	Polymorphisme ou mutation causale	[295]
Mutpred	Conservation évolutive, structure protéique et propriétés fonctionnelles	>50% substitution considérée comme pathogène	[296]
I-Mutant 2.0	Prédiction des changements de stabilité	La valeur de variation d'énergie libre (DDG)	[306]
NetNGlyc1.0 Server	Effet de la variation sur la glycosylation	Indique les différents sites observés avec leurs scores.	

II.6.5. Analyse de l'effet des variations sur la structure de la protéine

Les structures modèles des différentes protéines sauvages et mutées ont été construites par RaptorX soit par la prédiction des structures secondaires et tertiaires ainsi que l'accessibilité au solvant, les régions désordonnées et les sites de liaison pour les protéines non cristallisées. RaptorX attribue des scores de confiance pour indiquer la qualité des résultats de prédiction. Les modèles fournis par RaptorX ont été ensuite visualisés par Swiss Prot/PDB viewer pour la comparaison de la structure protéique entre la protéine sauvage et mutée et ainsi le calcul du degré de déviation (RMSD).

II.7. Validation des CNV par MLPA

Les CNV détectés par PolyDiag ont été vérifiés par la technique multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)[307]. Cette technique consiste à utiliser des sondes en deux segments de longueur unique qui, lorsqu'elles s'hybrident à des séquences cibles adjacentes sur l'ADN génomique peuvent être liées par une DNA-ligase. Cela permet l'amplification de tous les sites ciblés d'une région chromosomique d'intérêt au moyen d'une seule paire d'amorce (Figure 25).

Nous avons utilisé le kit SALSA MLPA probe mixtes P051-C3/P052-C2 Parkinson (MRC Holland, Amsterdam, the Netherlands). Ce kit contient 43 sondes localisées sur 8 gènes différents. Les gènes inclus dans ce kit sont : *SNCA*, *PARK2*, *UCHL1*, *PINK1*, *PARK7*, *LRRK2*, *GCHI* et *ATP13A2*.

Les ADN (100ng) étaient dénaturés pendant 5min à 98°C puis mélangés à un mix de 1.5µl du mélange de sondes et 1.5µl du tampon MLPA. L'hybridation des sondes a été ensuite réalisée à 60°C pendant une nuit. La ligation a été effectuée pendant 15min à 54°C dans un volume réactionnel final de 40µl en ajoutant un mix contenant 3µl du tampon A, 3µl du tampon B et 1µl du Ligase. La réaction a été arrêtée par une incubation à 98°C pendant 5 minutes. Une amplification par PCR du produit de ligation a été ensuite effectuée dans un volume final de 50µL en présence de 2µl d'amorces spécifiques (l'amorce sens est marquée en 6-FAM à son extrémité 5') et 0.5µl de la polymérase. Le programme d'amplification était le suivant: 95°C pendant 1min, puis 35 cycles de 95°C pendant 30s, 60°C pendant 30s, 72°C pendant 1min et enfin un dernier cycle à 72°C pendant 20min. Les produits de PCR peuvent être conservés une semaine à -20°C ou immédiatement dilués à 1/5. 1µl du produit dilué a été dénaturé pendant 3min à 96°C en présence de 15µl de formamide et 0.1µl d'un marqueur de taille (G500 ROX, Applied Biosystems). Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse sur un séquenceur ABI 3730. Les hauteurs et les zones des pics ont été

vérifiées en utilisant la version 3.7 du logiciel GeneMapper (Applied Biosystems), et les données ont été exportées vers un fichier Excel pour d'autres calculs.

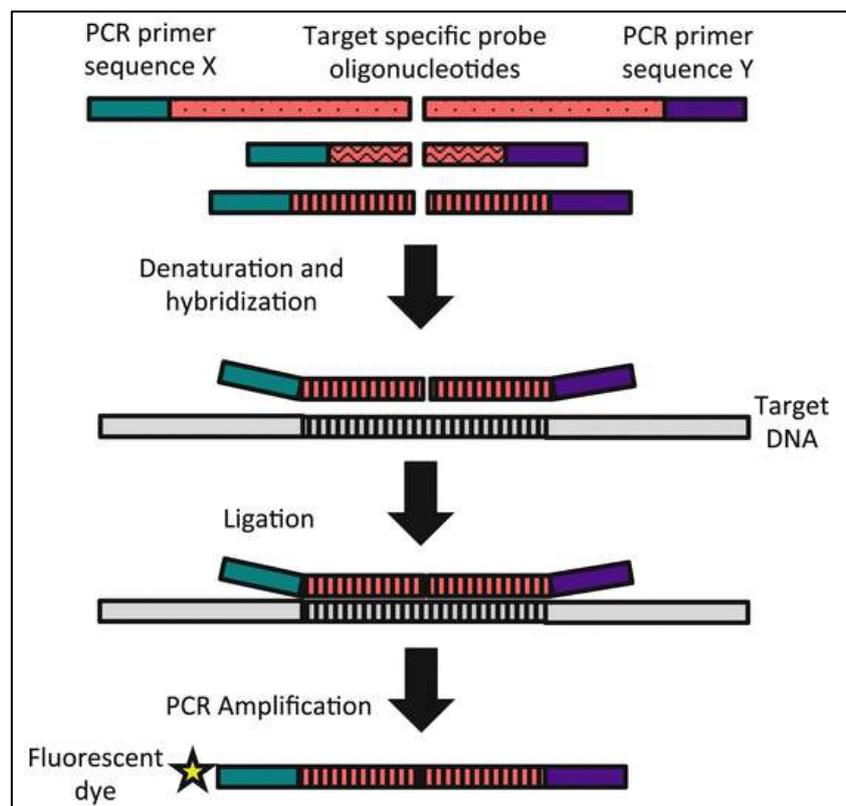


Figure 25. Principe de la technique du MLPA utilisée pour la validation des CNVs [308].

II.8. Séquençage de Sanger

Les exons dont la couverture est inférieure à une profondeur de 100, ont été séquencés par la méthode de Sanger. Les mutations sélectionnées et leur ségrégation avec la MP chez les apparentés disponibles ont été aussi confirmés par séquençage Sanger. Cette méthode de séquençage a été également utilisée pour étudier l'effet fondateur et l'origine ethnique des mutations *LRRK2*-p.G2019S et *PINK1*-P.Q456* et le séquençage des variations *DNM3*-rs2421947 et *LRRK2* (rs11564148 et rs7966550). Le programme Primer3 a été utilisé pour le design des couples d'amorces au niveau de chaque exon à amplifier. Puis le programme PCR-in silico a été utilisé pour effectuer un alignement de séquence pour vérifier la spécificité des amorces.

II.8.1. Amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Pour la plupart des PCR réalisées (sauf pour l'amplification du gène *GBA*), la réaction et le programme suivants ont été utilisés. L'ADN a été amplifié par PCR dans un volume réactionnel final de 15µl contenant 2µl d'ADN génomique (20ng/µl); 1.5µl du tampon de l'enzyme (10X); 0.4µl dNTP (25mM) ; 0.6µl de chaque amorce sens et inverse (10µM) et

0.1µl d'enzyme DNA polymérase (Thermo Scientific DreamTaq Green PCR). L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur 2700 (Applied Biosystems), selon un programme personnalisé: 94°C/5min suivie de 20 cycles à température d'hybridation décroissante de 65°C à 55°C avec 2cycles par degrés (Touch-Down): (94°C/30s, 65°C/30s, 72°C/40s)x2 jusqu'à 55°C ; puis 20 cycles (94°C/30s, 55°C/30s, 72°C/40s) et finalement une extension finale de 10 minutes à 72°C.

II.8.2. Préparation des produits de PCR pour le séquençage

Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (2%), dans le tampon TBE1X. Les acides nucléiques ont été visualisés sous UV après une coloration du gel au BET (1µg/ml). Les produits PCR ont été traités ensuite par 0,1 µl d'exonucléase (20 U/µl) et 0.2 µl de la phosphatase alcaline. La réaction a été menée à 37°C pendant 20 minutes suivie de 5 min à 85 °C pour l'inactivation de l'enzyme. Pour le séquençage Sanger, 1 à 2µl du produit PCR purifié a été mélangé avec 2.5µl d'amorce sens ou inverse (10µM) du fragment à séquencer et 6µl d'eau.

II.8.3. Réaction de séquençage

Les réactions de séquençage ont été réalisées dans un volume final de 10µl contenant 4µl du produit préparé, 4µl Ready reaction Premix (2.5X), 0.2µl Big Dye Sequencing Buffer (5X) (BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit ; Applied Biosystems). L'amplification a été faite selon le programme suivant : une dénaturation à 96°C pendant une minute; 25 cycles composés chacun de 10s à 96 °C, 5s à 50 °C, 4min à 60 °C. Les produits ont été ensuite purifiés sur billes magnétiques à l'aide du kit de purification BigDye XTerminator® (Applied Biosystems) selon les recommandations du fournisseur. Le culot a été resuspendu dans 10 µl de Formamide. Enfin, les produits de purification ont été analysés sur séquenceur capillaire ABI 3730 (Applied Biosystems). Les électrophorégrammes résultants ont été analysés à l'aide du logiciel Sequence Analysis (Applied Biosystems) puis alignés et comparés à la séquence génomique de référence (GRCh37/hg19) à l'aide du logiciel Seqscape 2.6 (Applied Biosystems).

II.8.4. Amplification du gène GBA

Vu qu'il existe plusieurs pseudogènes du gène *GBA* qui peuvent gêner sa capture au cours du Target sequencing, les exons et les régions introniques de ce gène ont été séquencés chez tous les patients par la méthode de Sanger. Pour éviter l'amplification et le séquençage des pseudogènes, le gène *GBA* a été amplifié en trois grands fragments en utilisant des amorces et

un programme de PCR précédemment décrit [192]: fragment 1 de 2972pb (exons 1 à 5) ; fragment 2 de 2049pb (exons 6 à 8) et fragment 3 de 1682pb (exons 9 à 12).

La réaction a été menée dans un volume réactionnel final de 50µl contenant 3.5µl d'ADN génomique (20ng/µl); 5µl du tampon de l'enzyme (10X); 0.4µl de dNTP (10mM) ; 1µl de chaque amorce sens et inverse (10µM) et 0.2µl d'enzyme DNA polymérase (Thermo Scientific DreamTaq Green PCR).

Les produits de PCR ont été séquencés après avec des amorces internes.

Tableau 3. Programme de PCR Touch-Down pour l'amplification du gène *GBA*.

Fragment 1	TD64-54°C	Fragment 2	TD64-54°C	Fragment 3	TD64-54°C
96°C 5 min		96°C 5 min		96°C 5 min	
96°C 30 sec	} 2 cycles	96°C 30 sec	} 2 cycles	96°C 30 sec	} 2 cycles
64°C 30 sec		64°C 30 sec		64°C 30 sec	
72°C 3 min		72°C 2 min		72°C 2 min	
96°C 30 sec	} 2 cycles	96°C 30 sec	} 2 cycles	96°C 30 sec	} 2 cycles
63°C 30 sec		63°C 30 sec		63°C 30 sec	
72°C 3 min		72°C 2 min		72°C 2 min	
96°C 30 sec	} 2 cycles	96°C 30 sec	} 2 cycles	96°C 30 sec	} 2 cycles
62°C 30 sec		62°C 30 sec		62°C 30 sec	
72°C 3 min		72°C 2 min		72°C 2 min	
96°C 30 sec	} 2 cycles	96°C 30 sec	} 2 cycles	96°C 30 sec	} 2 cycles
61°C 30 sec		61°C 30 sec		61°C 30 sec	
72°C 3 min		72°C 2 min		72°C 2 min	
96°C 30 sec	} 2 cycles	96°C 30 sec	} 2 cycles	96°C 30 sec	} 2 cycles
60°C 30 sec		60°C 30 sec		60°C 30 sec	
72°C 3 min		72°C 2 min		72°C 2 min	
96°C 30 sec	} 2 cycles	96°C 30 sec	} 2 cycles	96°C 30 sec	} 2 cycles
59°C 30 sec		59°C 30 sec		59°C 30 sec	
72°C 3 min		72°C 2 min		72°C 2 min	
96°C 30 sec	} 2 cycles	96°C 30 sec	} 2 cycles	96°C 30 sec	} 2 cycles
58°C 30 sec		58°C 30 sec		58°C 30 sec	
72°C 3 min		72°C 2 min		72°C 2 min	
96°C 30 sec	} 2 cycles	96°C 30 sec	} 2 cycles	96°C 30 sec	} 2 cycles
57°C 30 sec		57°C 30 sec		57°C 30 sec	
72°C 3 min		72°C 2 min		72°C 2 min	
96°C 30 sec	} 2 cycles	96°C 30 sec	} 2 cycles	96°C 30 sec	} 2 cycles
56°C 30 sec		56°C 30 sec		56°C 30 sec	
72°C 3 min		72°C 2 min		72°C 2 min	
96°C 30 sec	} 2 cycles	96°C 30 sec	} 2 cycles	96°C 30 sec	} 2 cycles
55°C 30 sec		55°C 30 sec		55°C 30 sec	
72°C 3 min		72°C 2 min		72°C 2 min	
96°C 30 sec	} 25 cycles	96°C 30 sec	} 25 cycles	96°C 30 sec	} 25 cycles
54°C 30 sec		54°C 30 sec		54°C 30 sec	
72°C 3 min		72°C 2 min		72°C 2 min	
72°C 10 min		72°C 10 min		72°C 10 min	
15°C infini		15°C infini		15°C infini	

Tableau 4. Séquences d'amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage du gène *GBA*

Amorces pour PCR			Exons	Tailles
Fragment 1	GBA_1F	CCTAAAGTTGTCACCCATAC	1 à 5	2972pb
	GBA_1R	AGCAGACCTACCCTACAGTTT		
Fragment 2	GBA_2F	GACCTCAAATGATATACCTG	6 à 8	2049pb
	GBA_2R	AGTTTGGGAGCCAGTCATT		
Fragment 3	GBA_3F	TGTGTGCAAGGTCCAGGATCAG	9 à 12	1682pb
	GBA_3R	ACCACCTAGAGGGGAAAGTG		
Amorces pour séquençage			Exons	
Fragment 1	GBA_1R1	GCAAGGCAGGTCTCAAACCTC	2 et 3	
	GBA_1F2	AATCACACGGGCACAGGTAA	4 et 5	
Fragment 2	GBA_2 R2	TGAACCGGATGCACTGGTTG	6 et 7	
	GBA_2F-2F3	AACCTAGTTCCACTTCCAGA	8	
	GBA_9R	GCTCCCTCGTGGTGTAGAGT	9 et 10	
Fragment 3	GBA_10R	GAGGCACATCCTTAGAGGAG	10 et 11	
	GBA_11F	GTGGGCTGAAGACAGCGTTGG	12	

II.9. Etudes des effets fondateurs

II.9.1. Haplotype porteur de la mutation *LRRK2-p.G2019S*

La mutation *LRRK2-p.G2019S* a été identifiée sur 3 haplotypes différents dans le monde [193]. Pour l'identification de l'haplotype porteur de cette mutation dans la population Tunisienne, les mêmes marqueurs bi-alléliques de type SNPs et les microsatellites décrits précédemment ont été analysés chez les 107 patients porteurs de la mutation p.G2019S[171].

Tableau 5. Séquences d'amorces utilisées pour l'identification de l'haplotype p.G2019S.

Marqueur	Exon	MAF	Amorces
D12S2514	5'UTR		F TTGCAGCTGTAAGGAATTTGGG R-FAM GCATTCTTCAGCCTGAGACCC
rs7966550	Exon 22	9%	F ATTTGAGCACTGAACTGGAGT R AGATGAAACTGGCACCAAGA
D12S2516	Intron 30		F CGCAGCGAGCATTGTACC R-FAM CTCGGAAAGTTTCCCAATTC
rs1427263	Exon 34	31.7%	F TCTGACTACTTTCCTGAGCAA
rs11176013	Exon 34	41.4%	R AGGAGGTTTACACTAGAAGCAAA
rs11564148	Exon 34	28.6%	
rs6581667	intron 40	49.8%	F GCCTTGGTACATCACCCT
rs6581668	intron 40	49.9%	R AGGCAGACAACTTGGTGGAA
p.G2019S	exon 41		
rs10506155	intron 41	19%	F TGTCATGGGACATGAAGGTG
rs7954061	intron 41	29.7%	R CCCTGGGTTTCTGACATGAT
rs7957151	intron 41	29.6%	

II.9.2. Haplotype porteur de la mutation *PINK1*-p. Q456*

Pour l'identification de l'haplotype porteur de la mutation *PINK1*-p.Q456*, 21 marqueurs bi-alléliques de type SNPs et 3 marqueurs microsatellites ont été analysés chez les 6 patients porteurs de cette mutation. La plupart des SNPs ont été sélectionnées à partir des résultats de Target sequencing. Les conditions de la PCR et de séquençages des marqueurs SNPs sont les mêmes décrites précédemment dans le chapitre II.9.

Tableau 6. Séquences d'amorces utilisées pour l'identification de l'haplotype p.Q456*

Marqueur	Localisation	MAF	Amorces
D1S2732	chr1:20,536,307		F TGA ^{CTT} CAGTGAGGCTGC R-FAM CGGATA ^{CA} AAGGGCTTTTC
D1S3720	chr1:20,811,785		F TCGAGGCTGCAGTGA ^{ACT} TAT R-FAM TCAGATGACAGACAA ^{ACT} CAGG
rs45530340	Exon 1	22%	Target sequencing
rs148871409	Exon 1	14%	Target sequencing
rs2298298	Intron 1	17%	Target sequencing
rs115037254	Intron 4	7%	Target sequencing
rs3131713	Intron 4	17%	Target sequencing
rs3738136	Exon 5	12%	Target sequencing
rs45478900	Exon 6	20%	Target sequencing
p.Q456*			
rs1043424	Exon 8	30%	Target sequencing
rs686658	UTR	16%	Target sequencing
rs513414	UTR	16%	Target sequencing
rs1043443	UTR	30%	Target sequencing
rs512550	UTR	47%	Target sequencing
rs1043502	UTR	30%	Target sequencing
rs8064	UTR	11%	Target sequencing
rs2078073	UTR	30%	Target sequencing
rs33999970	UTR	34%	Target sequencing
rs34361349	UTR	13%	Target sequencing
rs1573132	UTR	30%	Target sequencing
rs674102	chr1:21,022,881	37%	F CCGCAGAA ^{ACC} CAGAGA ^{AAG} TC R CCACGAGA ^{AAG} GAGGCAGG
rs12135548	chr1:21,084,617	36%	F TGA ^{CTT} C ^T AA ^{CG} CTGTATGACA R AGTTGCCTGACACCACGC
rs7512116	chr1:21,500,845	30%	F TCAGCA ^{CT} GTGGTC ^{CT} TACT R ACCGATGAGAA ^{AG} TGTGGTG
D1S478	chr1:21,499,605		F ATGCCCA ^{AT} ACCC ^{CA} GT R-FAM GCATTCATTTATTCAGCAAGAT

II.9.3. Génotypage des marqueurs microsatellites:

Les microsatellites ont été étudiés chez les malades et leurs apparentés non-atteints. Pour le génotypage fluorescent, les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume final de 10 µl contenant 20 ng d'ADN génomique, 1µl d'un mélange d'amorces de concentration 10µM (l'amorce inverse étant marquée par un fluorophore FAM), 0.4µl du mix dNTP (10 mM), 1µl du tampon de l'enzyme (10X), 0.1µl (10U/µl Taq DNA polymérase Thermo Scientific DreamTaq Green PCR). Les conditions de la PCR sont les suivantes: étape de dénaturation de 3min à 94°C ; 35 cycles comprenant 30s de dénaturation à 95°C, 30s d'hybridation à 55°C, 45s de polymérisation à 72°C et 10 min d'élongation finale.

Après amplification, les produits des marqueurs microsatellites dont les tailles sont différentes ou marqués par des fluorophores différents ont été mélangés. 1µl du mélange obtenu ont été dénaturé à 96°C pendant 3 min, en présence de 7µl de formamide et 1µl d'un marqueur de taille (GeneScan™ 400HD ROX™, Applied Biosystems) puis refroidis rapidement dans la glace. Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse sur un analyseur ABI PRISM® 3500 (Applied Biosystems). Les pics ont été vérifiés en utilisant le logiciel Genscan qui permet, à partir d'une courbe d'assignation dressée par les différents points du standard de taille, d'attribuer aux différents pics observés leurs tailles en pb.

Une fois les polymorphismes et les microsatellites sont identifiés, il est possible de déterminer la structure des haplotypes correspondant. L'haplotype le plus probable est celui qui présentait le minimum de recombinaisons en respectant la ségrégation des allèles paternels et maternels.

II.10. Origine ethnique des mutations fondatrices

Pour l'identification de l'origine ethnique exacte des mutations fondatrices (*LRRK2*-p.G2019S et *PINK1*-p.Q456*), nous avons étudié les haplogroupes du chromosome Y chez les porteurs mâles de ces mutations en utilisant les amorces décrites précédemment (65 mâles porteurs de la mutation *LRRK2*-p.G2019S et 5 mâles porteurs de la mutation *PINK1*-p.Q456*)[273]. Les conditions de la PCR et de séquençage sont les même décrites précédemment dans le chapitre II.9.

Tableau 7. Amorces utilisées pour l'amplification des différents haplogroupes.

Marquer	Amorces
Haplogroupe E	
YAP	F CAGGGGAAGATAAAGAAATA R ACTGCTAAAAGGGGATGGAT
PN2	F GGTAACACCCATAAAGGTTG R TTCACTACCAGCCTAAGTAC
M215	F GTAAAACTCAGATATATACATCCCATG R AAAAAAAAAAGAATCACTATCTTAACG
M35	F TAAGCCTAAAGAGCAGTCAGAG R AGAGGGAGCAATGAGGACA
M81	F ACTTAATTTATAGTTTCAATCCCTCA R TTCATGGAGATGTCTGTATCTGG
M78	F CTCAGGCATTATTTTTTTTGGT R ATAGTGTTCCCTTCACCTTTCCTT
M123	F TGGTAAACTCTACTTAGTTGCCTTT R CAGCGAATTAGATTTTCTTGC
Haplogroupe R	
M207	F AGGAAAAATCAGAAGTATCCCTG R CAAAATTCACCAAGAATCCTTG
M173	F AAGAAATGTTGAACTGAAAGTTGAT R AGGTGTATCTGGCATCCGTTA
M343	F TTAAACCTCCTCCAGCTCTGCA R ACCCCCACATATCTCCAGG
V88	F AGAAGCAGATTGATGTCCCACT R TCCAGTTAGGAGATCCCCTCA
M17	F CTGGTCATAAACAACACTGGAAATC R TGAACCTACAAATGTGAAACTC
Haplogroupe J	
M304	F CAAAGTGCTGGGATTACAGG R CTTCTAGCTTCATCTGCATTGT
M267	F TTATCCTGAGCCGTTGTCCCTG R TGTAGAGACACGGTTGTACCCT
M172	F TTGAAGTTACTTTTATAATCTAATGCTT R ATAATTTATTACTTTACAGTCACAGTGG

II.11. Analyse des facteurs influençant la l'âge début de la MP chez les porteurs de la mutation p.G2019S

La pénétrance de la mutation p.G2019S est incomplète et dépend de l'âge suggérant la présence des modificateurs génétiques ou environnementaux majeurs qui influencent l'âge de début de la maladie chez les porteurs de cette mutation. Une étude par Trinh et al. a suggéré la variation rs2421947 sur le gène *DNM3* comme un modificateur de l'âge de début de la MP chez les porteurs de la mutation p.G2019S[309]. Au cours de cette étude nous avons répliqué les résultats de Trinh sur notre cohorte et nous avons essayé d'identifier d'autres variations sur le gène *LRRK2*.

II.11.1. Etude de la variation rs2421947 du gène *DNM3*

Pour l'analyse de la variation rs2421947 chez les patients porteurs de la mutation p.G2019S, la séquence des amorces utilisées est :

Sens: 5' AAGCCTTCACTAAGCCCACA 3'

Inverse : 5' AGGTGTCCTTGCAATCCCTG 3'

II.11.2. Recherche d'autres variations sur le gène *LRRK2*

Afin d'identifier des variations impliquées dans l'apparition de la maladie de Parkinson à un âge plus précoce chez les patients porteurs de la mutation p.G2019S, on a procédé à séquencer la totalité du gène *LRRK2* par NGS chez trois patients d'origine Tunisienne, Algérienne et Française ayant respectivement un âge de début de 41, 31 et 48 ans. Nous avons pu identifier 8 variations en commun entre ces 3 patients dont deux variations non-sens : p.M2397T et p.S1647T et six variations silencieuses : p.L153L, p.L953L, p.G1819G, p.G1624G, p.K1637K et p.E2108E (Figure 26). Seulement les deux variations p.L953L et p.S1647T, étaient rares. La variation p.L953L est en position trans par rapport à la mutation p.G2019S alors que la variation p.S1647T touche le site catalytique kinase de la protéine *LRRK2*. Ces deux variations ont été criblées chez tous les 107 patients porteurs de la mutation p.G2019S pour étudier leur éventuel effet sur l'âge de début de la maladie.

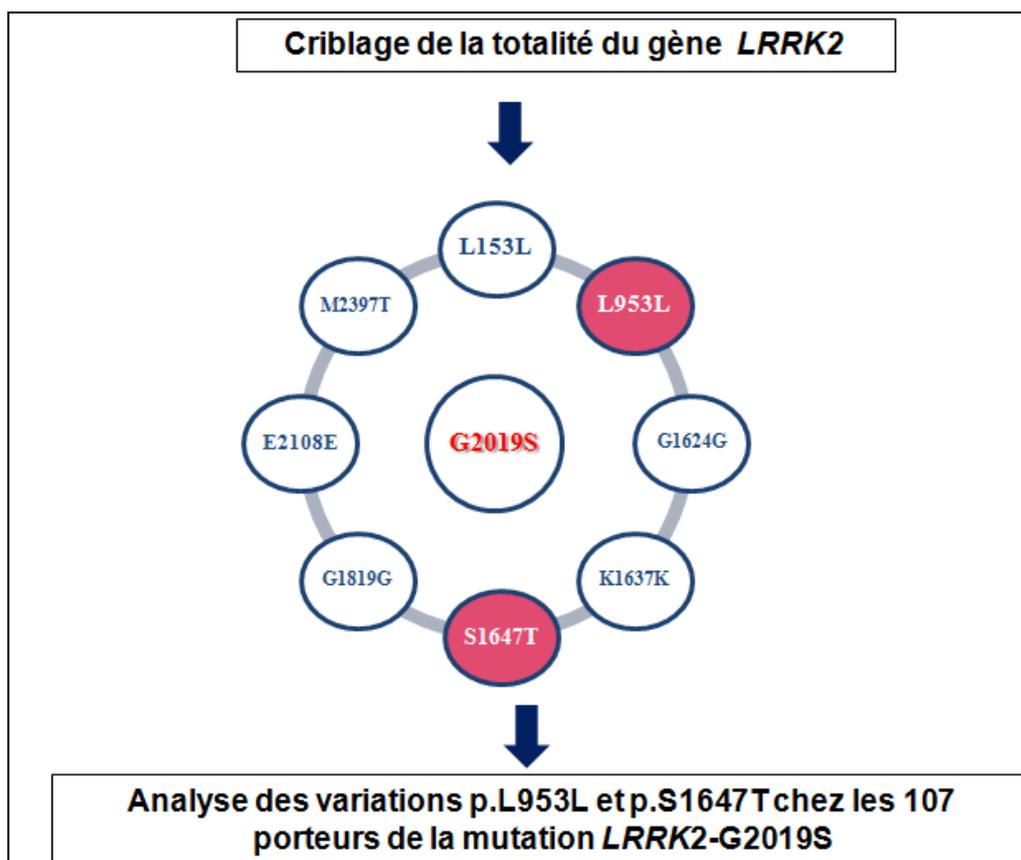


Figure 26. Stratégie d'identification des variations p.L953L et p.S1647T sur le gène *LRRK2* pouvant influencer l'âge de début de la maladie chez les patients porteurs de la mutation p.G2019S.

Tableau 8. Amorces utilisées pour l'amplification des variations identifiées sur le gène *LRRK2*

Exon	SNP		Amorces
Exon 22	p.L953L	F	ATTTGAGCACTGAACTGGAGT
		R	AGATGAAACTGGCACCAAGA
Exon 34	p.S1647T	F	TCTGACTACTTTCCTGAGCAA
		R	AGGAGGTTTACACTAGAAGCAA

II.11.3. Extraction d'ARN

L'extraction d'ARN a été réalisée pour :

- étudier l'effet d'une variation qui touche le site d'épissage de l'exon 2 du gène *GBA*
- étudier le niveau d'expression du gène *LRRK2* en présence de la variation synonyme p.L953L afin de confirmer son influence sur l'âge de début de la MP chez les porteurs de la mutation p.G2019S.

L'ARN a été extrait à partir des lymphocytes totaux sur 10 ml du sang frais en utilisant le kit Invitrogen TRIzol® Reagent selon les recommandations du fournisseur. Les lymphocytes ont été récupérés suite à la lyse cellulaire des globules rouges en présence de 40 ml du tampon de lyse rouge (1X) pendant 20 min et une centrifugation de 15 min à 3500 rpm (à 4 °C). La lyse

partielle des lymphocytes a été réalisée par 1 ml du Trizol et une incubation de l'homogénat pendant 5 min à température ambiante. Ensuite 200 µl de chloroforme ont été rajoutés et la phase aqueuse contenant l'ARN a été séparée par centrifugation pendant 10 min à 12000 rpm (à 4 °C). Une précipitation de l'ARN en ajoutant 500 µl d'isopropanol a été effectuée pendant 10 min à 4 °C suivit d'une centrifugation pendant 15 min à 12000 rpm (à 4 °C). Le culot a été alors lavé avec l'éthanol 70% et suspendu dans 20 µl d'eau-DEPC (diéthyl dicarbonate).

II.11.4. Traitement DNase I de l'ARN totaux

Le traitement de l'ARN totaux a été réalisé en utilisant la Désoxyribonucléase I (Invitrogen), dans un volume réactionnel de 10 µl contenant 2 µg d'ARN, 1 µl tampon DNase I 10X, 1 µl DNase I (1 U/µl). La réaction a été menée pendant 15 min à température ambiante. L'inactivation de la DNase I a été réalisée à 65 °C pendant 10 min en présence de 1 µl EDTA (25 mM).

II.11.5. Inverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Afin de produire l'ADN complémentaire (cDNA) nous avons procédé à une RT-PCR. Pour un volume final de 20µl, 2µg d'ARN total ont été mélangés avec 2µl d'OligodT (10µM) et 1µl dNTP (10mM), puis dénaturés pendant 5min à 65°C. Après dénaturation, nous avons ajouté : 4µl de tampon de réaction (5X) ; 2 µl DTT (100mM) et 1 µl MMLV-RT (200U/µl). La réaction a été menée pendant une heure à 37°C. Le cDNA obtenu par transcription inverse a été conservé ensuite à -80°C.

L'étude du niveau d'expression du gène *LRRK2* a été effectuée par RT-PCR semi quantitative. L'ARN des témoins et des patients porteurs de la variation p.L953L, a été dosé par Nanodrop pour s'assurer d'utiliser la même quantité lors de la RT-PCR. Le gène constitutif codant pour la Beta-2-Microglobulin (B2M) a été utilisé comme contrôle positive interne de la RT-PCR. Les conditions de la PCR et du séquençage sont les même décrites précédemment dans le chapitre II.9.

Tableau 9. Amorces utilisées pour la RT-PCR

Gène	Amorces	
<i>B2M</i>	F	GGCTATCCAGCGTACTCCAA
	R	CGGCAGGCATACTCATCTTT
<i>LRRK2</i> exons 21-22-23	F	AGTGAAGGAAGTGAAGGCTCA
	R	CATTTCTGGCTTAGGGCATC
<i>GBA</i> exons 2-3-4	F	CAGGGCTGCTTTTCTCGC
	R	TACCAAGGGCAGGAAAGGTC

II.12. PCR Long-range

La recherche des délétions ou insertions au niveau de l'ADNmt a été effectuée suite à une amplification par PCR Long-range qui nous permet d'amplifier de grands fragments d'ADNmt (>10 Kb) à l'aide d'une enzyme polymérase performante. La comparaison entre l'amplification de l'ADN témoin et l'ADN du patient nous permet de conclure s'il existe une délétion ou insertion ou non. Différentes amplifications ont été réalisées, en utilisant différentes combinaisons d'amorces couvrant l'arc majeur de l'ADNmt (Tableau 10).

Tableau 10. Amorces utilisés pour l'amplification par la PCR Long-range

	Amorce		Position nucléotidique	Taille
1	mt 12-F	5' ACGAGTACACCGACTACGGC 3'	7888-7927	8109
	mt 22-R	5'AGCTTTGGGTGCTAATGGTG 3'	15997-15978	
2	mt 9-F	5'GAGGCCTAACCCCTGTCTTT 3'	5835-5854	10162
	mt 22-R	5' AGCTTTGGGTGCTAATGGTG 3'	15997-15978	

Les réactions d'amplification par PCR Long-range sont réalisées en utilisant le kit «SequalPrep™ Long PCR Kit, Invitrogen» dans un volume final de 20µl renfermant le mélange suivant : 5µl ADN (20ng/µl), 2µl SequalPrep™ Reaction Buffer (10X), 0.4 µl DMSO, 2µl SequalPrep™ Enhancer A or B (10X), 0.5µl de chaque amorce (sens et inverse 10µM), 0.36µl SequalPrep™ Long Polymerase (5 U/µl).

La réaction d'amplification a été réalisée selon le programme suivant :

- Une dénaturation à 94°C pendant 2min
- 10 cycles de : 94°C 10s, 58.5°C 30s et 68°C 12min (1 minute/Kb)
- 20–30 cycles de: 94°C 10s, 58.5°C 30s, 68°C 12min (+20 sec/cycle)
- Une extension finale: 68°C 5min

II.13. PCR en temps réel

Cette technique consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisée à chaque cycle grâce à un marqueur fluorescent[310]. La méthode choisie dans notre étude est celle du SYBR Green. Cet agent intercalant, une fois lié à l'ADN double brin, émet une fluorescence qui est directement mesurée dans le tube PCR à l'aide d'un fluoromètre couplé au thermocycleur. La fluorescence augmente en fonction de la quantité d'ADN double brin présenté dans le tube.

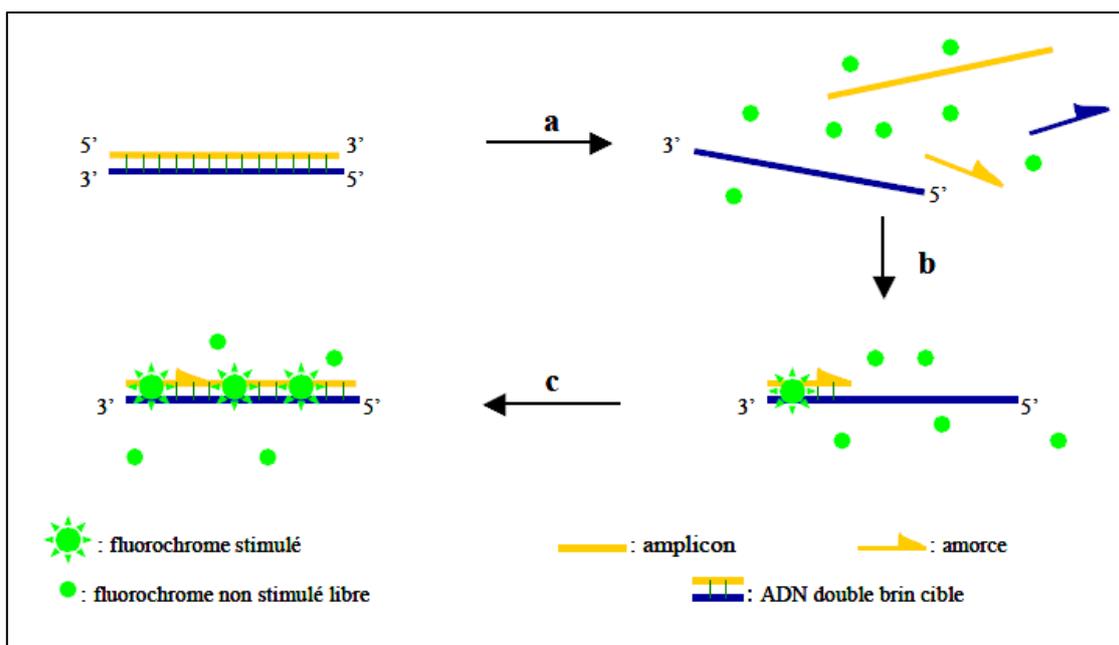


Figure 27. Principe de la PCR quantitative en utilisant les agents fluorescents se liant à l'ADN double brin[311].

- (a) Durant la dénaturation, le SYBR Green I libre exhibe peu de fluorescence. (b) À la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation. (c) Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut-être suivi en temps réel.

Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant. Plus l'échantillon est concentré en molécules cibles à l'origine, moins il faudra de cycles pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme le Ct pour « Threshold Cycle » ou « cycle seuil » et apparaît en début de phase exponentielle. L'augmentation de cette fluorescence se scinde en 3 phases distinctes:

1. La phase de bruit de fond : la quantité de fragment amplifié est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond.
2. La phase exponentielle : la quantité de fragment amplifié génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil. La quantité obtenue de produit PCR est directement proportionnelle au nombre de copies initiales du fragment d'ADN amplifié.
3. la phase de plateau (ou de saturation) : correspond à un ralentissement de l'amplification qui est souvent du à l'épuisement d'un des différents réactifs de la PCR.

II.13.1. Réactifs et réaction

L'efficacité de la PCR est calculée par le logiciel à partir de la pente de la courbe d'amplification dans la phase exponentielle. L'efficacité de PCR pouvant fortement impacter

les niveaux d'expression obtenus, un nombre suffisant d'analyses doit être effectué pour assurer la validité des résultats. En général, chaque gène est analysé deux fois en triplicata.

La quantification relative fait intervenir un gène de ménage (Housekeeping gene HKG) qui va servir de normalisateur : ce gène est considéré comme stable dans le modèle présenté, il ne subira pas de changement d'expression en fonction des conditions analysées. Ce gène de contrôle va permettre de compenser d'éventuels biais de la PCR provenant de :

- Variations dans la quantité, la qualité et le rendement d'extraction des échantillons
- Des erreurs de pipetage
- Variations de l'efficacité de la PCR

Pour quantifier l'ADN mitochondrial nous avons utilisé comme gène cible le gène mitochondrial ND4 (NADH déshydrogénase 4), qui est localisé dans une région non polymorphe et stable, et le gène nucléaire GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Déshydrogénase) comme gène de ménage (Tableau 11).

Tableau 11. Amorces utilisées pour la recherche des délétions mitochondriales par PCR quantitative

Amorces		Taille (pb)	Tm (°C)
ND4	F 5'CGCACTAATTTACTCA3'	108	52
	R 5'GCTAGTCATATTAAGTTGTTG3'		
GAPDH	F 5'CCCTGTCCAGTTAATTTC3'	85	52
	R 5'CACCCTTTAGGGAGAAA3'		

La quantification par PCR quantitative en temps réel (qPCR) a été réalisée à l'aide du kit « Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Applied Biosystems) » sur l'appareil « Step One™ Real-Time PCR System » (Applied Biosystems).

La réaction a été menée dans un volume final de 10 µl contenant : 5 µl SYBER MASTER Mix (Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), Thermo Scientific), 0,4 µl de chaque amorce sens et inverse (10 µM), 1 µl ADN (10 ng/ul).

Le mélange inclus dans ce Kit contient : de la polymérase Maxima® Hot Start Taq DNA polymerase, le tampon de l'enzyme, un mélange de dNTP, du SYBR® Green I dye et ROX™ passive reference dye.

La PCR en temps réel (PCRq) a été réalisée dans les conditions suivantes selon les instructions du fournisseur (Figure 28).

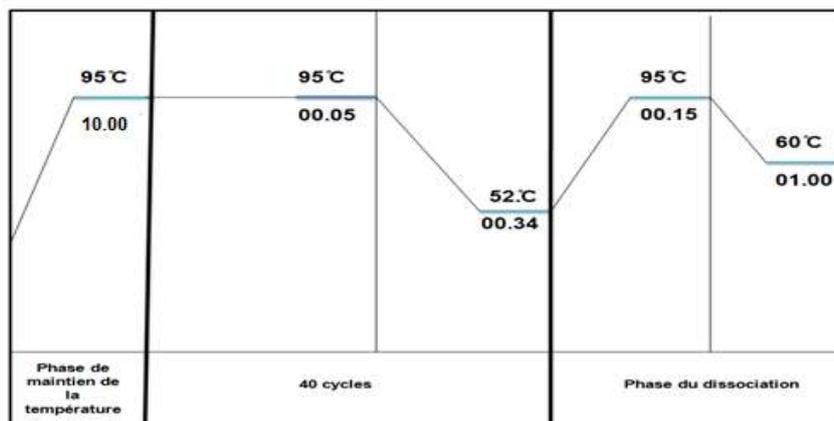


Figure 28. Cycle thermique de la PCR quantitative

II.13.2. Optimisation des conditions de la qPCR

Une optimisation des conditions de l'amplification est primordiale pour s'assurer de la spécificité de l'amplification et de la bonne efficacité des amorces utilisées.

Vérification de la spécificité des amorces

- La vérification de la spécificité des amorces a été faite pour chaque fragment grâce aux températures de fusion de chaque couple lors de la qPCR. Le pic unique de la fluorescence témoigne la spécificité d'amplification et de l'absence de contamination. Dans le cas de notre gène étudié ND4, la température de fusion est de 78°C. La présence des pics secondaires indique la formation d'un dimère d'amorces ou bien une fixation non spécifique des amorces sur d'autres cibles. Un changement conditions de l'amplification notamment la température d'hybridation est nécessaire dans ce cas. Egalement, une absence d'amplification dans le témoin négatif doit être vérifiée. Ainsi, la meilleure température d'hybridation pour chaque couple a été retenue.

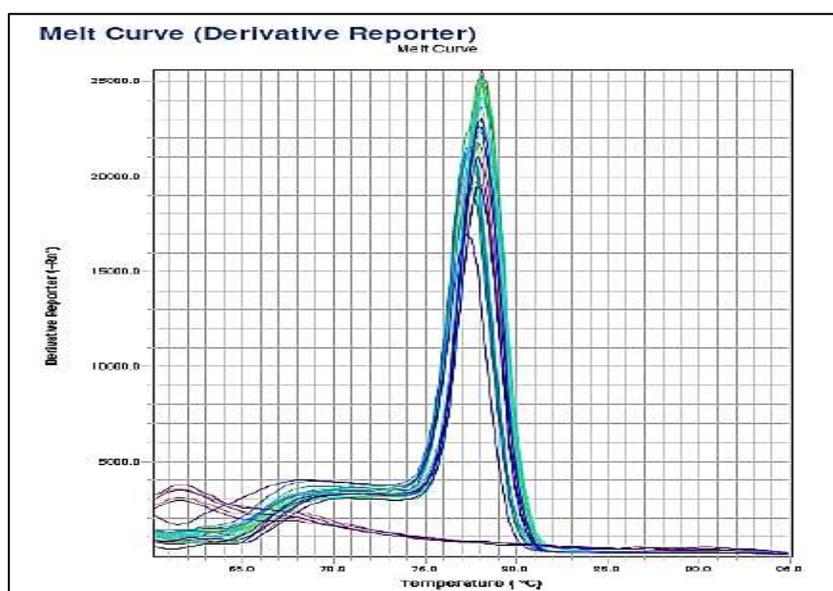


Figure 29. Courbe de fusion du gène ND4

- Evaluation de l'efficacité des amorces : nous avons testé, pour le même couple d'amorces, des dilutions sériées de l'échantillon matrice. Trois dilutions ont été préparées (100ng/μl, 10ng/μl et 1ng/μl). Les Ct générés à partir de la gamme étalon et du témoin permettent de tracer une droite de régression informative de l'efficacité du couple en question à travers les valeurs de la pente et du R². L'idéal c'est d'avoir une R² = 1, des valeurs proches sont acceptables. Les valeurs des pentes sont notés pour calculer l'efficacité selon la formule $E=10^{-1/pente}$, prise en considération lors de la quantification relative. Cette étape nous a permis de choisir, le couple à utiliser pour réaliser son quantification (Tableau 12).

Tableau 12. Les données fournies par les courbes de standard correspondant à chaque couple

Le couple	La pente	E	R2
ND4 (52°C)	-3.14	2.08	1
GAPDH (52°C)	-2.98	2.16	0.996

II.13.3. Calcul de la quantité relative de l'ADN mitochondrial

La quantité relative d'ADN mitochondrial a été mesurée en utilisant les formules décrites précédemment[312]:Quantité d'ADN mt = $2 \times 2^{\Delta ct}$; où Δct est la différence des valeurs du Ct entre le gène de GAPDH et le gène ND4.

La quantité d'ADN mitochondrial varie selon l'âge et selon les tissus. Pour comparer nos résultats à des témoins nous avons utilisé les valeurs de la quantité d'ADNmt selon l'âge et le tissu publiés précédemment (Figure 30).

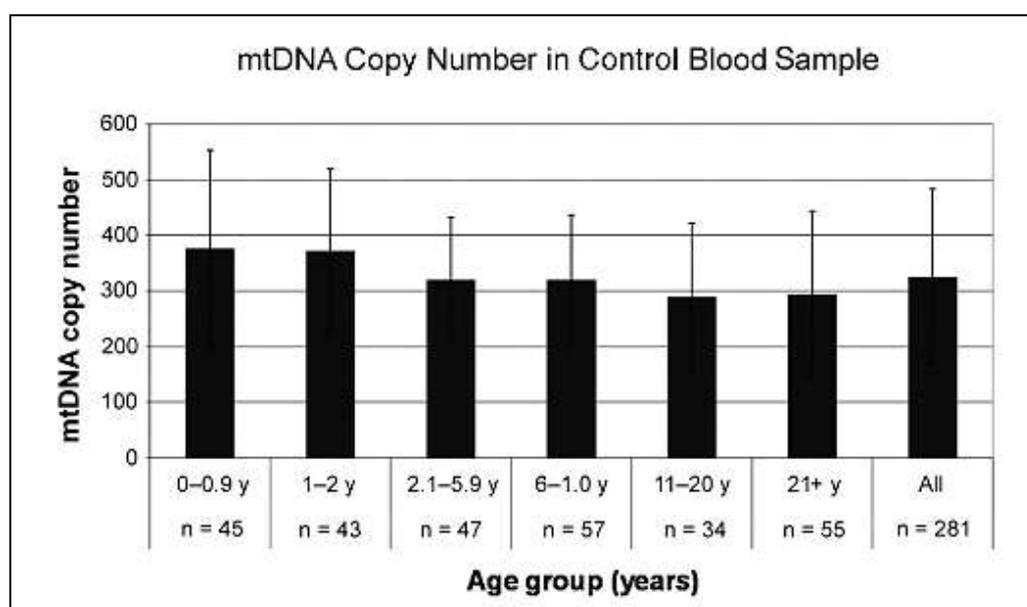


Figure 30. Les différentes valeurs de la quantité d'ADNmt selon l'âge et le tissu étudié [313].

Un pourcentage de réduction (Rq) de l'ADNmt /ADNn est ainsi calculé (Patient/Témoin) :

$$Rq (\%) = \frac{\text{Quantité d'ADNmt (Patient)}}{\text{Quantité d'ADNmt (Témoin)}} \times 100$$

Avec $Rq > 100$: Ilya une surexpression de l'ADN mitochondrial.

$Rq < 100$: Ilya une déplétion de l'ADN mitochondrial.

II.14. Analyse statistique

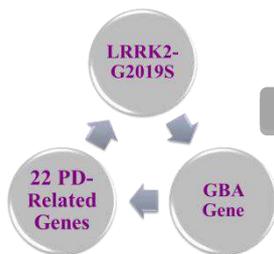
Les calculs statistiques ont été réalisés sous le langage de programmation R :

- Le test Chi-deux: comparaison de deux critères qualitatifs en utilisant la commande "**chisq.test**". Ce test est conçu pour déterminer si la différence entre deux distributions de fréquences est due à l'erreur d'échantillonnage ou elle est suffisamment grande pour être significative.
- Le test de Student ou T-test: comparaison de la moyenne de deux échantillons en utilisant la commande "**t.test**".
- l'Analyse de la variance ou ANOVA : comparaison de la moyenne de plus de deux échantillons en utilisant la commande "**ao**".
- Modèles de régression logistique : une analyse multivariée qui permet de mesurer l'association entre la survenue d'un évènement (variable expliquée qualitative) et les facteurs susceptibles de l'influencer (variables explicatives). Le choix des variables explicatives intégrées au modèle de régression logistique est basé sur une connaissance préalable de la physiopathologie de la maladie et sur l'association statistique entre la variable et l'évènement, mesurée par l'odds ratio. Dans la comparaison des données cliniques entre les porteurs et les non porteurs de la mutation p.G2019S sur le gène *LRRK2*; les variables explicatives utilisées étaient l'âge et le sexe du patient, la durée d'évolution de la maladie et la dose du traitement ; pour la comparaison des MMSE et les troubles cognitifs une correction supplémentaire par rapport au niveau scolaire a été réalisée. La commande utilisée sous R pour cette analyse est "**glm**".
- Estimateur de Kaplan-Meier: cette méthode permet d'obtenir rapidement une courbe de survie, ainsi que le temps médian résiduel de survie pour analyser l'évolution de l'effectif d'une population donnée avec le temps. Une Censure à droite a été utilisée pour les porteurs sains de la mutation. Cette analyse a été réalisée en utilisant le package "**survminer**" (**survfit**) sous R pour :
 - Calculer la pénétrance de la mutation p.G2019S à partir du Tableau de risque.

- Comparer le risque de développer la MP à un âge donné entre les porteurs de la mutation p.G2019S et les non porteurs.
- Analyser l'influence des snps (*LRRK2*, *DNM3*) sur l'âge de début de la maladie chez les patients porteurs de la mutation p.G2019S.

Les courbes de survies ont été dessinées grâce à la commande "**ggsurvplot**". Le test de log-rank a été utilisé pour examiner l'homogénéité des courbes de survie par la commande "**survdif**" et le modèle de régression à risque proportionnel de Cox (la commande "**coxph**") a été utilisé pour évaluer la force de l'association des génotypes étudiés avec l'âge de début de la maladie.

Résultats & Discussion



Partie I

Analyse moléculaire des gènes connus

A. Analyse de la mutation *LRRK2*-p.G2019S

I. Fréquence

La protéine *LRRK2* appartient à la famille des ROCO, qui sont des Ras-GTPases comprenant des multiples domaines hautement conservés à travers les espèces. Cette protéine est remarquable par la dualité de ses fonctions car c'est à la fois une GTPase par son domaine Roc (Ras of complex proteins) et une kinase par son domaine MAPKKK (mitogenactivated kinase kinase kinase), ce qui suggère un rôle de cette protéine dans une ou plusieurs voies de signalisation intracellulaire. La mutation p.G2019S touche le domaine kinase de la protéine *LRRK2* (Figure 31). Des études fonctionnelles réalisées *in vitro* utilisant des cultures de cellules transfectées avec le mutant p.G2019S, montrent une augmentation de l'activité d'autophosphorylation [314, 315].

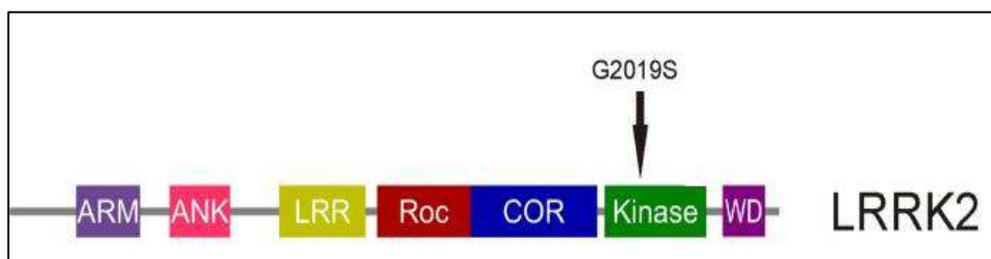


Figure 31. Localisation de la mutation p.G2019S sur le gène *LRRK2*.

La mutation [NM_198578.3:c.6055G>A, NP_940980.3:p.Gly2019Ser, rs34637584] sur l'exon 41 du gène *LRRK2* a été criblée par la méthode de Taqman chez tous les 250 patients. Cette mutation a été identifiée chez 107 cas représentant 42,8% de notre cohorte. Parmi ces 107 porteurs, 13 avaient la mutation à l'état homozygote. Cette mutation avait une fréquence similaire dans les cas familiaux (57%) que dans les cas sporadiques (39,7%) et dans les cas à âge de début précoces (55%) que dans les formes tardives (43,8%). Nos résultats correspondent aux fréquences décrites précédemment dans la population nord-africaine [169, 316, 317]. La fréquence de la mutation p.G2019S varie considérablement selon l'origine géographique et ethnique des populations étudiées. Elle a été initialement associée à 6-7 % des formes familiales et à 2 % des cas sporadiques d'origine Européenne [318–320]. Elle est très rare en Asie (<0,1%) [321] et de fréquence modérée en Canada et en Amérique du sud (2-5% des formes familiales, 0,8% des cas sporadiques) [322]. Cette fréquence augmente à 13% des cas sporadiques et 30% des cas familiaux chez les Juifs ashkénazes [323, 324]. Cependant la fréquence la plus élevée de la mutation p.G2019S a été identifiée dans la

population Nord-Africaine responsable de 41% des cas parkinsoniens sporadiques et 37% des cas familiaux[169, 316, 317]. Cette fréquence élevée dans notre population suggère l'existence d'un effet fondateur unique.

Dans notre groupe de témoins sains, la mutation p.G2019S était totalement absente, contrairement aux études précédentes qui décrivaient des fréquences plus élevées dans les sujets témoins. Healy et al. ont observé des fréquences de 0,05% chez les Européens, de 1% chez les Juifs Ashkénazes et de 0,5% chez les Nord-Africains [325]. Une autre étude sur 3100 sujets sains d'origine Européenne, 597 témoins d'Afrique du Nord et 361 de Juifs Séfarades, a montré que la fréquence de la mutation p.G2019S est de 1/46 parmi les témoins Nord Africains et de 1/30 parmi les témoins marocains d'origine Berbère [326]. Une incidence élevée (1/72) a été également trouvée parmi les Juifs Séfarades, alors qu'elle est de 1/1550 dans la population Sud Européenne[326] (Figure 32).

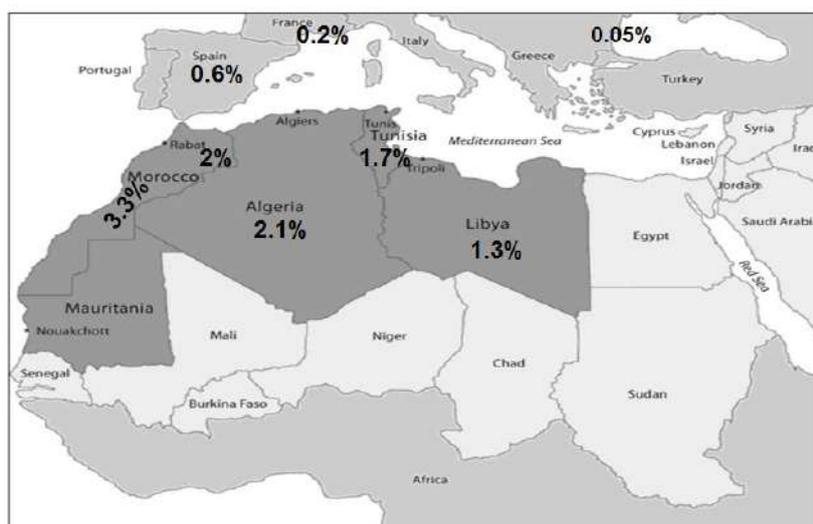


Figure 32. Fréquence de la mutation p.G2019S parmi les témoins dans différentes populations[326].

II. Recherche de l'haplotype porteur de la mutation p.G2019S

Il a été prouvé que la mutation *LRRK2*-p.G2019S résulte d'au moins 3 événements fondateurs par le génotypage de 74 marqueurs dans 126 familles d'origines différentes, dont 67 originaires d'Afrique du Nord [171]. Pour l'identification de l'haplotype porteur de cette mutation dans la population Tunisienne, les mêmes marqueurs bi-alléliques de type SNPs décrits précédemment ont été analysés chez les 107 patients porteurs de la mutation p.G2019S[171]. L'haplotype fondateur commun a été déduit à partir des patients porteurs de la mutation à l'état homozygote et de leurs apparentés non porteurs (Tableau 13).

Tableau 13. Haplotype commun identifié chez tous les patients porteurs de la mutation p.G2019S.

Marqueur		Localisation	Haplotype
D12S2514	STR	5'UTR	291
rs7966550	c.2857T>C	Exon 22	T
D12S2516	STR	Intron 30	254
rs1427263	c.4872C>A	Exon 34	A
rs11176013	c.4911A>G	Exon 34	G
rs11564148	c.4939T>A	Exon 34	A
rs6581667	c.5948+2547G>C	Intron 40	C
rs6581668	c.5949-2490G>A	Intron 40	A
p.G2019S		Exon 41	A
rs10506155	c.6109+1683G>A	Intron 41	G
rs7954061	c.6109+1754A>G	Intron 41	G
rs7957151	c.6109+1787T>A	Intron 41	A

Notre étude est la première qui utilise un nombre assez important de patients non apparentés pour analyser l'haplotype porteur de la mutation p.G2019S dans la population Tunisienne (Tableau 14). Cette étude nous a permis de confirmer que la mutation p.G2019S est portée par le même haplotype chez tous les patients Tunisiens, indiquant l'existence d'un effet fondateur unique. Nos résultats sont en accordance avec ceux de Warren et al. qui ont étudié 17 familles Tunisiennes [327].

L'haplotype identifié en commun chez nos patients est l'haplotype le plus fréquent identifié jusqu'à présent connu comme "Haplotype 1"[171, 327–331]. Les résultats de Lesage et al. ont montré que la mutation p.G2019S s'est produite indépendamment au moins deux fois au cours de l'évolution humaine récente; une fois sur l'haplotype 1 initial et séparément sur les haplotypes liés à l'évolution (haplotype 2 et 3). Cela suggère que la prévalence élevée de l'haplotype 1 par rapport aux haplotypes 2 et 3 est probablement due à l'origine plus précoce de ce haplotype. L'haplotype 2 a été observé seulement chez des individus d'origine Européenne, alors que l'haplotype 3 a été principalement observé dans des familles Japonaises et quelques familles Turques.

Tableau 14. Les études antérieures qui ont étudié l'haplotype 1 porteur de la mutation p.G2019S.

Référence	Nombres des marqueurs	Nombres de familles et leurs origines	Nombres de familles avec l'haplotype 1
Kachergus et al. [329]	17 microsatellites, 4 SNPs	7 Norvégiennes, 3 Américaines, 2 irlandaises, 1 polonaise	Toutes
Goldwurm et al. [328]	13 microsatellites, 6 SNPs	14 Italiennes, 1 Brésilienne, 1 Portugaise, 1 Grec, 1Morocaine	Toutes

Lesage et al. [330]	17 microsatellites, 4 SNPs	3 Algériennes, 3 Marocaines, 1 Tunisienne, 3 Françaises, 1 néerlandaise, 1 Portugaise, 1 Américaine, 1 Belge	Toutes
Zabetian et al. [331]	13 microsatellites, 12 SNPs	13 européennes, 9 Juives	10 européennes, 9 Juives
Zabetian et al. [332]	7 microsatellites, 9 SNPs	3 Européennes, 1 Juive ashkénaze, 2 Japanese	3 Europeans, 1 Juive ashkénaze
Tomiyama et al. [333]	9 microsatellites, 3 SNPs	3 Israéliennes, 3 Tunisiennes, 1 Marocaine, 1 Japonèse	3 Israéliennes, 3 Tunisiennes, 1 Marocaine
Warren et al. [327]	2 microsatellites, 39 SNPs	17 Tunisiennes	Toutes
Bar-Shira et al. [334]	15 microsatellites, 1 SNP	66 Ashkenazes, 4 moitié-1 Juive ashkénaze, 4 bulgare, 1 syrienne, 1 Turquie, 1 Marocaine	Toutes
Lesage et al. [171]	20 microsatellites, 54 SNPs	67 arabe nord africaine, 18 Européennes, 32 Juive ashkénaze, 5 Juive Sephardic, 1 Japonèse, 1 Turquie, 2 familles mixtes	99
Notre étude	2 microsatellites, 10 SNPs	107 patients Tunisiens	Toutes

III. Origine ethnique de la mutation p.G2019S

Plusieurs études sur différentes populations à travers le monde ont tenté de définir l'origine de la mutation p.G2019S sur le gène *LRRK2* et de dater son âge. Une étude sur une cohorte Européenne a estimé l'âge de la mutation à 725 ans [330]. Une étude ultérieure sur les familles Ashkénazes, Européennes et Américano-Européennes a estimé l'âge à 2250 ans; une période qui chevauche avec la Diaspora Juive (dispersion des Juifs exilés de leur pays) de 586 av. J.C. à 70 après J.C. [332]. De plus, Bar-Shira et al. ont estimé que l'ancêtre commun des porteurs Juifs Ashkénazes de la mutation sur l'haplotype 1 vivait il y a environ 1830 ans [334]. Ces études ont suggéré que la mutation p.G2019S pourrait alors être réintroduite par la population Ashkenaze à d'autres populations Juives, Européennes et Nord-Africaines. Cependant, l'étude la plus significative a été réalisée par Lesage et al. sur un large échantillon de patients appartenant à plusieurs ethnies, et qui a été daté l'haplotype 1 d'au moins 4000 ans originaire d'un fondateur Proche-Orient [171, 324]. Néanmoins, l'origine exacte de la mutation reste inconnue. En effet la région Proche-Orient est une région très hétérogène ethniquement et essentiellement composée des berbères Nord-Africains et des arabes du moyen orient. Plusieurs études supportent l'hypothèse que la mutation p.G2019S portée sur l'haplotype 1 a une origine berbère plutôt qu'Arabe ou Juive Ashkénaze. En fait, deux études sur des patients

Nord-Africains d'origine marocaine, ont conclu que la mutation p.G2019S provenait d'un patient berbère marocain qui vivait il y a environ 3840-5000 ans [335, 336].

Pour préciser l'origine de la mutation p.G2019S portée sur l'haplotype 1 dans notre population, nous avons étudié les haplogroupes du chromosome Y chez les 65 mâles porteurs de cette mutation (Figure 33).

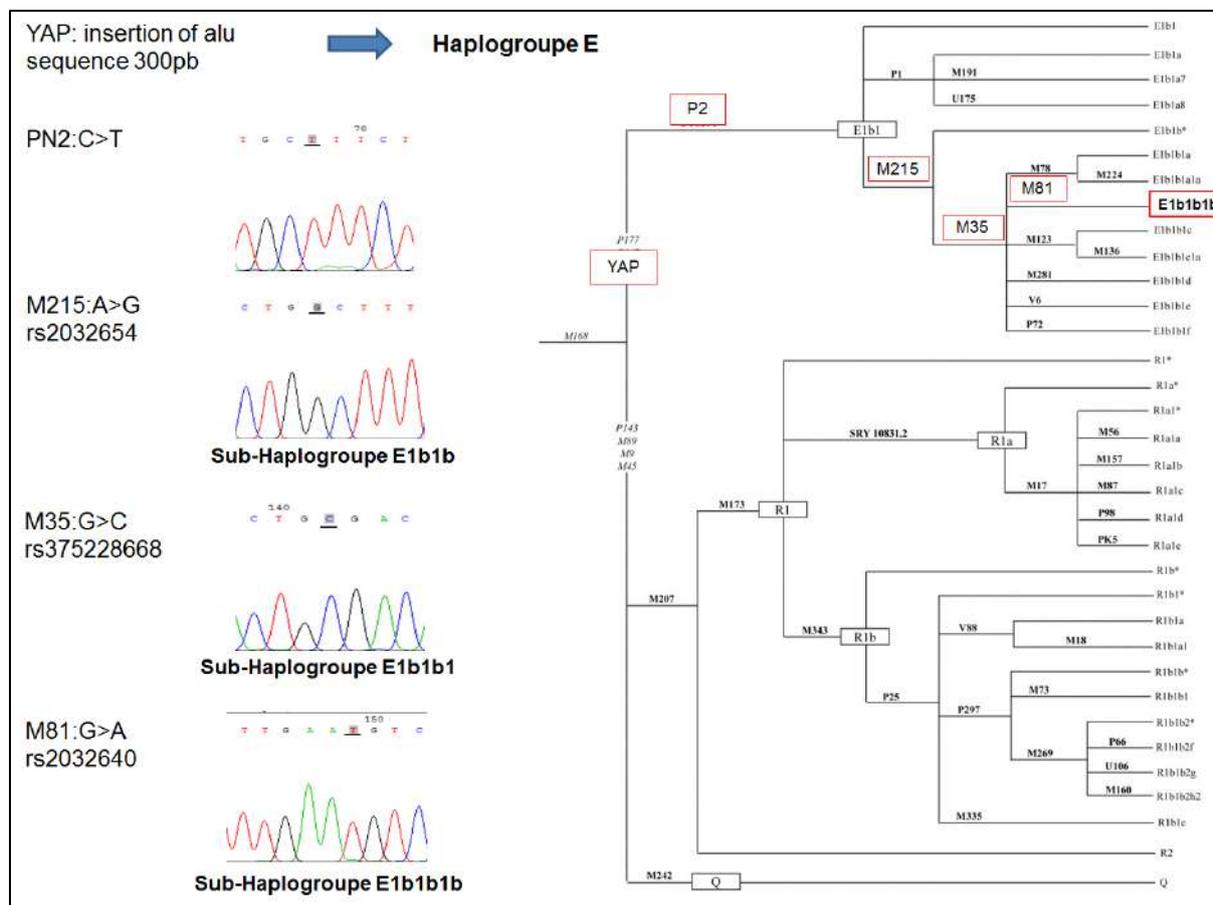


Figure 33. Génotypage du sous-haplogroupe E1b1b1b représentatif de l'origine berbère défini par l'ensemble des marqueurs (YAP/PN2/M215/M35/M81).

Cette analyse a montré que 51% de nos patients avaient une origine berbère contre seulement 30% des témoins sains de même origine (60 individus). 31% des patients avaient une origine Arabe et 18% avaient une origine Européenne (Figure 34). Ces résultats suggèrent que, dans la population Tunisienne, la mutation p.G2019S portée sur l'haplotype 1 provient probablement d'un ancêtre commun d'origine berbère. Ce qui pourrait expliquer sa fréquence élevée en Afrique du Nord ayant une origine ancestrale berbère et sa faible fréquence dans les pays du moyen orient ayant une origine ancestrale Arabe. En effet la mutation p.G2019S était totalement absente dans l'Arabie Saoudite et tous les pays du Golfe [13, 337]. En Égypte, une fréquence de 9,7% parmi les cas sporadiques dans le nord [338] et de seulement 1,45% dans

le sud du pays a été rapportée [339]. Ensemble, ces données suggèrent qu'il est hautement improbable que la mutation p.G2019S soit d'origine Arabe.

Nos résultats sont en accordance avec celles publiées dans la population Marocaine suggérant que la mutation p.G2019S peut avoir apparue un ancêtre autochtone et il est très probablement originaire d'un fondateur berbère qui a vécu il y a au moins 5000 ans[335, 336]. Cet âge estimé est également en accord avec nos résultats et soutient l'hypothèse de l'origine berbère de la mutation p.G2019S portée sur l'haplotype1, puisque le sous-haplogroupe E1B1B1B (M81) était porté par une population qui a apparue en Afrique du Nord, il y a environ 5600 ans [340]. En revanche, les origines Arabes en Tunisie remontent aux expansions islamiques du VIIe siècle [269].

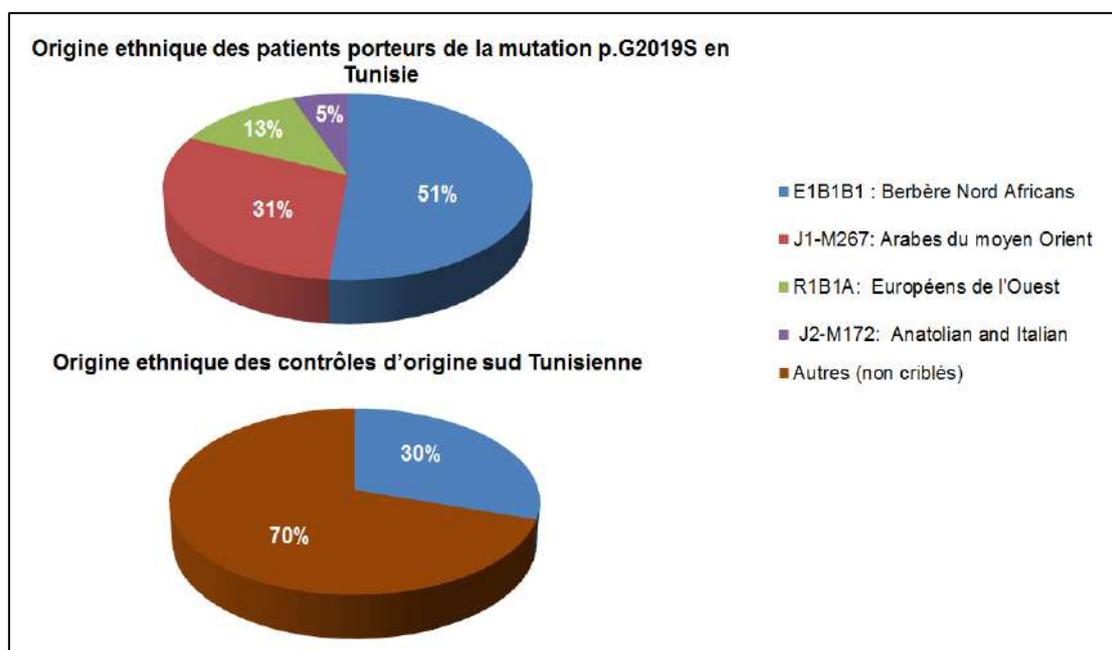


Figure 34. Origine ethnique des patients porteurs de la mutation p.G2019S et des témoins sains dans notre cohorte.

IV. Corrélation génotype-phénotype

Le phénotype des patients parkinsoniens porteurs de la mutation *LRRK2-p.G2019S* a été décrit d'être assez similaire à celui des formes idiopathiques. Cependant, plusieurs études ont montré que certaines particularités cliniques sont associées à la mutation p.G2019S[341]. L'objectif de cette partie était d'explorer les caractéristiques cliniques des patients tunisiens parkinsoniens porteurs de la mutation p.G2019S en comparaison aux non-porteurs. Nous nous sommes intéressés aussi à étudier la différence clinique entre les porteurs mâles et femelles de cette mutation aussi bien que les caractéristiques cliniques entre les porteurs homozygotes et hétérozygotes de la mutation.

Nous avons collecté les données épidémiologiques (sexe, âge, éducation, pedigree, origine rurale ou urbaine, présence de cas similaires dans la famille); les antécédents médicaux (diabète, dyslipidémie, exposition toxique, maladie cardiaque, accident vasculaire cérébral, traumatisme crânien); les données cliniques (âge de début de la maladie, premier signe et sa localisation, signes moteurs, dose quotidienne équivalente de lévodopa, signes non moteurs, présence de dystonie, MMSE, échelle de Hoehn et Yahr, Beck's Depression Inventory). Pour comparer les sous-groupes, nous avons pris en compte le score UPDRS-III "ON" lorsque le patient est sous traitement. Le degré de sévérité des symptômes de la MP a été également mesuré à l'aide de l'échelle de Hoehn et Yahr [69]. L'examen d'état mini-mental (MMSE) a été utilisé pour mesurer le degré de déficience cognitive en fonction du niveau d'éducation selon la formule décrite dans la partie Patients et méthodes, chapitre I.3.2.3 [293]. L'inventaire Beck's Depression Inventory a été utilisé pour évaluer les troubles de l'humeur et pour détecter la dépression comme il a été décrit dans la partie Patients et méthodes, chapitre I.3.2.4 [294]. Pour évaluer la fonction autonome et sensorielle et la qualité du sommeil, le patient a été invité à répondre à un questionnaire.

Les phénotypes ont été classés en trois sous-groupes - tremblement dominant (TD), trouble de l'instabilité posturale (PIGD), ou phénotypes indéterminés - selon les formules mentionnées dans la partie Patients et méthodes, chapitre I.3.5 [296].

Toutes les caractéristiques cliniques et les scores moteurs (UPDRS, échelle de Hoehn et Yahr) ont été corrigés pour les facteurs de confusion (âge, sexe, durée de la maladie et la dose de lévodopa quotidienne) et, en plus, pour le niveau d'éducation pour comparer les scores MMSE et les déficiences cognitives. Le seuil de signification statistique a été fixé à $p = 0,05$. L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'un article publié à « Acta Neurologica Scandinavica » (Impact factor: 3.126).

LRRK2 G2019S Parkinson's disease with more benign phenotype than idiopathic

Sawssan Ben Romdhan^{1,2,4}  | Nouha Farhat¹ | Amina Nasri³ | Suzanne Lesage² | Olfa Hdiji¹ | Mouna Ben Djebara³ | Zied Landoulsi³ | Giovanni Stevanin^{2,4} | Alexis Brice² | Mariem Damak¹ | Riadh Gouider³ | Chokri Mhiri¹

¹Laboratory of Neurogenetics, Parkinson's Disease and Cerebrovascular Disease, University Hospital Habib Bourguiba, Sfax, Tunisia

²Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, INSERM U1127, Sorbonne Université, UPMC Paris VI Univ. UMR_S1127, CNRS UMR 7225, Paris, France

³Department of Neurology, University Hospital Razi, Tunis, Mannouba, Tunisia

⁴École Pratique des Hautes Études EPHE, PSL Research University, Paris, France

Correspondence: Sawssan Ben Romdhan, Department of Neurology, Habib Bourguiba University Hospital, El-Ferdaous Street, CP 3029, Sfax, Tunisia (sawssan.benromdhan@yahoo.fr).

Objectives: The *LRRK2*--G2019S mutation is the most common cause of Parkinson's disease (PD) in North Africa. G2019S--PD has been described as similar to idiopathic with minor clinical differences. The aim of this study was to determine the G2019S-- related phenotype and to investigate gender and gene dosage effects on clinical features of G2019S carriers.

Patients and methods: The G2019S mutation was screened in 250 Tunisian patients with PD. Twenty--four patients carrying mutations in other PD genes were excluded. Logistic regression models were used to compare clinical features between the studied groups.

Results: G2019S carriers (107 cases) and non--carriers (119 cases) were similar in disease duration, levodopa doses, and gender and phenotype distributions. However, carriers had a younger age at examination, higher level of education, and were more likely to report family history of PD and to develop PD at earlier age ($P = 0.017$). Adjusted for age, sex, disease duration, levodopa--equivalent dose and educational level, MMSE scores remained significantly higher (adjusted $P = 0.019$) and UPDRS--III scores were lower (adjusted $P = 0.012$) in the G2019S carriers than non--carriers. Demographic characteristics of men and women with G2019S mutation were similar, but men had higher level of education, better cognition (adjusted P --value for educational level = 0.042) and less tendency towards depression than females (adjusted $P = 0.046$). Furthermore, PD phenotype did not differ between the homozygous and heterozygous G2019S carriers.

Conclusion: In this study, G2019S carriers had a more benign phenotype than non--carriers. Cognitive impairment and depression were less common in G2019S male carriers compared with females. In addition, we found that *LRRK2* gene dosage does not influence the severity of PD.

KEYWORDS

G2019S mutation, Parkinson's disease, phenotype

1 | INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by a severe loss of dopaminergic neurons and the formation of α -synuclein positive aggregates.¹ These pathological alterations result in classic PD motor symptoms such as bradykinesia, resting tremor, rigidity and postural instability, and non-motor symptoms, namely autonomic dysfunctions, cognitive impairment, neuropsychiatric symptoms, sensory problems and sleep disorders.¹

Mutations in the leucine-rich repeat kinase 2 gene (*LRRK2*), and particularly the p.G2019S (rs34637584: c.6055G>A), are the most commonly known causes of monogenic forms of PD.² The frequency of the G2019S mutation is highly variable between regions and ethnic groups. The highest frequencies were observed among North African Arab-Berber patients (41% of sporadic and 37% of familial PD cases) and Ashkenazi Jewish patients with PD (13% of sporadic and 30% of familial cases).^{3,4} The phenotype of *LRRK2*-PD has been described as quite similar to idiopathic PD. However, several studies found that some clinical particularities are associated with G2019S mutation.² This raises the question of whether the phenotype of *LRRK2*-G2019S PD varies between different ethnic groups. In this context, the aim of this study was to explore clinical features of Tunisian patients with PD carrying the *LRRK2*G2019S mutation comparatively with non-carriers and to investigate gender and gene dosage effects on clinical features in G2019S carriers.

2 | PATIENTS AND METHODS

2.1 | Participants

Our study included 250 PD cases recruited from 2 sites: 75.6% of cases recruited from Habib Bourguiba University Hospital (South Tunisia) and the other 24.4% of the cases were recruited from Razi University Hospital (North Tunisia). Our study was approved by the local ethics committee, and an informed consent was obtained from each patient to participate in the study. None of the subjects was aware of his/her genetic status, and they were all enrolled in the study regardless of their familial history of PD, age at examination and age at onset (AAO). A pedigree was established for each family. A case was considered as "familial" if at least one close relative (first-, second- or third-degree relative) was diagnosed with PD by a neurologist specialized in movement disorder. The remaining patients were classified as "sporadic" cases.

2.2 | Clinical investigations

A detailed physical examination was performed by a neurologist specialized in movement disorders, and the degree of disability was assessed by the same neurologist in both centers. All patients fulfilled the Movement Disorders Society (MDS) clinical diagnostic

criteria for Parkinson's disease.⁵ We prepared a case report form (CRF) to collect epidemiological data (gender, age, education, pedigree, rural or urban origin, presence of similar cases in the family); medical history (diabetes, dyslipidemia, toxic exposition, heart disease, stroke, cranial trauma); clinical data (AAO, first sign and its location, motor signs, non-motor signs, presence of dystonia, MMSE, Hoehn and Yahr scale, Beck's Depression Inventory). Levodopa-equivalent daily dose was calculated according to the conversion table proposed by Tomlinson et al⁶ To determine the degree of improvement, UPDRS score⁷ was calculated in the morning before taking medication and every 30 minutes after treatment ingestion until obtaining the lowest score. To compare between subgroups, we took into account the UPDRS-III score during the ON state for each patient. The percentage of improvement was calculated as follows: (baseline score-lowest score after medication) \times 100/baseline score.

The degree of severity of PD symptoms was also measured using the Hoehn and Yahr scale.⁸ The mini-mental state examination (MMSE) was used to measure the degree of cognitive impairment according to educational attainment.⁹ Any MMSE score higher than or equal to 21 for middle school (<6 years), 23 for high school (6-13 years) and 24 for university/graduate attainment (>13 years) was considered as normal.¹⁰ Beck's Depression Inventory was used to evaluate mood disturbance and detect depression.¹¹ Adult outpatients with a score higher than or equal to 20 were considered as severely depressed.¹² To evaluate the autonomic and sensory function and the quality of sleep, the patient was investigated to respond to a questionnaire.

Phenotypes were classified into three subgroups—tremor dominant (TD), postural instability gait disorder (PIGD) or indeterminate phenotypes—according to the published formulas.¹³

2.3 | Molecular analysis

All the patients were screened for *LRRK2* G2019S mutation by an allelic discrimination Taqman assay (Applied Biosystems PRISM 7000 sequence detection system, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All G2019S non-carrier patients were then screened for 22 PD-related genes (*ATP13A2*, *DCTN1*, *DNAJC13*, *DNAJC6*, *SPG11*, *EIF4G1*, *FBXO7*, *GBA*, *GCH1*, *LRRK2*, *PANK2*, *PARK2*, *DJ-1*, *PINK1*, *PLA2G6*, *POLG*, *SNCA*, *SYNJ1*, *TH*, *UCHL1*, *VPS13C* and *VPS35*). Twenty-four patients carrying mutation in *LRRK2* (other than G2019S mutation), *PARK2*, *PINK1*, *SYNJ1* and *GBA* genes were excluded from the study. The remaining 119 patients were classified as apparently idiopathic PD patients (iPD) and served as a comparator group. G2019S carriers were not screened for the other PD-related genes except for *GBA* gene, and no mutation was detected.

2.4 | Statistical analysis

The statistical programming language R (R Development Core Team, 2011) was used for descriptive statistics. Two-sample *t* tests and linear regression models in adjusted analyses were

applied to compare continuous clinical features between different groups. Chi-square tests in unadjusted analyses and logistic regression models in adjusted analyses were used to compare the categorical variables. The clinical features were compared between groups including G2019S carriers and iPD; homozygous and heterozygous G2019S carriers; men and women carrying the G2019S mutation. All clinical features and motor scores (UPDRS, Hoehn and Yahr scale) were corrected for confounding factors (age, gender, PD duration and Levodopa doses) and, additionally, for the educational level to compare cognitive impairment. The threshold of statistical significance was set at $P = 0.05$.

3 | RESULTS

The screening of the G2019S mutation revealed that 107 patients were carriers (42.8% of cases) with a slight male predominance (61.7%). Among these 107 G2019S carriers, 13 had the mutation at the homozygous state (12% of G2019S carriers). This mutation had a comparable frequency in familial cases (57%) than in sporadic (39.7%) ($P = 0.88$) and in early-onset cases (55%) than in late-onset forms (43.8%) ($P = 0.42$).

The mean AAO of G2019S carriers was 4 years earlier than non-carriers ($P = 0.017$). G2019S carriers were more likely to re-report a family history of PD ($P = 0.009$). They had a younger age at

Table 1. Demographics and disease characteristics of LRRK2 G2019S carriers and non-carriers

	G2019S carriers	G2019S non-carriers	<i>P</i> -value and adjust <i>P</i> -value
Demographic factors and disease characteristic			
No. of cases	107	119	
No. of men	66 (61.7%)	68 (57.2%)	0.58
No. with family history of PD	57 (53.27%)	43 (36.1%)	0.009
No. with consanguineous family	49 (45.8%)	58 (48.7%)	0.67
Education level (y)	6.28 ± 5.13	4.82 ± 4.47	0.044
Age at examination (y)	60.78 ± 11.13	64.85 ± 13	0.012
Age at onset (y)	53.8 ± 11.57	57.53 ± 11.75	0.017
PD duration (y)	7.2 ± 5.8	7.38 ± 6.71	0.8
Levodopa dose (mg)	641.8 ± 389.5	623.6 ± 333.6	0.56
Response to treatment	81.2%	74%	0.26
Motor features			
UPDRS	30.77 ± 16.87	37.69 ± 19.6	0.012^a
Hoehn and Yahr	2.5 ± 1.1	2.85 ± 1.27	0.1 ^a
No. with PIGD phenotype	49	48	0.4 ^b
No. with TD phenotype	39	38	
No. with indeterminate phenotype	19	33	
Non-motor features			
MMSE	26 ± 3.46	24.3 ± 4.7	0.019^c
No. with cognitive impairment	26 (24.5%)	50 (42%)	0.022^c
No. with autonomic dysfunction	74 (69.1%)	85 (71.4%)	0.91 ^a
No. with sensory disorders	57 (53.3%)	57 (48%)	0.38 ^a
No. with sleep disorders	55 (51.4%)	58 (48.7%)	0.68 ^a
No. with depression	35 (32.7%)	48 (40.3%)	0.36 ^a

No., number; PD, Parkinson's disease; PIGD, postural instability gait disorder; TD, tremor dominant.

^aAnalyses were adjusted for gender, age, disease duration and levodopa doses.

^bMotor phenotypes were dichotomized into categories of PIGD vs non-PIGD.

^cAnalyses were adjusted for gender, age, disease duration, levodopa doses and education.

P-values and adjusted *p*-values below the significance threshold of 0.05 are highlighted in bold.

examination ($P = 0.012$) and more years of formal education than non-carriers ($P = 0.044$). In logistic regression models adjusted for age, gender, PD duration, levodopa doses and educational level, G2019S carriers had a significantly higher MMSE score (adjust $P = 0.019$) and a lower UPDRS-III score during the ON phase (ad-just $P = 0.012$) compared with non-carrier (Table 1). When motor phenotypes in each group were dichotomized into two categories: PIGD and non-PIGD phenotypes (tremor dominant and indeterminate phenotypes), there was no significant difference in the frequency of motor phenotypes between G2019S carriers and non-carriers (Table 1).

We also investigated the possible impact of homozygous status for the G2019S mutation on clinical severity (Table 2). Clinical

scores, the frequency of the different motor phenotypes and presence of non-motor symptoms were compared between both groups (homozygous and heterozygous G2019S carriers), and no significant differences were noted.

Further, we studied gender influence on the clinical features of G2019S carriers (Table 3). Demographic characteristics of men and women with the G2019S mutation were similar, but men had a higher level of education. Statistical comparison between G2019S male and female carriers using logistic regression models adjusted for age, PD duration, levodopa doses and educational level showed that male carriers had better cognition (adjust $P = 0.012$) and a lower risk to develop depression (adjust $P = 0.046$).

	G2019S HMZ carriers	G2019S HTZ carriers	P-value and adjust P-value
Demographic factors and disease characteristic			
No. of cases	13	94	
No. of men	5 (38.4%)	60 (63.8%)	0.08
No. with family history of PD	7 (53.8%)	50 (53.2%)	0.83
No. with consanguineous family	7 (53.8%)	42 (44.68%)	0.56
Education level (y)	5.8 ± 3.34	6.3 ± 5.3	0.77
Age at examination (y)	60.77 ± 12.3	60.77 ± 13.15	0.99
Age at onset (y)	53.4 ± 10.69	53.83 ± 11.57	0.95
PD duration (y)	7.3 ± 5.23	7.44 ± 5.9	0.97
Levodopa dose (mg)	669.2 ± 516.34	637.8 ± 374.5	0.7
Response to treatment	83.3%	80.9%	0.59
Motor features			
UPDRS	38.1 ± 24.3	29.8 ± 15.59	0.22 ^a
Hoehn and Yahr	2.55 ± 1	2.5 ± 1.2	0.67 ^a
No. with PIGD phenotype	5	44	0.78 ^b
No. with TD phenotype	4	35	
No. with indeterminate phenotype	4	15	
Non-motor features			
MMSE	26.91 ± 2.4	25.91 ± 3.5	0.08 ^c
No. with cognitive impairment	2 (15.4%)	24 (25.53%)	0.31 ^c
No. with autonomic dysfunction	8 (61.5%)	66 (70.2%)	0.42 ^a
No. with sensory disorders	4 (30.7%)	53 (56.38%)	0.087 ^a
No. with sleep disorders	5 (38.4%)	50 (53.2%)	0.25 ^a
No. with depression	5 (38.4%)	30 (31.9%)	0.56 ^a

No., number; PD, Parkinson's disease; PIGD, postural instability gait disorder; TD, tremor dominant.

^aAnalyses were adjusted for gender, age, disease duration and levodopa doses.

^bMotor phenotypes were dichotomized into categories of PIGD vs non-PIGD.

^cAnalyses were adjusted for gender, age, disease duration, levodopa doses and education.

Table 2. Demographics and disease characteristics of homozygous (HMZ) G2019S mutation carriers and heterozygous (HTZ) carriers

Table 3. Demographics and disease characteristics of male and female G2019S carriers

	Male G2019S carriers	Female G2019S carriers	<i>P</i> -value and adjust <i>P</i> -value
Demographic factors and disease characteristic			
No. of cases	65	42	
No. with family history of PD	37 (56.9%)	20 (47.6%)	0.34
No. with consanguineous family	29 (44.6%)	20 (47.6%)	0.83
Education level (y)	7.34 ± 5.15	4.75 ± 4.75	0.02
Age at examination (y)	61.23 ± 13.38	60.7 ± 12.5	0.65
Age at onset (y)	54.66 ± 11.87	52.43 ± 11.1	0.33
PD duration (y)	6.88 ± 5.54	7.6 ± 6.21	0.5
Levodopa dose (mg)	658.5 ± 423	605 ± 358	0.5
Response to treatment	83%	78.3%	0.53
Motor features			
UPDRS	28.28 ± 15.92	34.22 ± 17.75	0.1 ^a
Hoehn and Yahr	2.4 ± 1.25	2.67 ± 1.01	0.2 ^a
No. with PIGD phenotype	33	16	0.27 ^b
No. with TD phenotype	25	14	
No. with indeterminate phenotype	7	12	
Non-motor features			
MMSE	27 ± 2.46	24.61 ± 4.13	0.012^c
No. with cognitive impairment	11 (17%)	15 (35.7%)	0.012^c
No. with autonomic dysfunction	44 (67.7%)	30 (71.4%)	0.59 ^a
No. with sensory disorders	35 (53.8%)	22 (52.4%)	0.86 ^a
No. with sleep disorders	31 (47.7%)	24 (57.1%)	0.27 ^a
No. with depression	14 (21.5%)	21 (50%)	0.046^a

No., number; PD, Parkinson's disease; PIGD, postural instability gait disorder; TD, tremor dominant.

^aAnalyses were adjusted for age, disease duration and levodopa doses.

^bMotor phenotypes were dichotomized into categories of PIGD vs non-PIGD.

^cAnalyses were adjusted for age, disease duration, levodopa doses and education.

P-values and adjusted *p*-values below the significance threshold of 0.05 are highlighted in bold.

4 | DISCUSSION

In the present study, we confirmed that the *LRRK2*-G2019S mutation is the major genetic cause of PD in Tunisia with a frequency that reached 42.8%. This mutation was frequent in both early and late onset of PD groups. The mean AAO was 53.8 years, but a high variability was observed ranging from 23 to 77 years, as it was previously reported.² The mean AAO for G2019S carriers was 4 years younger than iPD. Although there are conflicting reports on the effect of the G2019S mutations on the age of disease onset, our results were in accordance with studies conducted in large *LRRK2* series.¹⁴⁻¹⁷ In contrast, other studies involving a smaller number of patients described a similar AAO between *LRRK2* carriers and non-carriers.¹⁸⁻²² In a Tunisian cohort reported by Ishihara et al²³, *LRRK2*

carriers had an older AAO than non-carriers; but in the latter group, authors did not screen for the other PD associated genes that may influence the AAO.

Concerning motor symptoms, our results suggest a more benign phenotype in G2019S-PD than in iPD. G2019S mutation carriers had significantly lower UPDRS-III scores than non-carriers. Comparable results were obtained in a large cohort of 516 G2019S carriers and 790 iPD patients reported by Marras et al²⁴ On the other hand, in contrast to several prior reports,^{16,19,20,24-27} there was no significant difference in the distribution of the different motor phenotypes between G2019S carriers and non-carriers. Interestingly, our findings are in agreement with numerous other reported series that were mainly conducted in Tunisian population,^{18,21,23,28} while in other populations (mainly Ashkenazi Jewish), PIGD motor phenotype was

more prevalent in G2019S--PD than in iPD. This may be related to an interference of particular genetic or environmental factors in our population.

The G2019S--PD patients showed better performance on the MMSE test compared with iPD. Our findings were in line with several previous studies. In fact, many reports affirmed that *LRRK2*--PD patients have mild cognitive changes even after many years of disease progression.^{24,26,29,30} Given the low educational level in the majority of cases of both groups, it would be difficult to ascertain that sampling effects have not influenced the MMSE score in our study.

While idiopathic PD is more common in men, gender distribution in *LRRK2*--PD is variable from one study to another.² We found no significant difference in sex distribution between iPD and G2019S--PD although the male predominance was more marked in the G2019S group with a male--to--female ratio of 1.6. Our results are in accordance with previous Tunisian reported series.^{21,28,31,32} In contrast, other studies reported women predominance in their G2019S--PD cohorts.^{20,26,33,34} Here, we also noted that these studies reporting female predominance in G2019S carriers were conducted on Ashkenazi Jewish patients suggesting that this difference is based on ethnic origin. In fact, in a meta--analysis reported by Gan--Or et al.³⁵, the two genders were equally affected concluding that *LRRK2*--PD lacks a sex effect.

In our cohort, men and women G2019S carriers were similar in the age, AAO, disease duration and levodopa daily doses. However, men were found to have a higher level of education, a better MMSE score and a lower risk to develop depression than women. This was in concordance with several previous studies.³⁶

Further, we found that *LRRK2* gene dosage does not influence the phenotype. The severity of the disease did not differ between homozygote and heterozygote carriers of the G2019S mutation. The same results were noted in previous studies reporting several cases with a homozygous G2019S mutation.^{21,23,37}

In conclusion, G2019S carriers are more likely to onset PD at a younger age than non--carriers. In general, G2019S carriers had similar PD symptoms to non--carriers but with a more benign phenotype and less cognitive impairment. G2019S male carriers had better cognition and less tendency towards depression. These clinical features of G2019S--PD may vary according to the ethnicity of the patient. In addition, we found that *LRRK2* gene dosage does not influence the severity of PD.

The main strength of our study is the large sample size with a homogenous ethnic origin in addition to the use of uniform clinical evaluation methods across the two sites. Yet, there are a few limitations that need to be considered. This study was conducted on patients from the Tunisian population known for its high frequency of G2019S mutation, allowing us to investigate the clinical characterization with a higher statistical power. Nevertheless, these results may be limited to the Tunisian population as it is a population with a very high consanguinity rate and a low educational level among elderly patients. An additional limitation is that autonomic, sensory and sleep disorders were evaluated based on the patients' responses

to a questionnaire. More information could be obtained with objective tests. Finally, the cross--sectional design did not allow for comparisons of the disease progression between G2019S carriers and non--carriers, and a longitudinal study would provide stronger results.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank all patients and their families. The authors would like to acknowledge the valuable contribution of Neurology department members and staff. We also thank Ahmed Rebai for his pertinent discussions and for his technical assistance with statistical analyses, and Chokri Khalaf for proofreading the study.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

ORCID

Sawssan Ben Romdhan  <http://orcid.org/0000-0003-2012-4193>

REFERENCES

- Poewe W, Seppi K, Tanner CM, et al. Parkinson disease. *Nat Rev DisPrimers*. 2017;23:17013.
- Kestenbaum M, Alcalay RN. Clinical features of *LRRK2* carriers with Parkinson's disease. In: Rideout H, ed. *Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2)*, *Advances in Neurobiology*, vol. 14. Cham, Switzerland:Springer; 2017:31-48.
- Benamer HT, de Silva R. *LRRK2* G2019S in the North African population: a review. *Eur Neurol*. 2010;63(6):321-325.
- Inzelberg R, Hassin-Baer S, Jankovic J. Genetic movement disorders in patients of Jewish ancestry. *JAMA Neurol*. 2014;71(12):1567-1572.
- Postuma RB, Berg D, Stern M, et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2015;30(12):1591-1601.
- Tomlinson CL, Stowe R, Patel S, et al. Systematic review of levodopa dose equivalency reporting in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2010;25(15):2649-2653.
- Fahn S, Elton RL. The unified Parkinson's disease rating scale. In: Fahn S, Marsden CD, Calne DB, Goldstein M, eds. *Recent Developments in Parkinson's Disease*, 2nd edn. Florham Park, NJ:Macmillan Healthcare Information; 1987:153-163.
- Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset progression and mortality. *Neurology*. 1967;17(5):427-442.
- Folstein M, Folstein S, McHugh P. "Mini--Mental State" A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*. 1975;12(3):189-198.
- Uhlmann RF, Larson EB. Effect of education on the mini--mental state examination as a screening test for dementia. *J Am Geriatr Soc*. 1991;39(9):876-880.
- Beck AT, Steer RA, Ball R, et al. Comparison of Beck depression inventories--IA and --II in psychiatric outpatients. *J Pers Assess*. 1996;67(3):588-597.
- Wang YP, Gorenstein C. Assessment of depression in medical patients: a systematic review of the utility of the Beck depression inventory--II. *Clinics (Sao Paulo)*. 2013;68(9):1274-1287.

13. Jankovic J, McDermott M, Carter J, et al. Variable expression of Parkinson's disease: a base-line analysis of the DATATOP cohort. The Parkinson study group. *Neurology*. 1990;40(10):1529-1534.
14. San Luciano M, Wang C, Ortega RA, et al. Sex differences in LRRK2 G2019S and idiopathic Parkinson's disease. *Ann Clin Transl Neurol*. 2017;4(11):801-810.
15. Marder K, Wang Y, Alcalay RN, et al. Age-specific penetrance of LRRK2 G2019S in the Michael J. Fox Ashkenazi Jewish LRRK2 con-sortium. *Neurology*. 2015;85(1):89-95.
16. Yahalom G, Orlev Y, Cohen OS, et al. Motor progression of Parkinson's disease with the leucine-rich repeat kinase 2 G2019S mutation. *Mov Disord*. 2014;29(8):1057-1060.
17. Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS, et al. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol*. 2008;7(7):583-590.
18. Nishioka K, Kefi M, Jasinska-Myga B, et al. A comparative study of LRRK2, PINK1 and genetically undefined familial Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010;81(4):391-395.
19. Marras C, Schule B, Munhoz RP, et al. Phenotype in parkinsonian and nonparkinsonian LRRK2 G2019S mutation carriers. *Neurology*. 2011;77(4):325-333.
20. Alcalay RN, Mirelman A, Saunders-Pullman R, et al. Parkinson disease phenotype in Ashkenazi Jews with and without LRRK2 G2019S mutations. *Mov Disord*. 2013;28(14):1966-1971.
21. Trinh J, Amouri R, Dudac JE, et al. A comparative study of Parkinson's disease and leucine-rich repeat kinase 2 p. G2019S parkinsonism. *Neurobiol Aging*. 2014;35(5):1125-1131.
22. Bouhouche A, Tibar H, Ben El Haj R, et al. LRRK2 G2019S mutation: prevalence and clinical features in moroccans with Parkinson's disease. *Parkinsons Dis*. 2017;2017:2412486.
23. Ishihara L, Gibson RA, Warren L, et al. Screening for Lrrk2 G2019S and clinical comparison of Tunisian and North American Caucasian Parkinson's disease families. *Mov Disord*. 2007;22(1):55-61.
24. Marras C, Alcalay RN, Caspell-Garcia C, et al. Motor and non-motor heterogeneity of LRRK2-related and idiopathic Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2016;31(8):1192-1202.
25. Mirelman A, Heman T, Yasinovsky K, et al. Fall risk and gait in Parkinson's disease: the role of the LRRK2 G2019S mutation. *MovDisord*. 2013;28(12):1683-1690.
26. Alcalay RN, Mejia Santana H, Mirelman A, et al. Neuropsychological performance in LRRK2 G2019S carriers with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2015;21:106-110.
27. Saunders-Pullman R, Mirelman A, Alcalay RN, et al. Progression in the LRRK2-associated Parkinson disease population. *JAMA Neurol*. 2018;75(3):312-319.
28. Nabli F, Ben Sassi S, Amouri R, et al. Motor phenotype of LRRK2-associated Parkinson's disease: a Tunisian longitudinal study. *MovDisord*. 2015;30(2):253-258.
29. Somme JH, Molano Salazar A, Gonzalez A, et al. Cognitive and behavioral symptoms in Parkinson's disease patients with the G2019S and R1441G mutations of the LRRK2 gene. *Parkinsonism RelatDisord*. 2015;21(5):494-499.
30. Srivatsal S, Cholerton B, Leverenz JB, et al. Cognitive profile of LRRK2-related Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2015;30(5):728-733.
31. Ben Sassi S, Nabli F, Hentati E, et al. Cognitive dysfunction in Tunisian LRRK2 associated Parkinson's disease. *Parkinsonism RelatDisord*. 2012;18(3):243-246.
32. Landoulsi Z, Ben Romdhan S, Ben Djebara M, et al. Using KASP technique to screen LRRK2 G2019S mutation in a large Tunisian cohort. *BMC Med Genet*. 2017;18(1):70.
33. Orr-Urtreger A, Shifrin C, Rozovski U, et al. The LRRK2 G2019S mutation in Ashkenazi Jews with Parkinson disease: is there a gender effect? *Neurology*. 2007;69(16):1595-1602.
34. Cilia R, Siri C, Rusconi D, et al. LRRK2 mutations in Parkinson's disease: confirmation of a gender effect in the Italian population. *Parkinsonism Relat Disord*. 2014;20(8):911-914.
35. Gan-Or Z, Leblond CS, Mallett V, et al. LRRK2 mutations in Parkinson disease; a sex effect or lack thereof? A meta-analysis. *Parkinsonism Relat Disord*. 2015;21(7):778-782.
36. Georgiev D, Hamberg K, Hariz M, et al. Gender differences in Parkinson's disease: a clinical perspective. *Acta Neurol Scand*. 2017;136(6):570-584.
37. Ishihara L, Warren L, Gibson R, et al. Clinical features of Parkinson disease patients with homozygous leucine-rich repeat kinase 2 G2019S mutations. *Arch Neurol*. 2006;63(9):1250-1254.

How to cite this article: Ben Romdhan S, Farhat N, Nasri A, et al. LRRK2 G2019S Parkinson's disease with more benign phenotype than idiopathic. *Acta Neurol Scand*. 2018;00:1-7. <https://doi.org/10.1111/ane.12996>

IV.1. Comparaison des caractéristiques cliniques entre les porteurs et les non-porteurs de la mutation p.G2019S

Vingt-quatre patients porteurs de mutation sur les gènes *LRRK2* (autre que la mutation p.G2019S), *PARK2*, *PINK1*, *SYNJ1* et *GBA* ont été exclus de cette comparaison. Les 119 patients restants ont été classés comme des patients parkinsoniens idiopathiques (iPD).

Les données démographiques, les scores et signes moteurs, et les signes non-moteurs ont été comparés entre les 107 patients porteurs de la mutation p.G2019S et les 119 patients idiopathiques (Tableau 15).

Chez les patients porteurs de la mutation p.G2019S, l'âge de début moyen était de 53,8 ans. Comme il a été rapporté précédemment, une variabilité importante de l'âge de début de la maladie a été observée allant de 23 à 77 ans[341]. L'âge de début moyen des porteurs de la mutation p.G2019S était de 4 ans plus précoce que celui des non-porteurs ($p=0,017$) (Figure 35).

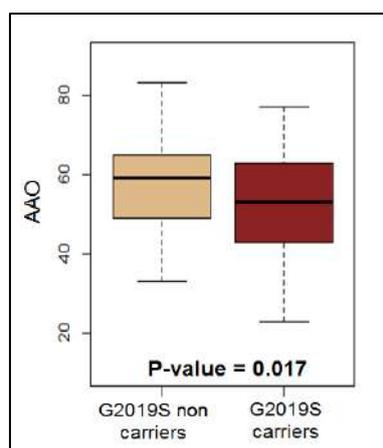


Figure 35. Comparaison de l'âge de début de la MP entre les patients porteurs et non porteurs de la mutation p.G2019S; AAO : Age At Onset.

Bien qu'il y ait des résultats contradictoires sur l'effet de la mutation p.G2019S sur l'âge d'apparition de la maladie, nos résultats étaient en accord avec les études menées dans les plus grandes séries des patients parkinsoniens porteurs de la mutation p.G2019S[342–345]. En revanche, d'autres études impliquant moins de patients, ont décrit un âge de début moyen similaire entre les porteurs et les non-porteurs de la mutation p.G2019S[174, 346–349]. Dans une cohorte tunisienne rapportée par Ishihara et al., les porteurs de la mutation p.G2019S avaient un âge de début moyen plus tardif que les non-porteurs; mais dans ce dernier groupe, les auteurs n'ont pas criblé les autres gènes associés à la MP ce qui pourraient influencer l'âge de début moyen [350].

Tableau 15. Caractéristiques démographiques et cliniques des porteurs et non porteurs de la mutation LRRK2-p.G2019S.

	Porteurs de la mutation p.G2019S	Non Porteurs de la mutation p.G2019S	p-valeur et p-valeur ajustée
Facteurs démographiques et caractéristiques de la maladie			
No. de cas	107	119	
No. d'homme	66 (61.7%)	68 (57.2%)	0.58
No. avec histoire familiale de la MP	57 (53.27%)	43 (36.1%)	0.009
No. de famille consanguine	49 (45.8%)	58 (48.7%)	0.67
Niveau d'éducation (années)	6.28 ±5.13	4.82 ±4.47	0.044
Age à l'examen (années)	60.78 ±11.13	64.85 ±13	0.012
Age au début de la MP (années)	53.8 ±11.57	57.53 ±11.75	0.017
Durée de MP (années)	7.2 ±5.8	7.38 ±6.71	0.8
Dose de Lévodopa (mg)	641.8 ±389.5	623.6 ±333.6	0.56
Réponse au traitement	81.2%	74%	0.26
Caractéristiques motrices			
Score UPDRS	30.77 ±16.87	37.69 ±19.6	0.012^a
Score Hoehn et Yahr	2.5 ±1.1	2.85 ±1.27	0.1 ^a
No. avec phénotype PIGD	49	48	0.4 ^c
No. avec phénotype TD	39	38	
No. avec phénotype indéterminé	19	33	
Caractéristiques non motrices			
Score MMSE	26 ±3.46	24.3 ±4.7	0.019^b
No. avec déficience cognitive	26 (24.5%)	50 (42%)	0.022^b
No. avec troubles neurovégétatifs	74 (69.1%)	85 (71.4%)	0.91 ^a
No. avec troubles sensoriels	57 (53.3%)	57 (48%)	0.38 ^a
No. avec des troubles de sommeil	55 (51.4%)	58 (48.7%)	0.68 ^a
No. avec dépression	35 (32.7%)	48 (40.3%)	0.36 ^a

^ala valeur du p est ajustée aux gender, âge, durée d'évolution et dose de lévodopa.

^bla valeur du p est ajustée aux gender, âge, durée d'évolution et dose de lévodopa et le niveau d'éducation.

^cOn a divisé les phénotypes en deux groupes : phénotype PIGD et phénotype non PIGD (TD+indéterminé).

No.: nombre; PIGD: postural instability gait disorder; TD: tremor dominant.

Les porteurs de la mutation p.G2019S étaient plus susceptibles de déclarer des antécédents familiaux de la MP ($p= 0,009$), avaient un âge à l'examen plus jeune ($p= 0,012$) et plus d'années d'éducation que les non-porteurs ($p= 0,044$). Dans les modèles de régression logistique ajustés pour l'âge, le sexe, la durée de la MP, les doses de lévodopa et le niveau d'éducation; les porteurs de la mutation p.G2019S, avaient un meilleur score MMSE significativement plus élevé (p -ajusté= $0,019$) et un meilleur score UPDRS-III (plus bas) au cours de la phase ON (p -ajusté= $0,012$) par rapport aux non-porteurs (Tableau 15). Lorsque les phénotypes moteurs dans chaque groupe étaient subdivisés en deux catégories: les phénotypes PIGD et non-PIGD (phénotypes tremblements dominants et indéterminés); il n'y avait pas de différence significative dans la fréquence des phénotypes moteurs entre les porteurs et les non porteurs de la mutation p.G2019S (Tableau 15).

Nos résultats suggèrent un phénotype plus bénin de la MP associée à la mutation p.G2019S que dans la forme idiopathique (iPD). Les porteurs de la mutation p.G2019S présentaient des scores UPDRS-III significativement plus faibles que les non-porteurs. Des résultats comparables ont été obtenus dans une grande cohorte de 516 porteurs de la mutation et de 790 patients de type iPD rapportés par Marras et al. [351]. Cependant, contrairement à plusieurs rapports antérieurs [344, 346, 347, 351–354], il n'y avait pas de différence significative dans la distribution des différents phénotypes moteurs entre les porteurs de la mutation p.G2019S et les non porteurs. Fait intéressant, nos résultats sont en accord avec de nombreuses autres séries rapportées qui ont été principalement menées dans la population Tunisienne [173, 174, 348, 350], tandis que dans d'autres populations (principalement Juive Ashkénaze), le phénotype moteur PIGD était plus répandue dans le groupe des porteurs que dans le groupe iPD. Cela peut être lié à une interférence de facteurs génétiques ou environnementaux particuliers dans notre population.

Les patients porteurs de la mutation p.G2019S ont montré une meilleure performance pendant le test MMSE par rapport au groupe iPD. Nos résultats étaient en accord avec plusieurs études antérieures. En fait, de nombreux rapports affirment que les patients porteurs des mutations sur le gène *LRRK2* ont des changements cognitifs légers, même après de nombreuses années de progression de la maladie [351, 353, 355, 356]. Néanmoins, vu le faible niveau d'éducation dans la majorité des cas dans les deux groupes (porteurs et non porteurs de la mutation p.G2019S), il serait difficile d'affirmer que cette différence du score MMSE n'était pas influencée par des effets de l'échantillonnage, surtout que le niveau d'éducation était plus important dans le groupe des porteurs de la mutation p.G2019S.

IV.2. Comparaison des caractéristiques cliniques entre les porteurs mâles et femelles de la mutation p.G2019S

Dans notre étude, nous avons investigué l'influence du genre sur les caractéristiques cliniques des porteurs de la mutation p.G2019S (Tableau 16).

Tableau 16. Caractéristiques démographiques et cliniques des porteurs mâles et femelles de la mutation p.G2019S.

	Porteurs mâles	Porteurs femelles	p-valeur et p-valeur ajustée
Facteurs démographiques et caractéristiques de la maladie			
No. de cas	65	42	
No. avec histoire familiale de la MP	37 (56.9%)	20 (47.6%)	0.34
No. de famille consanguine	29 (44.6%)	20 (47.6%)	0.83
Niveau d'éducation (années)	7.34±5.15	4.75±4.75	0.02
Age à l'examen (années)	61.23 ±13.38	60.7 ±12.5	0.65
Age au début de la MP (années)	54.66 ±11.87	52.43±11.1	0.33
Durée de MP (années)	6.88 ±5.54	7.6±6.21	0.5
Dose de Lévodopa (mg)	658.5 ±423	605±358	0.5
Réponse au traitement	83%	78.3%	0.53
Caractéristiques motrices			
Score UPDRS	28.28 ±15.92	34.22±17.75	0.1 ^a
Score Hoehn et Yahr	2.4±1.25	2.67±1.01	0.2 ^a
No. avec phénotype PIGD	33	16	0.27 ^c
No. avec phénotype TD	25	14	
No. avec phénotype indéterminé	7	12	
Caractéristiques non motrices			
Score MMSE	27 ±2.46	24.61±4.13	0.012^b
No. avec déficience cognitive	11 (17%)	15 (35.7%)	0.012^b
No. avec troubles neurovégétatifs	44 (67.7%)	30 (71.4%)	0.59 ^a
No. avec troubles sensoriels	35 (53.8%)	22 (52.4%)	0.86 ^a
No. avec des troubles de sommeil	31 (47.7%)	24 (57.1%)	0.27 ^a
No. avec dépression	14 (21.5%)	21 (50%)	0.046^a

a la valeur du p est ajustée à l'âge, durée d'évolution et dose de lévodopa.

b la valeur du p est ajustée à l'âge, durée d'évolution et dose de lévodopa et le niveau d'éducation.

c On a divisé les phénotypes en deux groupes : phénotype PIGD et phénotype non PIGD (TD+ indéterminé).

No.: nombre; PIGD: postural instability gait disorder; TD: tremor dominant.

Bien que la MP idiopathique est plus fréquente chez les hommes, la distribution du genre dans la MP associée à la mutation p.G2019S est variable d'une étude à l'autre [341]. Nous n'avons pas trouvé de différence significative dans la répartition du sexe entre le groupe iPD et le groupe des porteurs de la mutation p.G2019S, bien que la prédominance masculine a été plus marquée dans le groupe des porteurs avec un ratio hommes/femmes de 1,6. Nos résultats sont conformes aux résultats antérieurs rapportés dans la population Tunisienne [173, 317, 348, 357]. En revanche, d'autres études ont signalé une prédominance des femmes dans leurs cohortes [170, 347, 353, 358]. Ici, nous avons également noté que ces études rapportant la prédominance féminine dans les porteurs de la mutation p.G2019S ont été menées sur des patients Juifs Ashkénazes; suggérant que cette différence est basée sur l'origine ethnique de la population étudiée. En fait, dans une méta-analyse les deux sexes ont été affectés avec une même prévalence [359]. Cette étude a examiné tous les articles avec des données déclarées pour le sexe et le statut de mutation chez les patients et les témoins (17) et 33 études supplémentaires qui incluaient des données sur le rapport hommes / femmes uniquement chez les patients ; avec un total de 6527 patients parkinsoniens (3986 hommes et 2541 femmes).

Les caractéristiques démographiques des hommes et des femmes atteints de mutation p.G2019S étaient similaires, mais les hommes avaient un niveau d'éducation plus élevé. La comparaison statistique entre ces deux groupes en utilisant des modèles de régression logistique ajustés pour l'âge, la durée de la MP, les doses de lévodopa et le niveau d'éducation a montré que les porteurs mâles avaient une meilleure cognition (p-ajustée = 0,012). Nous avons également noté une fréquence plus élevée de la dépression chez les femmes porteuses de la mutation p.G2019S (p-ajustée = 0.046). Nos résultats sont en accord avec plusieurs études antérieures [360].

IV.3. Comparaison des caractéristiques cliniques entre les porteurs de la mutation p.G2019S à l'état homozygote et hétérozygote

Dans cette partie nous avons comparé le tableau clinique des patients porteurs de la mutation p.G2019S à l'état homozygote avec celui des porteurs de la mutation à l'état hétérozygote. Nous avons trouvé que la sévérité de la maladie ne différait pas entre les porteurs homozygotes et hétérozygotes de la mutation p.G2019S (Tableau 17); ce qui suggère que le dosage du gène *LRRK2* n'influence pas le phénotype. Les mêmes résultats ont été notés dans d'autres études précédentes rapportant plusieurs cas porteurs de la mutation p.G2019S à l'état homozygote [348, 350, 361].

Tableau 17. Caractéristiques démographiques et cliniques des porteurs de la mutation p.G2019S à l'état homozygote (HMZ) et hétérozygotes (HTZ).

	Porteurs à l'état HMZ	Porteurs à l'état carriers	p-valeur et p- valeur ajustée
Facteurs démographiques et caractéristiques de la maladie			
No. de cas	13	94	
No. d'homme	5 (38.4%)	60 (63.8%)	0.08
No. avec histoire familiale de la MP	7 (53.8%)	50 (53.2%)	0.83
No. de famille consanguine	7 (53.8%)	42 (44.68%)	0.56
Niveau d'éducation (années)	5.8 ±3.34	6.3 ±5.3	0.77
Age à l'examen (années)	60.77±12.3	60.77±13.15	0.99
Age au début de la MP (années)	53.4 ±10.69	53.83 ±11.57	0.95
Durée de MP (années)	7.3 ±5.23	7.44 ±5.9	0.97
Dose de Lévodopa (mg)	669.2±516.34	637.8 ±374.5	0.7
Réponse au traitement	83.3%	80.9%	0.59
Caractéristiques motrices			
Score UPDRS	38.1 ±24.3	29.8 ±15.59	0.22 ^a
Score Hoehn et Yahr	2.55 ±1	2.5 ±1.2	0.67 ^a
No. avec phénotype PIGD	5	44	0.78 ^c
No. avec phénotype TD	4	35	
No. avec phénotype indéterminé	4	15	
Caractéristiques non motrices			
Score MMSE	26.91 ±2.4	25.91±3.5	0.08 ^b
No. avec déficience cognitive	2 (15.4%)	24 (25.53%)	0.31 ^b
No. avec troubles neurovégétatifs	8 (61.5%)	66 (70.2%)	0.42 ^a
No. avec troubles sensoriels	4 (30.7%)	53 (56.38%)	0.087 ^a
No. avec des troubles de sommeil	5 (38.4%)	50 (53.2%)	0.25 ^a
No. avec dépression	5 (38.4%)	30 (31.9%)	0.56 ^a

a la valeur du p est ajustée aux gender, âge, durée d'évolution et dose de lévodopa.

b la valeur du p est ajustée aux gender, âge, durée d'évolution et dose de lévodopa et le niveau d'éducation.

c On a divisé les phénotypes en deux groupes : phénotype PIGD et phénotype non PIGD (TD+indéterminé).

No.: nombre; PIGD: postural instability gait disorder; TD: tremor dominant.

V. Identification des facteurs qui peuvent influencer l'âge de début de la MP chez les patients porteurs de la mutation p.G2019S

La pénétrance de la mutation p.G2019S est incomplète et très variable d'un patient à un autre. Plusieurs études ont suggéré la présence des facteurs génétiques qui peuvent influencer l'âge de début de la maladie chez les patients Parkinsoniens porteurs de la mutation p.G2019S tel que la variation c.161+22137C>G sur le gène *DNM3* identifiée par Trinh et al. [309].

L'objectif de notre travail était d'étudier les facteurs qui peuvent influencer l'âge de début de la maladie de Parkinson chez les patients porteurs de la mutation *LRRK2-p.G2019S*. Pour les 107 patients, nous avons vérifié l'influence de la variation rs2421947 sur le gène *DNM3* sur l'âge de début de la MP. Nous avons aussi recherché d'autres variations sur le gène *LRRK2* qui puissent influencer l'âge de début de la MP chez les porteurs de la mutation p.G2019S. La comparaison statistique de l'âge de début entre les mâles et les femelles porteurs de cette mutation et entre les porteurs de la mutation à l'état homozygote et à l'état hétérozygote a montré que la différence d'âge de début n'était pas significative, ce qui suggère que le sexe et le dosage de la mutation ne sont pas des facteurs influençant l'âge de début chez nos patients. Le criblage de la variation c.161+22137C>G sur le gène *DNM3* nous a permis d'exclure l'effet potentiel de cette variation sur l'âge de début de la MP chez les porteurs de la mutation p.G2019S. Ainsi, nous avons séquencé la totalité du gène *LRRK2* chez 3 cas porteurs de la mutation p.G2019S avec un âge de début inférieur à 50 ans et de différentes origines. Nous avons identifié 8 variations sur le gène *LRRK2* en commun entre ces 3 patients, mais seulement deux variations (p.L953L et p.S1647T) étaient rares et en trans. Ces deux variations ont été criblées chez nos 107 patients porteurs de la mutation p.G2019S et nous avons comparé l'âge de début moyen associé à chaque génotype. Une différence significative d'âge de début a été observée pour la variation p.L953L. Les porteurs de cette variation avaient un âge de début 7 ans plus précoces que celui des non porteurs. Pour étudier l'effet de la variation p.L953L sur l'épissage et le niveau d'expression du gène *LRRK2*, nous avons effectué une extraction d'ARN pour 3 patients porteurs de cette variation et le niveau d'expression a été analysé par PCR semi quantitative. Le gène *LRRK2* était deux fois plus exprimé chez ces 3 patients par rapport au témoin, ce qui confirme les prédictions in silico que la variation p.L953L crée deux nouveaux sites "enhancer".

V.1. Effet de la variation *DNM3 rs2421947* sur l'âge de début

Récemment, Trinh et ses collègues ont présenté la variation rs2421947 (c.161 + 22137C> G) sur le gène *DNM3* comme un modificateur de l'âge de début de maladie de Parkinson chez les porteurs de la mutation *LRRK2-p.G2019S*[309]. Les auteurs ont utilisé une approche de «Genome wide linkage analysis » sur 41 familles Tunisiennes avec la mutation p.G2019S. En plus du locus 12q12 qui englobe le gène *LRRK2*, les analyses de liaison ont montré que le locus 1q23.3 à 1q24.3 possède le score LOD le plus élevé. L'analyse des marqueurs d'association dans cette région chez 232 cas non apparentés porteurs de la mutation p.G2019S a révélé 3 SNPs (rs742510, rs2421947 et rs2206543) sur le gène dynamine-3 (*DNM3*). Dans un modèle de régression de Cox, la seule association significative était observée pour la variation c.161+22137C>G (rs2421947) sur le gène *DNM3*. Vu que cette variation est intronique, les auteurs ont étudié son effet sur l'expression du gène. Le transcrit Dyn3b était fortement exprimé chez les porteurs homozygotes GG de la variation c.161+22137C>G. Ces résultats ont été répliqués sur des patients de différente origine : de Norway et France (n=129), de l'Algérie (n=46) et d'Amérique (n=88). L'âge médian d'apparition chez les porteurs homozygotes GG de la variation était de 12,5 ans plus précoce que celui chez les porteurs du génotype homozygotes de type sauvage CC ([HR] = 1,61 (IC à 95% 1,15-2,27, p-valeur = 0,02 pour les génotypes CC vs GG).

La dynamine, est un membre d'une famille de protéines liant le guanosine triphosphate (GTP). Les dynamines participent à un certain nombre d'événements de trafic membranaire tels que l'endocytose à médiation par la clathrine [362]. Dans une étude fonctionnelle in vitro, Stafa et ses collègues ont montré que *LRRK2* interagit avec la dynamine 1-3 qui induit une scission de la membrane dans l'endocytose induite par la clathrine [363]. Dans les neurones en culture, *LRRK2* interagit avec la dynamine-1 et la mitofusine-1 qui interviennent dans la fusion mitochondriale. En fait, *LRRK2* réduit le niveau de dynamine-1 qui atténue le raccourcissement des neurites. Cette interaction implique *LRRK2* dans la régulation de la dynamique de la membrane qui est importante pour l'endocytose et la morphologie mitochondriale [363].

Dans notre étude, nous avons étudié l'influence de la variation *DNM3*c.161+22137C>G sur l'âge de début de la MP chez nos 107 patients porteurs de la mutation *LRRK2-p.G2019S*. Le criblage de la variation *DNM3*c.161+22137C>G a montré que 27 patients ont été porteurs du génotype sauvage (CC) avec un âge de début moyen (AAO) de 53 ans, 42 patients avaient la variation à l'état hétérozygote (CG) avec un AAO

moyen de 54.8 ans et 38 patients avaient la variation à l'état homozygote (GG) avec un AAO moyen de 56.6 ans (Figure 36). Le test ANOVA a montré que la différence de l'AAO moyen entre les 3 groupes qui représentent les différents génotypes de la variation *DNM3* c.161+22137C>G est non significatif (p-value = 0.48) (Figure 36). Cela suggère que cette variation ne contribue pas à l'apparition de la MP à un âge plus précoce chez les porteurs de la mutation p.G2019S. Nos résultats sont en accord avec les résultats publiés récemment qui étudient l'effet du gène *DNM3* sur l'âge de début de la MP chez les porteurs de la mutation p.G2019S dans la population Espagnole[364].

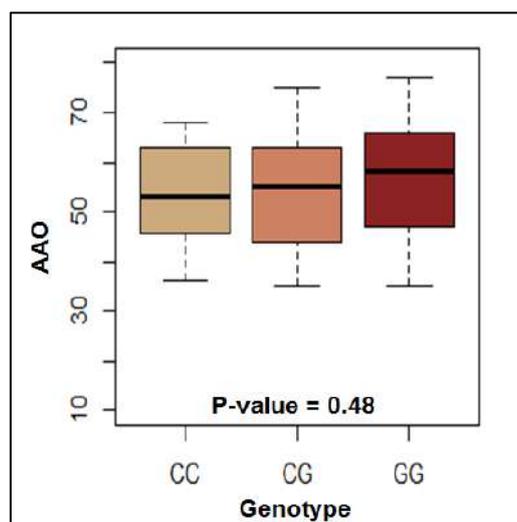


Figure 36. Comparaison de l'âge de début (AAO) de la MP en fonction du génotype de la variation c.161+22137C>G sur le gène *DNM3*.

V.2. Recherche d'autres variations sur le gène *LRRK2*

Afin d'identifier des variations impliquées dans l'apparition de la maladie de Parkinson à un âge plus précoce chez les patients porteurs de la mutation p.G2019S, nous avons procédé à séquencer la totalité du gène *LRRK2* par NGS chez trois patients d'origine Tunisienne, Algérienne et Française ayant respectivement un âge de début de 41, 31 et 48 ans. Nous avons pu identifier 8 variations en commun entre ces 3 patients dont deux variations non-sens : p.M2397T et p.S1647T et six variations silencieuses : p.L153L, p.L953L, p.G1624G, p.K1637K, p.G1819G et p.E2108E (Tableau 18).

Seulement les deux variations p.L953L et p.S1647T, étaient rares. La variation p.L953L est en position trans par rapport à la mutation p.G2019S alors que la variation p.S1647T touche le site catalytique kinase de la protéine *LRRK2*. Ces deux variations ont été criblées chez tous les 107 patients porteurs de la mutation p.G2019S pour étudier leur éventuel effet sur l'âge de début de la maladie.

Tableau 18. Les variations identifiées en commun entre les 3 patients sur le gène *LRRK2* et leurs fréquences dans les bases de données.

Variation nucléotidique	Variation protéique	SNP	Exon	Fréquence sur 1000Génome	Fréquence sur Exac
c.457T>C	p.L153L	rs10878245	Exon 5	0.4529	0.5263
c.2857T>C	p.L953L	rs7966550	Exon 22	0.0901	0.106
c.4872C>A	p.G1624G	rs1427263	Exon 34	0.3171	0.6781
c.4911A>G	p.K1637K	rs11176013	Exon 34	0.4143	0.5734
c.4939T>A	p.S1647T	rs11564148	Exon 34	0.2859	0.2983
c.5457T>C	p.G1819G	rs10878371	Exon 49	0.4147	0.5733
c.6324G>A	p.E2108E	rs10878405	Exon 43	0.2738	0.3001
c.7190T>C	p.M2397T	rs3761863	Exon 49	0.4483	0.624

V.2.1. Étude de la variation p. S1647T : c.4939T>A

La variation c.4939T>A sur le gène *LRRK2* touche le site catalytique kinase de la protéine LRRK2, ce qui suggère un effet délétère de cette variation. Cependant, l'alignement multiple a montré que le résidu sérine en position 1647 n'est pas conservé entre les différentes espèces et l'analyse in silico a prédit qu'elle est un simple polymorphisme non délétère.

L'âge de début moyen était de 56.8 ans, 54.3 et 62.5 ans chez les patients porteurs des génotypes TT, TA et AA respectivement. Cependant la p-value a été non significative ($p=0.062$) (Figure 37). Le résultat ainsi obtenu a montré que la substitution c.4939T>A n'est pas associée à un âge de début plus précoce.

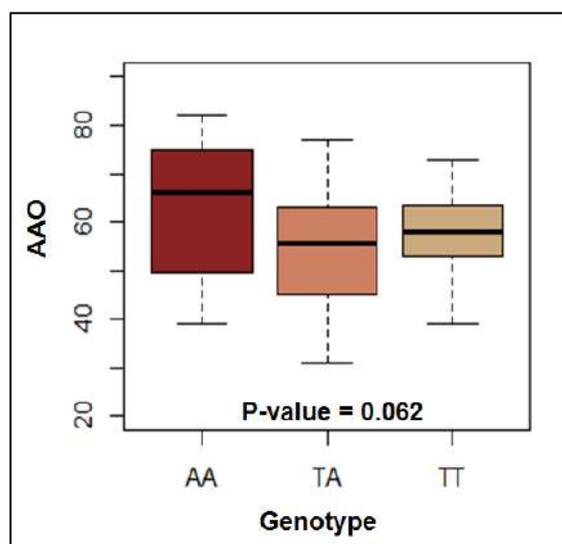


Figure 37. Comparaison d'âge de début (AAO) en fonction du génotype de la variation p.S1647T : c.4939T>A sur le gène *LRRK2*.

V.2.2. Étude de la variation p.L953L : c.2857T>C

La variation c.2857T>C est une variation silencieuse qui préserve le résidu leucine dans la position 953. Nous avons étudié l'effet de cette variation sur l'ARN en utilisant le logiciel Human splicing Finder (HSF). Ce dernier a montré que cette variation n'a pas d'effet sur l'épissage (taux de modification de -0.78% par rapport au normal). Mais nous avons noté l'apparition de deux nouveaux sites enhancer et la destruction de deux sites silencer (Figure 38).

A - HSF Matrices								
Sequence Position	cDNA Position	Splice site type	Motif	New splice site	Wild Type	Mutant	If cryptic site use, exon length variation	Variation (%)
147	47	Acceptor	TATTATCTTCAGAT	taatatottcagAT	89.27	88.57	-58	-0.78

B - BEs from Zhang et al.				
Sequence Position	cDNA Position	Enhancer motif reference sequence	Enhancer motif mutant sequence	Variation
144	44		AATAC	New Site
146	46	ATATTA	ATACTA	
147	47		TACTAT	New Site

C - BEs from Zhang et al.				
Sequence Position	cDNA Position	Silencer motif reference sequence	Silencer motif mutant sequence	Variation
147	47	TATTAT		Site broken
149	49	TTATCT		Site broken

Figure 38. Résultats de prédictions in silico de l'effet de la variation p.L953L.

Vu que les enhancers peuvent avoir un effet sur la stabilité de l'ARNm, la prédiction de la structure de l'ARN muté et normal, aussi bien que le calcul de l'énergie libre (dG) ont été réalisées par le programme Mfold (Figure 39). L'estimation des changements sur la stabilité est possible à travers le calcul du $\Delta dG = dG$ de l'ARN muté - dG de l'ARN WT. Une différence négative reflète une augmentation de la stabilité alors qu'une différence positive indique sa diminution. Cette analyse a montré que la variation c.2857T>C provoque une faible diminution de la stabilité de l'ARNm de 1.7 (dG WT= -11.7, dG muté= -9).

Ces résultats de prédictions in-silico suggèrent que la variation c.2857T>C a un effet sur le niveau d'expression du gène *LRRK2* et peut conduire à son augmentation.

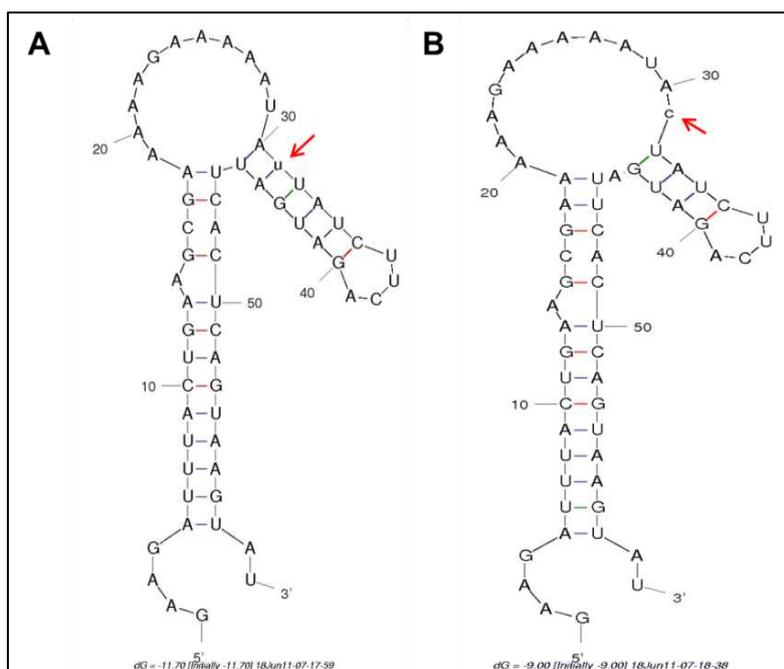


Figure 39. Structure de l'ARN sauvage (A) et muté (B) du gène *LRRK2* réalisée par Mfold.

Le criblage de la variation c.2857T>C/p.L953L a montré que ce changement nucléotidique existe à l'état hétérozygote chez 16 patients parmi les 107 étudiés (Figure 40).

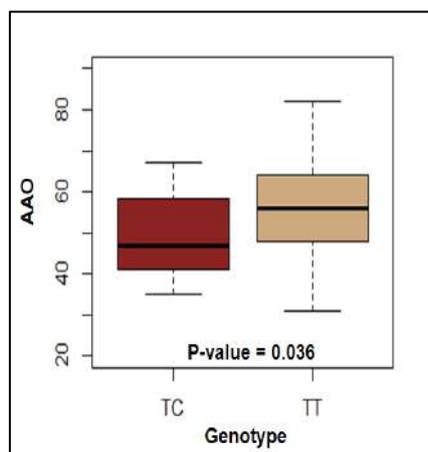


Figure 40. Comparaison d'âge de début (AAO) en fonction du génotype de la variation c.2857T>C.

L'étude de l'association entre cette variation et l'âge de début de la maladie a été réalisée par le test de student (t-test). D'après cette analyse nous avons remarqué que l'âge de début moyen de la maladie chez les patients porteurs de la variation p.L953L est significativement plus précoce que celui des patients non porteurs où il passe de 49.8 ans à 56 ans respectivement (p-value 0.036) (Figure 40). Par conséquent nous pouvons conclure que la variation p.L953L sur le gène *LRRK2* affecte l'âge de développement de la maladie de Parkinson chez les patients porteurs de la mutation p.G2019S et provoque l'apparition de la maladie à un âge plus précoce, voire de 6 ans avant les non porteurs.

V.2.3. Analyse de l'effet de la variation p.L953L sur l'expression du gène *LRRK2*

Pour étudier l'effet de la variation p.L953L sur l'épissage et le niveau d'expression du gène *LRRK2*, l'ARN a été extrait à partir des lymphocytes totaux des prélèvements sanguins de 3 patients parkinsoniens porteurs des deux mutations (p.G2019S et p.L953L) et un témoin sain. Pour ce témoin, les variations étudiées ont été déjà criblées précédemment et nous avons vérifié qu'il n'est pas porteur d'aucune d'elles. Un traitement Dnase a été réalisé pour l'élimination des traces de l'ADN contaminant et pour mieux confirmer sa pureté, une PCR sur l'ARN a été effectuée. Pour la RT-PCR, nous avons choisi des amorces qui couvrent les exons 21, 22 et 23 du gène *LRRK2*. Le produit de la RT-PCR a été séquencé pour s'assurer du fragment amplifié et pour vérifier si la variation a un effet sur l'épissage. Cela a confirmé les résultats fournis par HSF indiquant que la variation p.L953L n'a pas d'effet sur l'épissage (Figure 41).

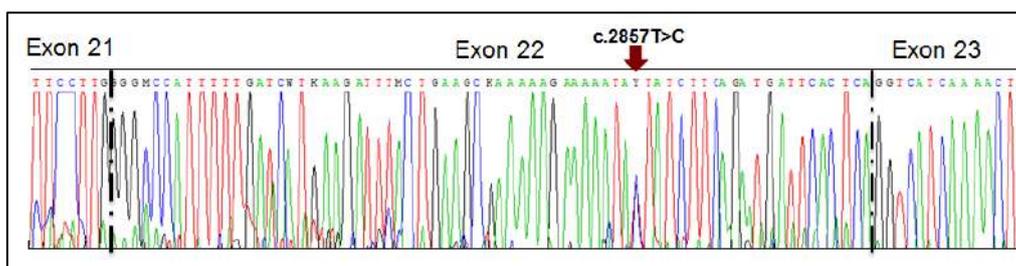


Figure 41. Résultats de séquençage du produit de la RT-PCR des exons 21, 22 et 23 chez un patient porteur de la variation c.2857T>C.

L'étude de l'expression du gène *LRRK2* a été réalisée par RT-PCR semi quantitative (Figure 42). Le gène constitutif codant pour la Beta-2-Microglobuline (*B2M*) a été utilisé comme contrôle interne de la RT-PCR. Ce gène est un gène de ménage qui est toujours exprimé sans mécanisme de régulation. Ainsi le niveau d'expression du gène *B2M* a été utilisé comme un contrôle positif de la concentration d'ARN dans la RT-PCR semi quantitative et pour comparer le niveau d'expression du gène *LRRK2* entre les patients et le témoin.

Les profils d'amplification analysés sur gel d'agarose ont été quantifiés en utilisant le logiciel Quantity 1D analysis software (Bio-Rad), l'intensité des bandes a été exprimée en unité arbitraire calculée par le logiciel (Figure 43).

L'analyse de l'intensité des bandes du cDNA amplifiés montre que le gène *LRRK2* est surexprimé chez les patients porteurs des deux variations p.G2019S et p.L953L à la fois que chez le témoin sain. Les valeurs ont été corrigées par rapport à l'intensité de la bande du gène constitutif chez le témoin pour minimiser l'erreur de pipetage et de manipulation (Figure 43).

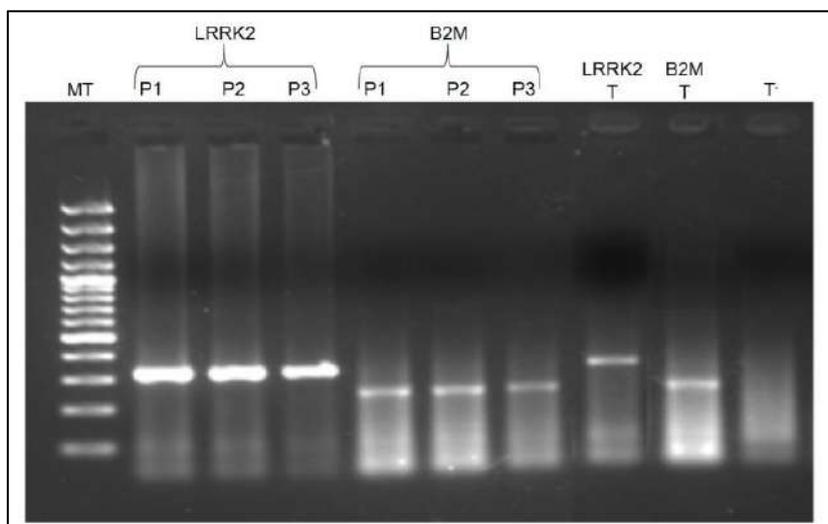


Figure 42. Analyse sur gel d'agarose des produits de la RT-PCR semi quantitative.
 MT : marqueur de taille 100pb, P : patient, T : témoin, T : contrôle négatif de la RT-PCR

La mutation p.G2019S touche le domaine kinase de la protéine *LRRK2* et provoque l'augmentation de l'activité d'autophosphorylation en augmentant la Constante catalytique V_{max} [314, 315]. Une surexpression de la protéine mutée peut aggraver de plus ce dysfonctionnement ce qui explique l'âge plus précoce de l'apparition de la maladie chez les porteurs de la variation p.L953L par rapport aux non porteurs. Cependant, ces résultats sont des résultats préliminaires et nous envisageons à agrandir notre cohorte pour s'assurer de la signification des résultats statistiques. Aussi, il sera plus adéquat d'étudier l'effet de la variation p.L953L sur le niveau d'expression du gène *LRRK2* en utilisant des méthodes plus fiables et sensibles tel que la PCR quantitative en temps réel et en augmentant le nombre des témoins et des patients analysés pour réaliser une comparaison statistique du niveau d'expression.

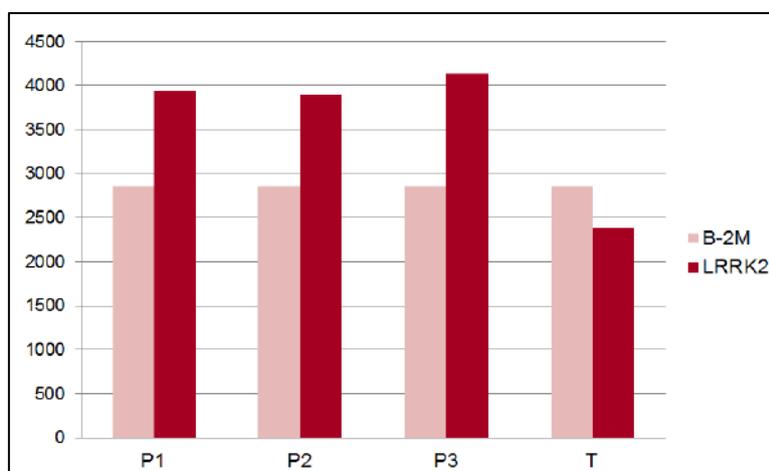


Figure 43. Niveau d'expression du gène *LRRK2* chez 3 patients porteurs de la mutation p.G2019S et de la variation p.L953L en comparaison du témoin sain.

B. Séquençage du gène *GBA*

Dans notre étude nous avons séquençé le gène *GBA* chez tous les 250 patients, y compris les porteurs de la mutation p.G2019S afin d'identifier une éventuelle interaction génétique entre le gène *GBA* et le gène *LRRK2*. En effet, la maladie de Parkinson monogénique est rare et ses formes ne dépassent pas les 10-20% des cas [144]. La plupart des formes de la MP sont le résultat d'interactions entre des facteurs génétiques et / ou des facteurs environnementaux. Certains polymorphismes sur les gènes *SNCA*, *MAPT*, *LRRK2* et *GBA* sont considérées comme des facteurs de risque de la MP dans plusieurs populations. Ces variations peuvent modifier la pénétrance, la sévérité, et la progression de la MP.

L'analyse moléculaire par la méthode de Sanger a révélé un total de 8 variations identifiées à l'état hétérozygote chez 8 patients, y compris deux mutations rapportées précédemment: p.A477T et p.L483P (ancienne nomenclature L444P) et 6 nouvelles variations: c.-68-1G>C, p.D180G, p.A215V, p.F290Y, p.R434S et p.G525D (tous avec la nouvelle nomenclature). Pour ces patients, aucune variation dans les autres gènes testés n'a été détectée sauf pour le patient porteur de la variation de p.R434S qui était porteur de la mutation *LRRK2*-p.G2019S.

I. La variation c.-68-1G> C

Cette nouvelle variation a été identifiée chez une famille avec deux cas parkinsoniens. Cette substitution située dans l'intron 1, a été prédite d'introduire la destruction totale du site d'épissage par Alamut software visual 2.7. Cela provoquera le déplacement du site d'épissage de 18pb en amont (c.-50) vers un nouveau site cryptique fortement activé avec un score HSF = 89,9 (Figure 44). Cette activation n'aurait aucun effet sur la traduction de la protéine puisque l'ATG initiateur ne serait pas affecté. Ces prédictions ont été validées par une étude de l'ARNm du gène *GBA* chez les porteurs et les non porteurs de cette variation dans cette famille. L'amplification des exons 1,2 et 3 par RT-PCR sur l'ARN extrait à partir des lymphocytes totaux, a montré la délétion de 18pb entre l'ARNm des porteurs de la mutation et les non porteurs (Figure 45). L'ensemble de ces résultats suggère que la variation c.-68-1G>C n'est pas pathogène surtout qu'elle ne co-ségrège pas avec la MP dans cette famille et que la mère porteuse était asymptomatique jusqu'à l'âge de 90 ans.

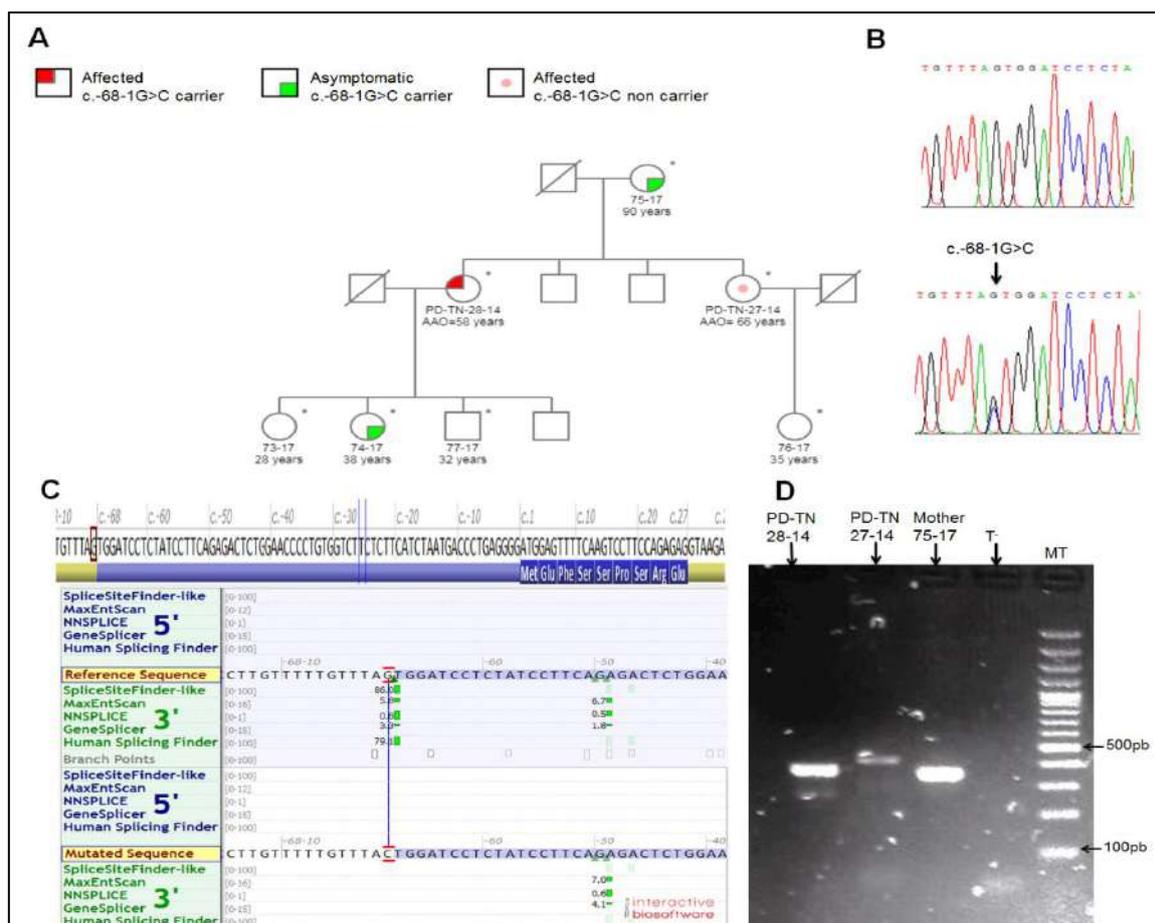


Figure 44. Analyse de la variation c.-68-1G>C sur le gène *GBA*.

(A) Pedigree de la famille. (B) Electrophérogrammes montrant la variation intronique c.-68-1G>C. (C) Résultats d'analyse in silico de la variation c.-68-1G>C montrant l'abolition du site accepteur WT et la création d'un nouveau site cryptique à la position c.-50. (D) Analyse des produits de la RT-PCR montrant la délétion de 18pb entre l'ARNm des porteuses et non porteuse de la variation c.-68-1G>C.

II. Les variations exoniques sur le gène *GBA*

Dans cette étude, nous avons identifié 5 nouvelles variations exoniques (p.D180G, p.A215V, p.F290Y, p.R434S et p.G525D) et 2 précédemment décrites (p.A477T et p.L483P).

Sur le gène *GBA*, près de 300 mutations ont été décrites selon la base de données de génomes humains avec p.N370S et p.L444P étant les mutations les plus fréquentes et qui comptent pour plus de 70% des allèles mutants chez les Juifs ashkénazes[365, 366]. Cependant, dans notre cohorte, il était intéressant de noter que la mutation pathogène la plus fréquente du gène *GBA* (p.N370S) était complètement absente et la mutation L444P (p.L483P) était présente chez un seul patient.

La pathogénicité potentielle des variants identifiés a été évaluée à l'aide des outils de prédiction in silico (Tableau 19).

Tableau19. Prédications de la pathogénicité des variations exoniques identifiées sur le gène *GBA* en utilisant différents outils de prédiction in-silico.

Variation	ConSurf Prediction	GVGD	SIFT	Provean	Poly-phen2	PMUT	PhD-SNP	SNPs&GO	Mutation Taster	Mutpred	
1448T>C	L483P	Score = 5 Modérément conservé et enterré	C0	Endommageant	Score = -4.995 Délétère	Probablement Endommageant	Score = 0.67	Score = 7 Pathogène	Score = 8 Pathogène	Pathogène	Score = 0.9 Gain de désordre
539A>G	D180G	Score = 9 Fortement conservé, exposé et fonctionnel	C65	Endommageant	Score = -6.442 Délétère	Endommageant	Score = 0.85	Score = 9 Pathogène	Score = 9 Pathogène	Pathogène	Perte de stabilité Score = 0.6 Perte de feuillet
644C>T	A215V	Score = 6 Conservé et enterré	C15	Endommageant	Score = -3.467 Délétère	Probablement Endommageant	Score = 0.67	Score = 4 Pathogène	Score = 6 Pathogène	Pathogène	Score = 0.8
869T>A	F290Y	Score = 7 Conservé et enterré	C0	Toléré	Score = -1.677 Neutre	Probablement Endommageant	Score = 0.30	Score = 2 Neutre	Score = 1 Pathogène	Pathogène	Score = 0.8
1300C>A	R434S	Score = 4 Variable et exposée	C0	Toléré	Score = -1.095 Neutre	Bénin	Score = 0.27	Score = 4 Neutre	Score = 1 Neutre	Pathogène	Score = 0.5 Gain de glycosylation
1429G>A	A477T	Score = 2 Très variable et exposé	C0	Toléré	Score = -1.041 Neutre	Bénin	Score = 0.35	Score = 7 Neutre	Score = 4 Neutre	Polymorphisme	Score = 0.3
1574G>A	G525D	Score = 3 Variable et exposée	C0	Toléré	Score = -1.44 Neutre	Bénin	Score = 0.62	Score = 5 Pathogène	Score = 8 Pathogène	Polymorphisme	Score = 0.6

La mutation pathogène précédemment décrite p.L483P (L444P) a été utilisée comme contrôle positif pour les prédictions *in silico*. Dans cette étude, p.L483P, altérant le domaine II, a eu des scores élevés de pathogénicité et a été prédite pour provoquer l'instabilité de la protéine et des troubles de la structure. Cette mutation est située dans le domaine II impliquant les résidus 30-75 et 431-497 et qui joue un rôle structural important [184]. L'analyse fonctionnelle de cette mutation a montré que l'enzyme mutée a une activité réduite en raison de la diminution de sa stabilité [367, 368]. Ces analyses fonctionnelles corrént bien avec les prédictions *in silico*; ce qui confirme la fiabilité des outils utilisés. En plus, de nombreuses études ont confirmé la sensibilité des outils *in silico* pour prédire la pathogénicité des variations sur le gène *GBA* [369, 370]. Ainsi pour le reste de notre travail, nous avons utilisé ces outils pour évaluer la pathogénicité des variations exoniques identifiées.

Trois autres variations ont été également prédites comme délétères, y compris p.D180G, p.A215V et p.F290Y. Ces variations touchent des résidus hautement conservés dans le domaine III (Figure 45). Le domaine III englobant les résidus 76-381 et 416-430, est un domaine de structure de tonneau (TIM (β/α)₈ barrel qui contient le site catalytique [184].

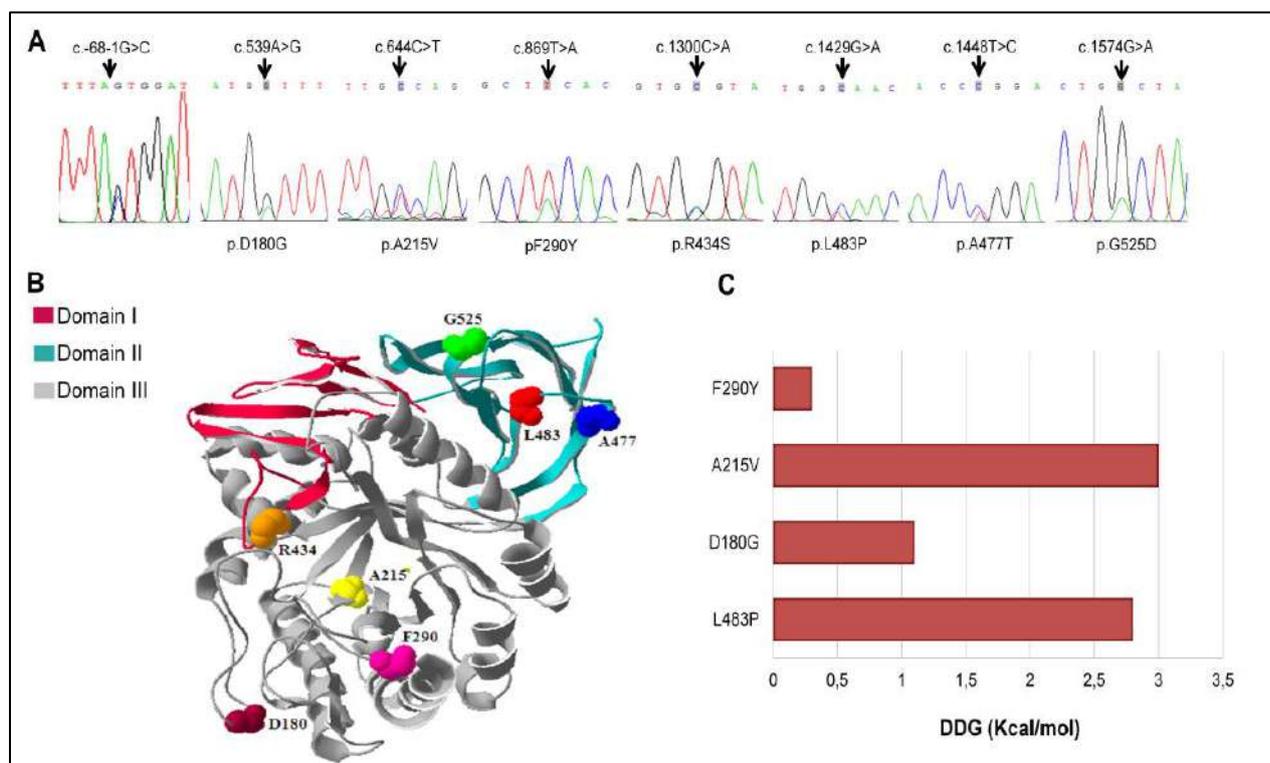


Figure 45. Les variations exoniques identifiées sur le gène *GBA*.

(A) Electrophérogrammes montrant les variations exoniques identifiées sur le gène *GBA*. (B) Structure 3D de la protéine *GBA* et localisation de chaque variation. (C) Résultats fournis par SNPeffect montrant l'effet des quatre variations testées sur la stabilité de la protéine *GBA*. La valeur ddG indique le niveau de l'instabilité de la protéine mutée par rapport à la normale (ddG=0).

Pour mieux comprendre l'effet des variations prédites comme délétères au niveau structural, nous avons effectué des analyses supplémentaires en utilisant SNPeffect 4.0 et la modélisation de la structure 3D. Les résultats fournis par SNPeffect ont montré que les quatre variations testées semblent réduire la stabilité de la protéine GBA à différents degrés (Figure 45).

De plus, l'analyse de l'effet de chaque variation sur les liaisons hydrogènes entre les résidus voisins a montré que seules les variations p.L483P, p.D180G et p.F290Y pouvaient perturber ce type d'interaction (Figure 46). Tous les modèles 3D ont été construits en se basant sur la structure modèle "3ke0" de la glucocérébrosidase à pH acide. La substitution p.L483P conduit à la distraction de deux liaisons hydrogènes Leu483-Asn481 et Asn481-Gln479. La variation p.D180G provoque une perte au niveau d'un feuillet beta due à la rupture de deux liaisons hydrogènes Asp180-His184 et Asp180-Asn185. La variation p.F290Y provoque aussi la distraction de la liaison hydrogène Gly278-Cys287. Nous suggérons que ces altérations de la structure provoquent des graves détériorations dans le noyau hydrophobe du tonneau TIM dans le domaine III, modifiant ainsi la forme du site actif.

L'ensemble de ces analyses a montré que, parmi les 8 variations identifiées et en plus de la mutation p.L483P pathogène, seules les variations p.D180G, p.A215V et p.F290Y pouvaient être considérées comme pathogènes et peuvent être associées à la maladie de Parkinson chez ces patients. Ces mutations étaient complètement absentes chez nos sujets témoins, soutenant leur nature pathogène.

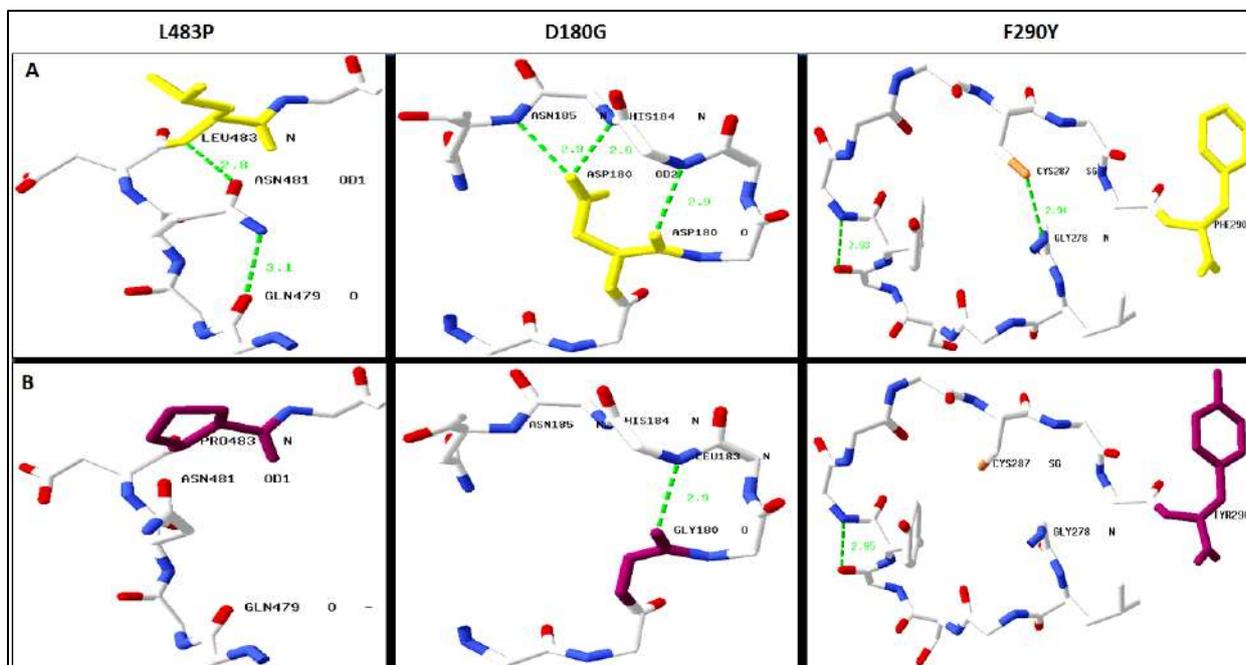


Figure 46. Résultats de la modélisation 3D de la structure sauvage (A) et mutée (B) de la protéine GBA montrant les liaisons hydrogènes interrompues entre les résidus.

III. Caractéristiques cliniques des patients porteurs des mutations *GBA*

Dans notre cohorte tunisienne, les patients porteurs des mutations sur le gène *GBA* avaient un âge d'apparition de la maladie précoce. Les dysfonctionnements neurovégétatifs et les troubles cognitifs étaient fréquents chez ces patients. Ils ont présenté un déclin moteur rapide mais ils ont gardé une bonne réponse à la lévodopa. Ces observations sont en accord avec plusieurs études précédentes [195–198].

De plus, on a constaté une variabilité clinique incluant l'âge d'apparition de la maladie ainsi que sa sévérité qui pourrait être en rapport au degré de la pathogénicité de la mutation *GBA* (Tableau 20). Le patient porteur de la mutation p.D180G, présentant les scores les plus délétères selon les prédictions *in silico* (Figure 47), avait le plus jeune âge de début. En effet, sur le gène *GBA*, deux types de mutations ont été identifiées dont chacun est responsable d'un phénotype complètement différent de la maladie de Gaucher. Les mutations qui provoquent les types neuropathiques II et III de la maladie de Gaucher sont classées comme sévères, alors que les mutations moins sévères causent le type I non neuropathique de la maladie de Gaucher [371]. Dans la maladie de Parkinson, il a été montré que les patients parkinsoniens porteurs d'une mutation *GBA* hétérozygote sévère présentaient un âge de début significativement plus précoce que les patients ayant des mutations hétérozygotes moins sévères [372, 373]. La mutation p.L483P a été déjà décrite comme une mutation sévère causant la maladie de Gaucher de type III [371, 374]. Ainsi, la comparaison entre les phénotypes observés chez nos patients prenant le phénotype développé par le patient porteur de la mutation p.L483P comme référence nous a permis de considérer que la mutation p.D180G et p.A215V comme des mutations sévères et p.F290Y comme non sévère.

D'autre part, la nouvelle variation *GBA*-p.R434S a été identifiée chez le même patient avec la mutation pathogène *LRRK2*-p.G2019S. Même si cette variation a été prédite comme non pathogène, elle semble provoquer un gain significatif de glycosylation selon Mutpred. Cette modification post-traductionnelle pourrait expliquer l'effet modificateur de la variation *GBA*-R434S qui peut influencer l'âge de début de la maladie. En fait, le patient porteur de cette variation a développé les premiers symptômes à l'âge de 41 ans qui est relativement jeune en comparaison à celui des porteurs de la mutation p.G2019S seule [52-60 ans][341].

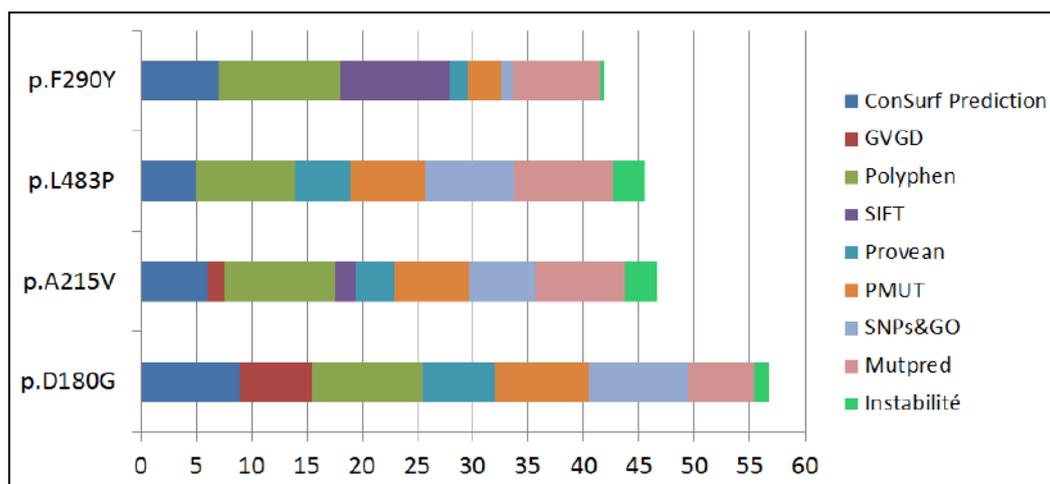


Figure 47. Comparaison du niveau de pathogénicité en se basant sur les score fournis par les outils de prédictions in silico montrant que la mutation p.D180G possède les scores de pathogénicité les plus élevés suivit de la mutation p.A215V puis p.L483P.

Tableau 20. Données démographiques et cliniques des patients porteurs des mutations *GBA*.

	p.L483P	p.D180G	p.A215V	p.F290Y	p.R434S + p.G2019S
Pathogenicity level	++	++++	+++	+	
Facteurs démographiques et caractéristiques de la maladie					
Sexe	M	F	M	M	M
Forme	Familiale	Familiale	Sporadique	Sporadique	Sporadique
Consanguinité	Oui	Non	Oui	Non	Oui
Age de début (année)	50	39	37	55	41
Durée de la MP (année)	3	7	34	4	1
Caractéristiques motrices					
Score UPDRS (/108)	15	82	105	31	10
Score Hoehn et Yahr	1	2	4	3	1
Dose de Levodopa (mg)	500	1500	1625	1000	375
Phénotype de la MP	TD	TD	IN	IN	PIGD
Caractéristiques non motrices					
Score MMSE	26	21	16	20	25
Les troubles du sommeil	Non	Non	Oui	Non	Non
Les troubles neurovégétatifs	Oui	Non	Oui	Oui	Non
Dépression	Non	Oui	Non	Non	Non
Perturbation sensorielle	Oui	Non	Non	Oui	Non

C. Analyse des 22 gènes impliqués dans la maladie de Parkinson par Target sequencing

I. Le gène *LRRK2*

Dans notre cohorte, en plus de la mutation p.G2019S, plusieurs autres variations ont été identifiées sur le gène *LRRK2* (Figure 48). La prédiction de la pathogénicité de ces variations et l'analyse de la conservation de chaque résidu entre les espèces ont été réalisées par différents programmes (Tableau 21). Seulement les variations p.L119P, p.H625R, p.I1371V et p.Y2189C ont été prédites comme délétères.

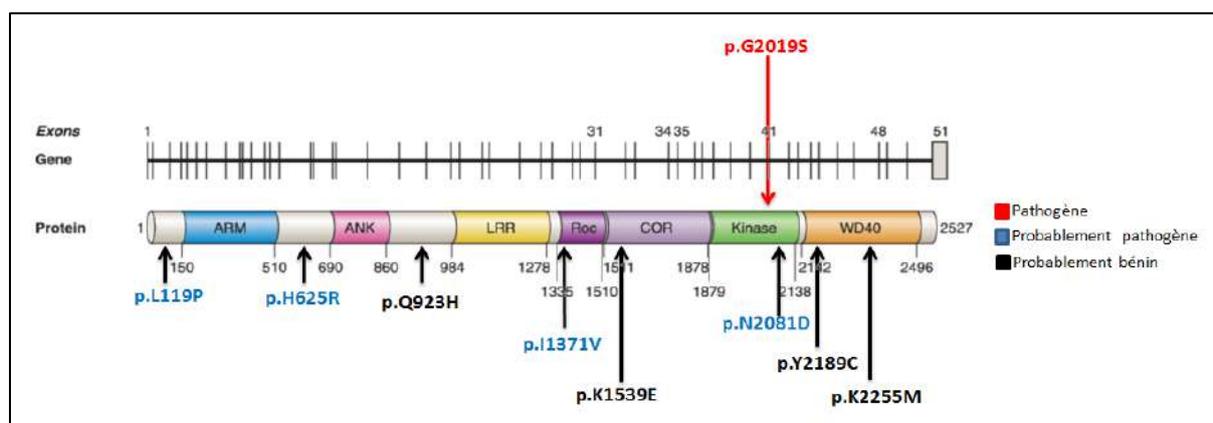


Figure 48. Ensemble de variations identifié sur le gène *LRRK2* et leurs localisations sur la protéine.

La variation p.L119P est située au niveau du domaine N-terminal et elle affecte un résidu conservé. Cette variation a été prédite comme délétère par la plupart des programmes de prédiction *in silico*. Mutpred a prédit que cette variation provoque la diminution de la stabilité de la protéine *LRRK2* ($P = 0.0327$). Pour confirmer cette prédiction nous avons utilisé le logiciel I.Mutant. I.Mutant a montré que la variation p.L119P provoque la diminution de la stabilité de la protéine avec un score $DDG = -0.79$ (predicted free energy change value). Par contre, des études ont montré que la variation p.L119P est plus fréquente chez les témoins étudiés que chez les patients parkinsoniens [156, 375, 376]. Ces résultats sont en faveur de la nature non pathogène de cette variation.

La variation p.H625R a été prédite de causer un gain de site de fixation (Molecular Recognition Fragments : MoRFs) avec une valeur $P = 0.0047$. Cette variation rare touche un acide aminé hautement conservé et elle a été prédite comme délétère. Elle a été identifiée chez un seul cas à l'état hétérozygote dans la base de données Exac (0.000008) et chez 8 cas dans TOPMED (0.00006). Ces prédictions supportent la nature pathogène de cette variation.

Tableau 21. Prédictions de la pathogénicité des variations exoniques identifiées sur le gène *LRRK2* en utilisant différents outils de prédiction in-silico.

Patient	Nucleotide change	protein change	Freq in 1000G	Freq in Exac	Freq in gnomAD	ConSurf score	Align GVGD	SIFT	Provean	Polyphen	MutTas ter	SNPs& GO	PMUT	MutPred
PD-TN-26-11 PD-TN-09-11 PD-TN-152-11 PD-TU-43	c.4111A>G rs17466213	p.I1371V	0.0012	0.001	0.0008	Score=8 buried residue	C0	Tolerated	Neutral	Benign	Disease causing	Neutral	Neutral	0.764
PD-TN-111-09	c.356T>C rs33995463	p.L119P	0,0008	0.0012	0.001	Score=7 buried residue	C0	Damaging	Deleterious	Probably Damaging	Disease causing	Disease	Neutral	0.730/ Loss of stability (P = 0.0327)
PD-TN-119-16	c.1874A>G rs200787476	p.H625R	NA	8.273e-06	0.00008	Score=6 exposed residue	C0	Damaging	Deleterious	Benign	Disease causing	Disease	Neutral	0.622/Gain of MoRF binding (P = 0.0047)
PD-TN-47-17	c.2769G>C rs58559150	p.Q923H	0,0002	0.0001	0.00018	Score=1 exposed residue	C0	Tolerated	Neutral	Probably Damaging	Polymorphism	Disease	Neutral	0.366
PD-TU-1	c.4624C>T rs33958906	p.P1542S	0.0132	0.03	0.033			Tolerated	Neutral	Probably Damaging	Polymorphism	Neutral	Neutral	0.409
PD-TU-50						Score=3 exposed residue	C0	Tolerated	Neutral		Polymorphism	Neutral	Neutral	0.409
PD-TU-37	c.4615A>G rs199777744	p.K1539E	NA	8.276e-06	0.00001	Score=1 exposed residue		Tolerated	Neutral	Benign	Disease causing	Neutral	Neutral	0.464
PD-TU-33 PD-TN-111-10	c.6241A>G rs33995883	p.N2081D	0.0098	0.017	0.016	Score=8 functional exposed residue	C0	Tolerated	Neutral	Benign	Polymorphism	Neutral	Neutral	0.365
PD-TU-49	c.6764A>T rs200762374	p.K2255M	NA	8.367e-05	0.00007	Score=1 exposed residue	C0	Tolerated	Neutral	Probably Damaging	Disease causing	Neutral	Neutral	0.373
PD-TU-10	c.6566A>G rs35658131	p.Y2189C	0,0006	0.0004	0.00035	Score=1 exposed residue	C0	Tolerated	Neutral	Benign	polymorphism	Disease	Disease	0.699

La variation p.I1371V qui affecte un résidu hautement conservé (score Consurf =8) localisée au niveau du domaine ROC (Ras of complex proteins) a été identifiée chez 4 cas. Le domaine ROC assure la fonction GTPase de la protéine et la plupart des mutations pathogènes ont été identifiées dans ce domaine. La variation p.I1371V a été identifiée chez plusieurs cas parkinsoniens non apparentés et la majorité des études confirment son effet pathogène [319, 377–379] mais il a été également détecté chez des témoins sains [377, 380].

La variation p.N2081D identifiée chez deux patients est localisée au niveau du domaine MAPKKK (mitogenactivated kinase kinase kinase) qui intervient dans la fonction kinase du LRRK2. Cette variation touche un acide aminé fortement conservé qui peut avoir un rôle fonctionnel. Cependant elle a été prédite comme non délétère par la plupart des outils de prédiction in silico. Nos résultats sont en accord avec des études antérieures qui suggèrent que la variation p.N2081D est non pathogène. L'étude de Benitez et al., a retrouvé une fréquence allélique de cette variation de 1,8% chez les patients et de 2,2% chez les témoins [381]. De plus, elle a été identifiée par l'étude de Foo al., chez 0,25% des témoins alors qu'il était absent chez les patients Parkinsoniens [382]. On peut donc conclure que la variation p.N2081D n'est pas pathogène.

En conclusion, bien que les variations p.L119P, p.H625R, p.I1371V et p.N2081D affectent des résidus hautement conservés parmi les homologues de la protéine LRRK2 et qu'elles ont déjà été rapportées chez plusieurs patients parkinsoniens non apparentés, leur rôle pathogène reste incertain vu leur fréquence élevée chez les témoins sains. D'autres travaux, y compris des études de cas-témoins d'origine Tunisienne et des analyses fonctionnelles, pourraient aider à déterminer si ces variations sont pathogènes.

Le Tableau clinique des patients porteurs de ces variations est résumé dans le Tableau 22.

Tableau22. Caractéristiques cliniques des porteurs des mutations sur le gène *LRRK2*.

Variation	p.L119P	p.H625R	p.I1371V			p.N2081D		
Patient	PD-TN- 111-09	PD-TN- 119-16	PD-TN- 26-11	PD-TN- 09-11	PD-TN- 152-11	PD- TU-43	PD-TU- 33	PD-TN- 111-10
Facteurs démographiques et caractéristiques de la maladie								
Sexe	Mâle	Femelle	Mâle	Mâle	Mâle	Mâle	Femelle	Femelle
Autres cas de MP dans la famille	1	NA	0	0	0	1	0	0
Niveau d'éducation (années)	7	NA	5	10	4	0	6	2
Age de début (années)	44	54	51	52	47	59	46	61
Durée de la MP (années)	9	1	3	9	24	6	12	4
Dose de Levodopa (mg)	500mg	500mg	375mg	375mg	875mg	725mg	375mg	875mg
Caractéristiques motrices								
Score UPDRS	38		3	15	35	24	30	70
Score Hoehn et Yahr	2,5		1	1	4	2	3	5
Phénotype de la MP	IN		TD	TD	TD	IN	PIGD	IN
Caractéristiques non motrices								
Score MMSE	25		28	30	20	26	28	17
Déficience cognitive	Non		Non	Non	Oui	Non	Non	Oui
Troubles neurovégétatifs	Oui		Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Troubles sensoriels	Non		Non	Non	Oui	Oui	Non	Oui
Troubles du sommeil	Non		Non	Non	Non	Oui	Non	Oui
Dépression	Non		Non	Non	Oui	Non	Oui	Non

IN: Indeterminate, TD: tremor dominant, PIGD: postural instability gait disorder.

II. Le gène *PARK2*

Les mutations sur le gène *PARK2* sont la cause la plus fréquente dans les formes autosomiques récessives à début précoce de la maladie de Parkinson identifiées dans 50% des formes familiales et 18% des formes sporadiques [228]. *PARK2* code pour une E3 ubiquitine ligase impliquée dans le contrôle de la qualité mitochondriale par la dégradation des mitochondries endommagées par l'autophagie, ou mitophagie lysosomale [225]. Plus de 204 mutations ont été identifiées incluant des mutations ponctuelles et des réarrangements exoniques.

Dans notre étude, nous avons identifié deux CNVs chez 2 patients (Figure 49). Le phénotype de ces deux patients à été typique de la MP associée à des mutations sur le gène *PARK2*.

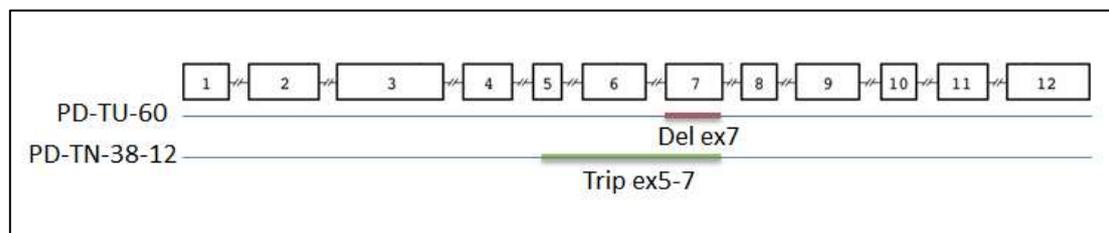


Figure 49. Ensemble des CNVs identifié à l'état homozygote sur le gène *PARK2*.

En rouge la délétion de l'exon 7 chez le patient PD-TU-60 et en vert la triplication des 3 exons 5,6 et 7 chez le patient PD-TN-38-12.

II.1. Patient PD-TN-38-12

Ce patient a présenté à l'âge de 35 ans une akinésie très sévère, et une rigidité et tremblement de repos au niveau du bras droit. Son discours était inintelligible en raison d'une hypophonie sévère et il présentait une hypomimie modérée. Il a présenté des difficultés de marche qui s'est traduit par une marche à petits pas accompagnée d'une diminution de balancement du bras et une instabilité posturale. Il a été traité avec l'agoniste dopaminergique pramipexole à 150 mg par jour, avec une bonne évolution. Cinq ans après l'apparition de la maladie, la réponse au traitement est encore bonne sans aggravation motrices ni dyskinésies. La progression était lente (UPDRS-III= 18/108, stade Hoehn and Yahr = 1/5) Il n'a pas développé des troubles cognitifs (MMSE=30/30), ni des troubles neurovégétatifs, mais il se plaignait d'une légère insomnie. L'IRM et l'évaluation psychiatrique étaient normales.

L'analyse des résultats du NGS par le programme Polydiag a révélé une nouvelle triplication des exons 5,6 et 7 du gène *PARK2* à l'état homozygote (rapport de la couverture moyenne patient/contrôle = 3). Cette triplication a été ensuite confirmée par la méthode MLPA avec un rapport de la hauteur des pics patient/contrôle= 3 (Figure 50).

Le patient est issu d'un mariage consanguin sans antécédents de la MP. Le père a été porteur de cette triplication à l'état hétérozygote et il était asymptomatique jusqu'à l'âge de 70 ans. À notre connaissance, c'est la première description d'une triplication à l'état homozygote des exons 5-7 du gène *PARK2*. La seule triplication identifiée dans le gène *PARK2* est celle des exons 2-4 rapportée dans deux études où les patients avaient une dystonie du pied et ont maintenu une excellente réponse à la lévodopa pendant plusieurs années avec une dyskinésie modérée [383, 384].



Figure 50. Identification de la triplication des exons 5-7 sur *PARK2* par PolyDiag et MLPA.

A : Arbre généalogique de la famille PD-TN-38-12. B : Identification par MLPA de la triplication des exons 5-7 à l'état hétérozygote chez le père. C et D : Identification sur PolyDiag et par MLPA respectivement de la triplication des exons 5-7 sur le gène *PARK2* à l'état homozygote chez le patient. Pour PolyDiag et MLPA, un rapport normal de 1 représente 2 copies sur les deux chromosomes, un rapport de 2 représente 4 copies (dans notre cas : 3 copies sur l'allèle muté et 1 copie sur l'allèle sauvage), un rapport de 3 représente 6 copies (dans notre cas : 3 copies sur chaque allèle muté).

II.2. Patient PD-TU-60

Ce patient est une femme issue d'un mariage consanguin du premier degré et sans antécédents familiaux de parkinsonisme (Figure 51). Elle a développé à l'âge de 37 ans un syndrome akineto-rigide avec un léger tremblement dans la main droite. Elle s'est également plainte de douleurs au cou et de troubles neurovégétatifs. La progression de la maladie était lente

(UPDRS-III= 38/108, stade Hoehn and Yahr = 2/5) après 9 ans d'évolution de la maladie sans développé des troubles cognitifs ni une instabilité postural. Elle a gardé une bonne réponse au traitement lévodopa (375mg/jour) sans fluctuations motrices. Mais l'évaluation psychiatrique a révélé une dépression sévère (Beck's Depression Inventory score=28/39). L'analyse des résultats du NGS par le programme PolyDiag a révélé une délétion de l'exon 7 du gène *PARK2* à l'état homozygote (rapport de la couverture moyenne patient/contrôle = 0). Cette délétion a été ensuite confirmée par la méthode MLPA (Figure 51).

Cette mutation a été rapportée par un nombre important des travaux précédents dans différentes populations [385–392].

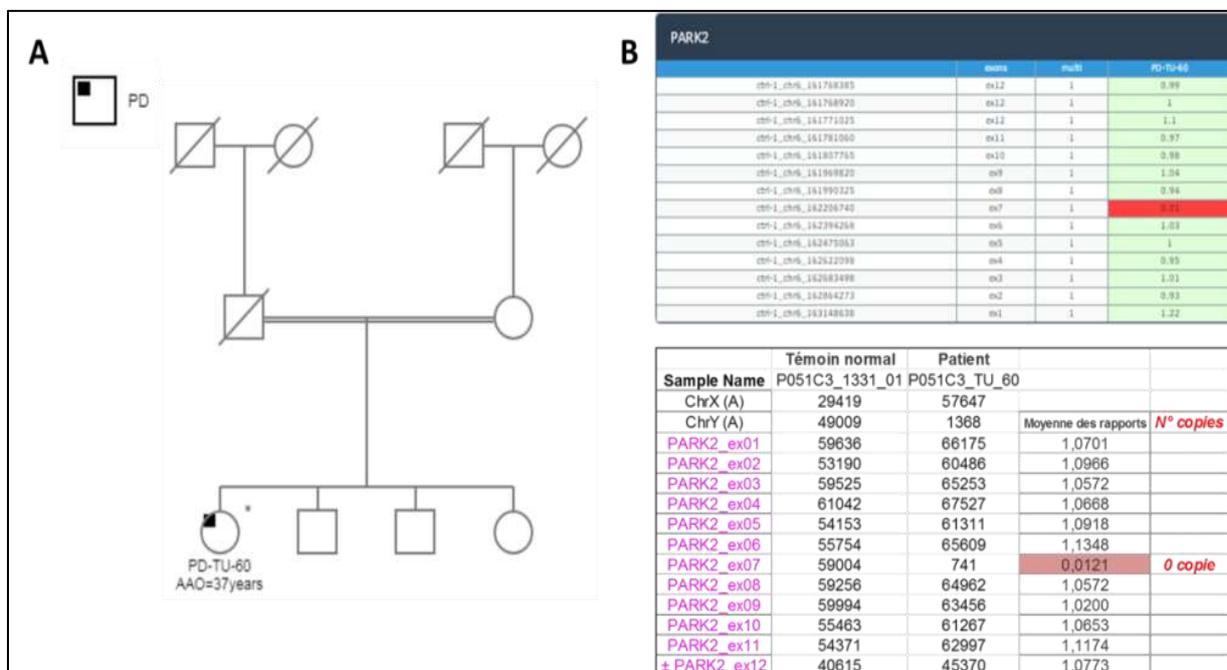


Figure 51. Identification de la délétion de l'exon 7 sur *PARK2* par PolyDiag et MLPA.

A : Arbre généalogique de la famille PD-TU-60. B : Identification de la délétion homozygote de l'exon 7 sur le gène *PARK2* sur PolyDiag (en haut) et validation par MLPA (en bas). Pour PolyDiag et MLPA, un rapport normal de 1 représente 2 copies sur les deux chromosomes, un rapport de 0 représente 0 copies (délétion homozygote sur les deux chromosomes)

III. Le gène *SYNJ1*

Le gène *SYNJ1* code pour la synaptojanine 1, une polyphosphoinositide phosphatase concentrée au niveau des synapses [393, 394]. La synaptojanine 1 est nécessaire pour la formation et la dynamique des vésicules de transport avec manteau de clathrine (clathrin-coated pit) et des vésicules synaptiques, par la déphosphorylation du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI (4,5) P2) [395]. Le gène *SYNJ1* code pour 2 variants d'épissage majeurs: *SYNJ1-170* (isoforme de 170 kDa) et *SYNJ1-145* [396]. Ces isoformes contiennent trois

domaines fonctionnels: le domaine inositol de type Sac1 N-terminal (Sac-1), le domaine de l'inositol-5-phosphatase (5'PP) et le domaine C-terminal riche en proline (PRD)[394, 397].

En 2013, deux équipes indépendantes ont identifié la même mutation homozygote p.R258G dans le gène *SYNJ1* associée à une forme autosomique récessive de la MP juvénile dans deux familles consanguines d'Italie et d'Iran [252, 253].

Dans notre cohorte nous avons identifié une nouvelle mutation composite sur le gène *SYNJ1*: c.4217_4218 insC and c.4126A>G chez une famille consanguine avec deux cas qui ont développé la maladie de Parkinson à l'âge de 16 et 22 ans respectivement (Figure 52).

- **Patient 1** : Le premier patient a développé une lenteur progressive des mouvements volontaires et un léger tremblement au niveau de la main droite depuis l'âge de 16 ans. Dans ses antécédents médicaux, nous avons également constaté qu'il développait des crises tonico-cloniques généralisées à l'âge de 7 ans, traitées avec succès par le valproate de sodium. L'examen physique a montré une bradykinésie généralisée, une rigidité bilatérale des membres et un tremblement de repos intermittent des deux mains plus prédominant du côté droit. La posture dystonique était présente dans le bras gauche. Pendant la marche, nous avons observé une marche trainante à petit pas avec instabilité posturale. Son discours était inintelligible en raison d'une hypophonie sévère et il présentait une hypomimie modérée. L'évaluation neuropsychologique a révélé une déficience cognitive modérée (MMSE= 20). Le test de lévodopa était positif. En fait, l'administration de 250 mg de lévodopa a induit un soulagement complet des symptômes moteurs sans dyskinésie. Lors de l'état «ON», le score UPDRS moteur était de 35 et le stade de Hoehn et Yahr étaient de 2 après 7 ans de progression de la maladie.

- **Patient 2** : la sœur aînée a remarqué l'apparition insidieuse d'un tremblement de la main droite particulièrement au repos associé à la rigidité des membres inférieurs résultant de difficultés de marche à l'âge de 21 ans. L'examen neurologique a révélé un tremblement de repos bilatéral modéré, une raideur axiale et une rigidité des quatre membres plus sévère du côté droit. Elle avait une allure lente et traînante et une instabilité posturale. L'examen de la motilité oculaire a montré une limitation du mouvement du regard vertical, particulièrement vers le haut, rappelant la paralysie supra-nucléaire. Une bonne réponse au traitement par la lévodopa a été obtenue (500 mg / jour) sans complications motrices. Le score UPDRS-III sous traitement était de 20 et le stade de Hoehn et Yahr était de 1,5 après 3 ans de progression de la maladie. Comme son frère, aucun dysfonctionnement sensoriel, de sommeil, autonome ou de

troubles psychiatriques ont été signalés. Aucun antécédent de crise d'épilepsie n'a été retrouvé, mais l'évaluation neuropsychologique a révélé une atteinte cognitive modérée (MMSE = 21).

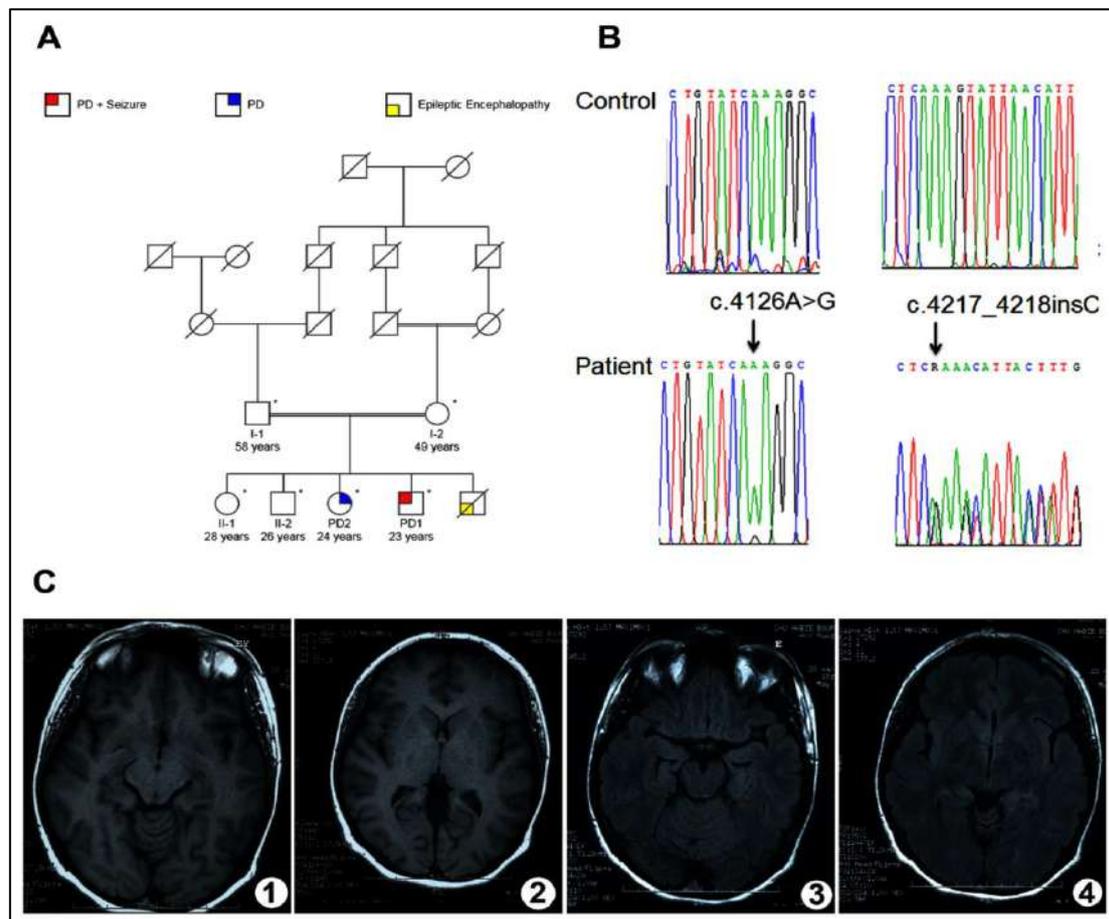


Figure 52. Identification de la mutation hétérozygote composite sur le gène *SYNJ1*.

(A) Pedigree de la famille avec la maladie de Parkinson juvénile. (B) chromatogrammes de séquence du séquençage de Sanger montrant les mutations c.4126A> G / p.Lys1321Glu et c.4217_4218 insC / p.Leu1406Phefs * 42 sur le gène *SYNJ1* chez les patients étudiés (en bas) et leur absence dans les parents (en haut). (C) Axial IRM T1 (1,2) et T2 Flair (3,4) séquences montrant une apparence normale du parenchyme cérébral, des noyaux gris centraux et du mésencéphale.

La mutation c.4126A> G (rs752478437) a été rapportée dans seulement 1 cas d'origine européenne à l'état hétérozygote (fréquence des allèles dans ExAC: 8.24e-06). Cette mutation substitue un acide aminé basique hydrophile conservé (Lys) à la position 1321 à un acide aminé acide (Glu) dans le domaine riche en proline (PRD) (Figure 53). Ce domaine est le site de fixation du domaine SH3 de l'endophiline et de l'amphiphysine. L'endophiline recrute *SYNJ1* sur les sites endocytaires pour favoriser la déphosphorylation des phosphatidylinositol 4,5-bisphosphates [398].

Les outils bio-informatiques ont été utilisés pour prédire si la mutation p.Lys1321Glu pourrait potentiellement affecter les propriétés et la structure de la protéine. La variation

p.Lys1321Glu a été prédite d'être délétère par les outils de prédiction in silico. Les modèles des protéines sauvage et mutée ont été analysés en utilisant le programme DeepView / Swiss PDB Viewer 3.7 et la valeur moyenne de déviation (root mean square value) calculée entre les atomes de carbones était très significative (RMS=12,58 Å) (Figure 53).

La mutation c.4217_4218 insC (rs761852713) crée un codon stop prématuré (p.Leu1406Phefs*42) situé au niveau du domaine de liaison AP2 de l'isoforme *SYNJI*-170 (Figure 53). En fait, contrairement au variant d'épissage de 145 kDa, l'isoforme de 170 kDa porte une queue C-terminale supplémentaire qui contient des sites de liaison pour la clathrine (site AP2) via trois motifs de liaison (WxxF, FxDxF et DxF) et pour le récepteur du facteur de croissance épidermique (Eps15) via le domaine asparagine-proline-phénylalanine (NPF) [399, 400] (Figure 53). Ce motif est le noyau du site de liaison pour les domaines Eps-homology (EH) du Eps15 [401] qui est nécessaire pour l'endocytose à médiation par la clathrine car il joue un rôle dans l'assemblage des vésicules de transport avec manteau de clathrine [402, 403].

Ainsi, la nouvelle mutation hétérozygote composite identifiée sur le gène *SYNJI* peut perturber l'endocytose des vésicules synaptiques dépendantes de la clathrine. Nos résultats moléculaires corrélaient parfaitement avec les caractéristiques cliniques de nos patients qui ont développé une MP juvénile associée à une épilepsie infantile dans un cas. Cependant, cette mutation provoque un phénotype plus bénin avec une bonne réponse au traitement lévodopa et pas de signe de dyskinésie ou fluctuations motrices chez nos patients. Cette observation était en désaccord avec la plupart des études où les patients portant des mutations de *SYNJI* avaient une amélioration limitée après le traitement lévodopa [140]. Selon ces résultats, nous suggérons que les mutations dans le domaine C-terminal de la protéine Synaptojanin 1 sont responsables d'un phénotype moins sévère que les mutations dans les domaines SAC1-like et inositol-5-phosphatase. En fait, il a été noté que les conséquences physiopathologiques des mutations *SYNJI* peuvent conduire à des phénotypes différents [140]. En général, des mutations causant la MP sont localisées dans le domaine SAC1-like de la protéine et altèrent l'activité de la phosphatase Sac1 ciblant le phosphatidylinositol monophosphate [252, 404, 405]. Alors que les mutations qui affectent le domaine de l'inositol-5-phosphatase et qui provoquent une réduction critique de l'activité de la phosphatase sont responsables d'un syndrome épileptique plus grave [254, 406, 407].

Nous avons aussi constaté que l'évolution était plus rapide au début de la maladie alors qu'elle est plus lente à un stade ultérieur. Cette observation concordait avec une étude antérieure sur italienne portant la mutation p.R258G sur le gène *SYNJI* [408].

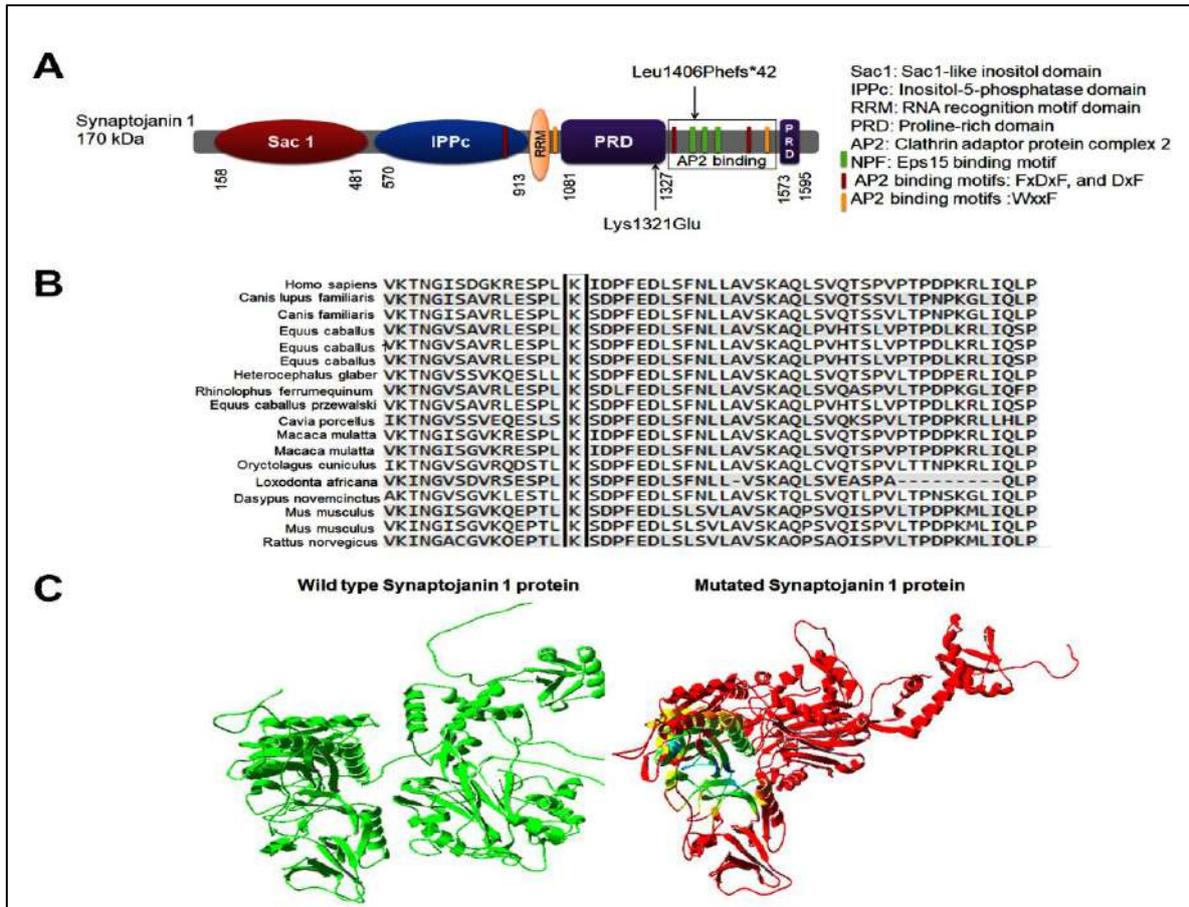


Figure 53. Analyse in-silico de la variation p.Lys1321Glu.

(A) La structure moléculaire de Synaptojanin 1 et l'emplacement de chaque mutation sur la protéine. (B) Alignement de la protéine Synaptojanin 1 dans différentes espèces montrant la conservation du résidu 1321; l'acide aminé muté est encadré. (C) structure 3D de la protéine Synaptojanin 1 obtenue par le logiciel 'DeepView / Swiss PDB Viewer 3.7' montrant la différence entre la protéine sauvage et la protéine mutée p.Lys1321Glu (la couleur rouge montre le RMSD le plus significatif).

En conclusion, nos résultats démontrent l'implication d'une nouvelle mutation hétérozygote composée: p.Leu1406Phefs*42 et p.Lys1321Glu; dans le domaine C-terminal de la protéine Synaptojanin 1 dans la MP juvénile autosomique récessive avec épilepsie généralisée et déficience cognitive. Cette mutation peut conduire à la dérégulation de l'assemblage des vésicules de transport synaptique dans les neurones, puisque elle perturbe les sites de liaison de l'AP2 et inhibe ensuite la liaison à la clathrine et à l'Eps15. Nous suggérons également que les mutations dans le domaine C-terminal du gène *SYNJ1* provoquent un phénotype plus bénin avec une bonne réponse au traitement à la lévodopa et une progression plus lente, particulièrement à un stade plus avancé de la maladie.

L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'un article publié à « Journal of Molecular Neuroscience» (Impact Factor : 2.454).



A Novel SYNJ1 Mutation in a Tunisian Family with Juvenile Parkinson's Disease Associated with Epilepsy

Sawssan Ben Romdhan^{1,2,3,4}  & Salma Sakka¹ & Nouha Farhat¹ & Siwar Triki¹ & Mariem Dammak¹ & Chokri Mhiri^{1,2}

Received: 6 June 2018 / Accepted: 28 August 2018
Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

Mutations in SYNJ1 gene have been described in few families with juvenile atypical Parkinson disease (PD). This gene encodes for BSynaptojanin 1, an enzyme playing a major role in the phosphorylation and the recycling of synaptic vesicles. In this study, we report two siblings, from a consanguineous Tunisian family, presenting juvenile PD. Both siblings developed mild Parkinsonism at 16 and 21 years old respectively. One patient had generalized tonic-clonic seizures since the age of 7 years. There was no evidence of sleep or autonomic dysfunctions and psychiatric disorders in both cases, but they developed a moderate cognitive impairment. They kept a good response to low doses of levodopa treatment with no dyskinesia or motor fluctuations. We designed an NGS-based screening of 22 currently most prevalent parkinsonism-associated genes. Genetic study revealed a novel compound heterozygous mutation (p.Leu1406Phefs*42 and p.Lys1321Glu) in SYNJ1 gene. The p.Lys1321Glu mutation is located in the proline-rich domain and leads to a significant change in the 3D structure of the protein (RMS = 12.58 Å). The p.Leu1406Phefs*42 mutation disrupts the AP2 binding sites and subsequently disables synaptic and vesicle endocytic recycling in neurons. This is the first report of mutation in the C-terminal domain of Synaptojanin 1 protein causing mild juvenile PD with generalized seizures, cognitive impairment, and good response to levodopa treatment.

Keywords Juvenile Parkinson's disease · Autosomal recessive · Epilepsy · Tonic-clonic · SYNJ1 gene

Introduction

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder that usually affects adults over the age of 60 (Massano and Bhatia 2012). Idiopathic PD is clinically characterized by three major motor symptoms (bradykinesia, resting tremor, rigidity), associated to non-motor symptoms, such as autonomic dysfunctions, cognitive impairment,

neuropsychiatric symptoms, and sleep disorders. Parkinsonism may have many etiologies, but it is generally considered to be the result of environmental and genetic factors (Ross and Smith 2007). During the last 20 years, an increasing number of genes, including autosomal dominant (SNCA, LRRK2, and VPS35) and autosomal recessive genes (PARKIN, PINK1, and DJ1) have been identified. These genes are usually characterized by an early-onset levodopa responsiveness typical PD (Houlden and Singleton 2012; Puschmann 2013). However, mutations in other genes, such as ATP13A2, DNAJC6, FBXO7, PLA2G6, SPG11, and SYNJ1 have been described to cause early onset or juvenile atypical Parkinsonism, with poor response to levodopa, cognitive decline, and other neurological and psychiatric signs (dystonia, oculomotor disturbances, mental retardation, epilepsy, and dementia) (Houlden and Singleton 2012; Puschmann 2013, 2017).

In 2013, two independent teams identified the same homozygous SYNJ1 p.R258G mutation associated with juvenile PD in two consanguineous families from Italy and Iran (Krebs et al. 2013; Quadri et al. 2013). This gene encodes for the Synaptojanin 1, a polyphosphoinositide phosphatase concentrated at the synapses (McPherson et al. 1996; Mani et al. 2007).

* Sawssan Ben Romdhan
sawssan.benromdhan@yahoo.fr

¹ Laboratoire de Recherche en Neurogénétique, Maladie de Parkinson et Maladies Cérébro-Vasculaires (LR-12-SP-19), Habib Bourguiba University Hospital, 3029 Sfax, Tunisia

² Clinical Investigation Center (CIC), CHU Habib Bourguiba, Sfax, Tunisia

³ Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, INSERM U1127, Sorbonne Université, UPMC Paris VI univ. UMR_S1127, CNRS UMR 7225, 75013 Paris, France

⁴ École Pratique des Hautes Études EPHE, PSL Research University, Paris, France

SYNJ1 is required for clathrin-coated pit and synaptic vesicledynamics through the dephosphorylation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P2) (Di Paolo and De Camilli 2006). The SYNJ1 gene encodes two major splice variants: SYNJ1-170 (170 kDa isoform) and the SYNJ1-145 (Perera et al. 2006). These isoforms contain three functional domains: N-terminal Sac1-like inositol domain (Sac-1), an inositol-5-phosphatase domain (5'PP), and a C-terminal proline-rich domain (PRD) (McPherson et al. 1996; Tsujishita et al. 2001).

In this study, we report two siblings, from a consanguineous Tunisian family, presenting juvenile Parkinsonism associated to a novel compound mutation in the SYNJ1 gene.

Patients and Methods

Clinical Investigation

We report here a family with two affected members presenting juvenile Parkinsonism and epilepsy. Patients underwent detailed neurological and general physical examination by a neurologist specialized in movement disorders. The degree of severity of PD symptoms was measured using the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) and Hoehn and Yahr scales. To estimate the response to levodopa therapy, UPDRS score was calculated before and after drug administration (every 30 min during 4 h). The mini-mental state examination (MMSE) was used to measure the degree of cognitive impairment. To detect non-motor dysfunctions, the patient was asked to respond to a brief questionnaire.

Next-Generation Sequencing (NGS) Target Gene Panel

An informed consent was obtained from all family members to perform blood sampling and DNA extraction for genetic study. Our study was approved by our institutional ethics committee. We designed an NGS-based screening of 22 currently most prevalent parkinsonism-associated genes: ATP13A2, DCTN1, DNAJC13, DNAJC6, SPG11, EIF4G1, FBOX7, GBA, GCH1, LRRK2, PANK2, PARK2, DJ-1, PINK1, PLA2G6, POLG, SNCA, VPS35, TH, UCHL1, VPS13C, and SYNJ1. Specific probes for NGS target enrichment were designed using NimbleDesign1 software. The custom Design KAPA Library Preparation Kit (Roche) was used to hybridize and double capture all exons, intron–exon boundaries, 5' and 3'-UTR sequences of the corresponding DNA sequences of index cases. Multiplexed-DNA sample library pools were directly sequenced in the MiSeq Illumina sequencer.

The raw data of the high-throughput sequencing were analyzed with the CLC Bio software and filtered out to detect any deleterious variants in the 22 PD genes. Human reference sequence GRCh37/hg19 assembly was used for sequence alignment and variant calling with the Genome Analysis

Toolkit (GATK). The PolyWeb software (Imagine Institute—Paris Descartes University) was then used to filter the variants coverage of captured regions. All reported variants of interest were verified by bidirectional Sanger sequencing using primers designed with Primer3 on an ABI 3730 automated sequencer (Life Technologies).

The mean coverage was 1128× (range 137–2038×), and the mean percent coverage at 30× was 98.7% (range 96.5–99.6%) for the two tested individuals. Analyses were performed using custom Polyweb software (Paris Descartes, France). Targeted exons with a coverage less than 100 reads were screened subsequently by Sanger sequencing. Variants were prioritized based on its frequencies (MAF < 1%) in public databases (1000 Genomes/ExAC/TOPMED), nucleotide and amino acid conservation, and predicted pathogenicity.

In Silico Analysis

The pathogenicity of identified variations was predicted using the Alamut Visual 2.7 (Interactive Biosoftware, La Rochelle, France) according to Align GVGD, SIFT, Mutation Taster, and PolyPhen-2 algorithms.

To investigate the eventual effect of the non-synonymous variation, we compared the 3D structure of both wild-type and p.Lys1321Glu-mutated protein using the DeepView/Swiss PDB Viewer 3.7. The generation of both normal and mutated models was ensured by RaptorX. All 3D models were constructed based on the template 3lwtX crystal structure of the Yeast Sac1.

Results

In this study, we report two siblings with juvenile Parkinsonism associated with tonic-clonic seizures. The index case, a 23-year-old man, was first seen at our consultation complaining from bradykinesia and right hind tremor. He developed progressive slowness of voluntary movements and a mild tremor at the right hand since the age of 16 years. In his medical history, we also noticed that he developed generalized tonic-clonic seizures at the age of 7 years, successfully treated by sodium valproate. Physical examination showed generalized bradykinesia, bilateral limb rigidity, and intermittent rest tremor of both hands more preminent on the right side. Dystonic posture was present in the left arm. During ambulation, we observed a shuffling gait with postural instability. His speech was unintelligible due to severe hypophonia, and he showed moderate hypomimia. Limb strength was normal and deep tendon reflexes were present and symmetrical. No sensory dysfunction was noted. Ocular motility and visual fields were normal. There was no evidence of sleep or autonomic dysfunctions and psychiatric disorders. The general physical examination was unremarkable. Brain and cervical cord MRI were normal. The levodopa test was positive; in fact, administration of 250 mg L-DOPA induced a

complete relief of motor symptoms without dyskinesia. During the «on state», the motor UPDRS score was 35 and Hoehn and Yahr Stage was 2 after 7 years of disease progression. Neuropsychological assessment yielded a moderate cognitive impairment (MMSE = 20).

His older sister, a 24-year-old woman, had normal developmental milestones. At the age of 21, she noticed insidious appearance of a tremor of the right hand particularly at rest associated to rigidity of the lower limbs resulting to gait difficulties. Neurological examination revealed a moderate bilateral resting tremor, axial stiffness and four limbs rigidity more severe on the right side. She had a slow shuffling gait and postural instability. Eye motility examination showed limitation of vertical gaze movement, particularly upward reminiscent of supra-nuclear palsy. Good response to levodopa

therapy was obtained (500 mg/day) without motor complications. The UPDRS-III score under treatment was 20 and Hoehn and Yahr stage was 1.5 after 3 years of disease progression. As her brother, no sensory, sleep nor autonomic dysfunctions, or psychiatric disorders were reported. No history of epileptic seizures was found, but neuropsychological evaluation demonstrated a moderate cognitive impairment (MMSE = 21). Brain MRI was normal.

No other PD cases were found in this family. But, the interrogatory of the patient's mother revealed that she had a son who developed generalized clonic seizures since the first month of life. He had delayed developmental milestones. Brain MRI showed brain atrophy and diffuse T2-hyperintensity of the white matter. He died at the age of 3 years after convulsive status epilepticus.

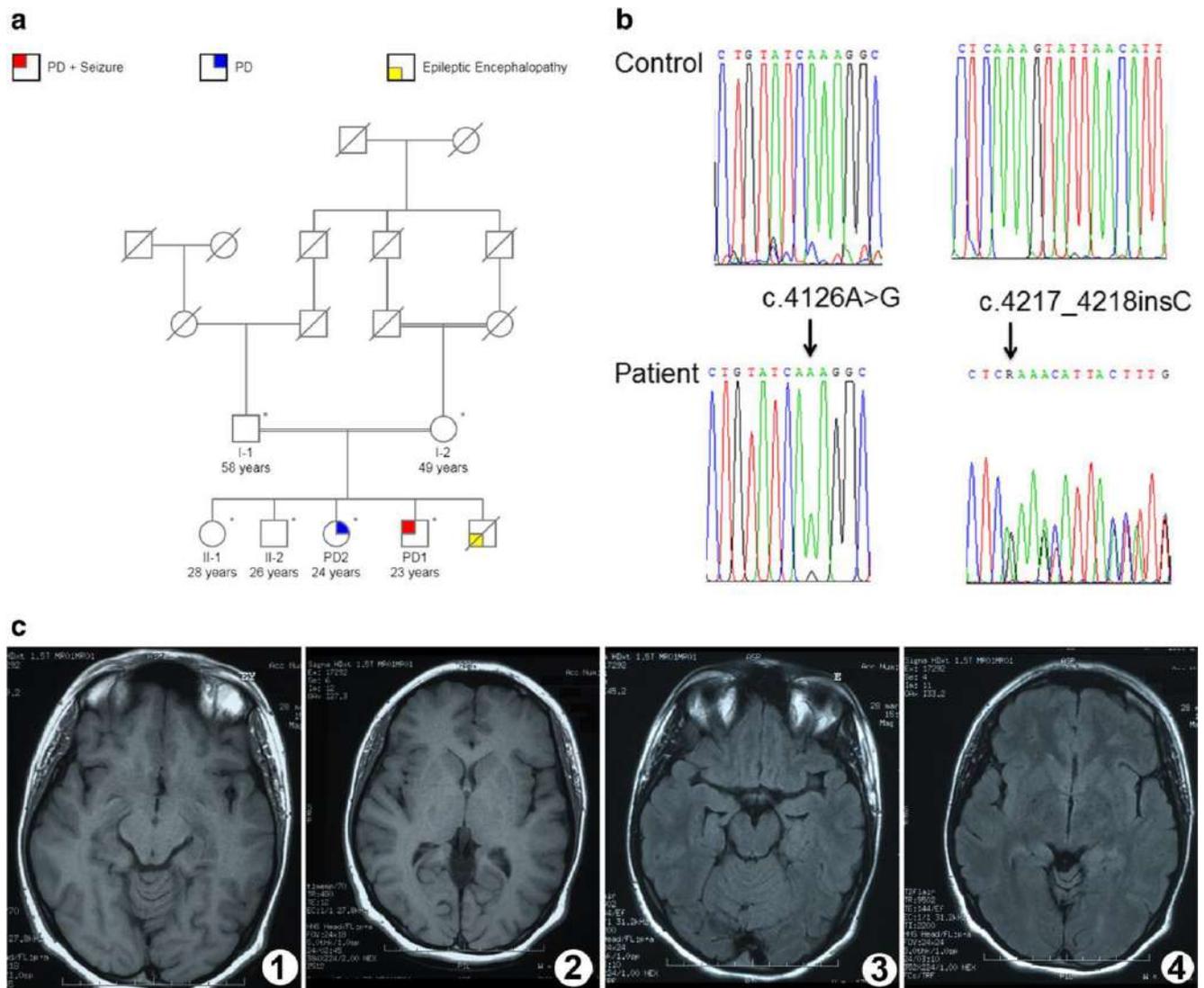


Fig. 1 a Pedigree of the family with juvenile Parkinson disease. b Sequence chromatograms from Sanger sequencing showing the c.4126A>G/p.Lys1321Glu and c.4217_4218insC/p.Leu1406Phefs*42 mutations in SYNJ1 gene in the studied patient (on the bottom) and

their absence in the controls (on the top). c Axial T1 (1,2) and T2 Flair (3,4) weighted MRI sequences showing normal appearance of brain parenchyma, basal ganglia, and mesencephalon

Molecular analysis revealed that both siblings with juvenile Parkinsonism in this family have shared a novel compound mutation in *SYNJ1* gene (NM_003895.3/XP_005261132.1): c.4217_4218insC and c.4126A>G (Fig. 1). No other rare deleterious variation at the homozygous or the heterozygous state was identified in all studied panel genes. The results showed the presence of the c.4217_4218insC mutation at the hetero-zygous state in the proband I.1, while the mother (proband I.2) carried the mutation c.4126A>G at the heterozygous state (Fig. 1). These mutations were absent in the two non-affected siblings (II-1 and II-2) and in other 77 early-onset Tunisian PD cases previously screened for mutations in all 22 PD-associated genes (unpublished data).

The c.4217_4218insC mutation (rs761852713) cause a premature stop variant (p.Leu1406Phefs*42) located in the AP2 binding domain mutation (Fig. 2).

The c.4126A>G mutation (rs752478437) was reported in only one European case at the heterozygous state (allele frequency in ExAC: 8.24e-06). This mutation substitutes a conserved hydrophilic basic amino acid (Lys) at position 1321 to an acidic amino acid (Glu) in the PRD of the *SYNJ1*-170 isoform (Fig. 1). Bioinformatics tools were used to predict whether this latter mutation (p.Lys1321Glu) could potentially affect the protein properties and structure. The p.Lys1321Glu was predicted to be deleterious by SIFT and Mutation Taster. The models of both wild-type and mutant protein were

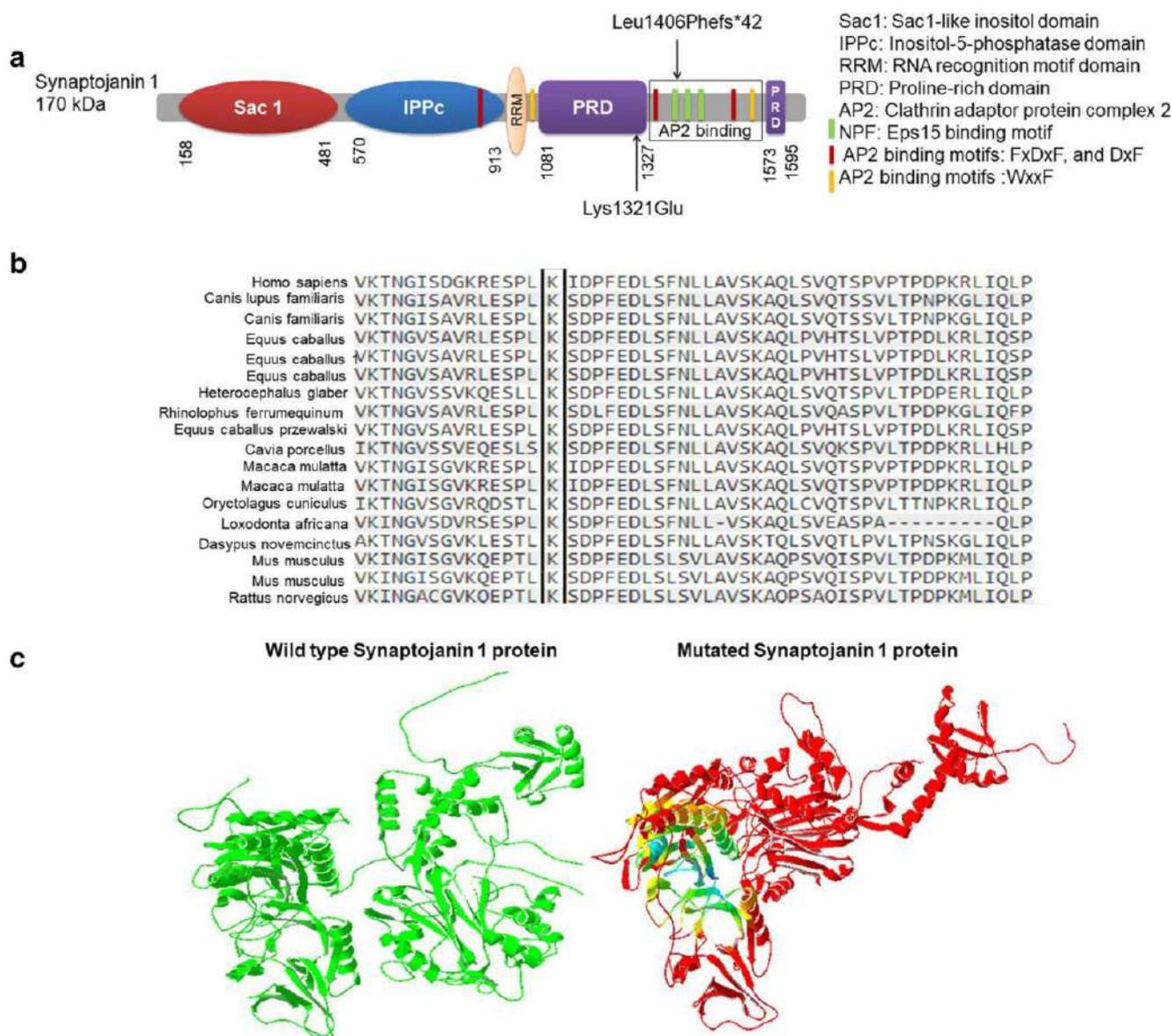


Fig. 2 a Molecular structure of Synaptojanin 1 and location of each mutation on the protein. b Alignment of the Synaptojanin 1 protein in different species showing the conservation of the residue 1321; the mutated amino acid is framed. c 3D structure of the Synaptojanin 1

protein obtained by BDeepView/Swiss PDB Viewer 3.7^A software showing the difference between the wild-type and the p.Lys1321Glu-mutated protein (red color shows the most significant root mean square deviation RMSD of atomic positions)

analyzed using the DeepView/Swiss PDB Viewer 3.7 program, and the root mean square value (RMS) calculated between backbone atoms was very significant (12.58 Å) (Fig. 2).

Discussion

In this study, we performed a screening of 22 PD-related genes in one consanguineous Tunisian family with autosomal recessive juvenile PD associated with generalized epilepsy. This screening revealed a first-described compound heterozygous mutation in *SYNJ1* gene (p.Leu1406Phefs*42 and p.Lys1321Glu). The p.Lys1321Glu mutation, located in the PRD, leads to a significant change in the 3D structure of the protein. This domain binds to cognate SH3 domain of endophilin and amphiphysin. The endophilin recruits *SYNJ1* to endocytic sites to promote dephosphorylation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphates (Soda et al. 2012).

On the other hand, the p.Leu1406Phefs*42 mutation disrupts the AP2 binding sites and subsequently disables protein-protein interactions of the *SYNJ1*-170 isoform. In fact, unlike the 145 kDa splice variant, the 170 kDa isoform bears an additional C-terminal tail that contains binding sites for clathrin (AP2) via three binding motifs (WxxF, FxDxF, and DxF), and for the epidermal growth factor receptor pathway substrate 15 (Eps15) via asparagine-proline-phenylalanine (NPF) domain (Praefcke et al. 2004; Krauß and Haucke 2007) (Fig. 2). This motif has been found to be the core of the binding site for the Eps-homology (EH) domains of Eps15 (Haffner et al. 1997), which is necessary for clathrin-mediated endocytosis, as it plays a role in the endocyte-coated pits (CCPs) maturation (Schmid et al. 2006; Mettlen et al. 2009). Thus, the identified compound heterozygous mutation in *SYNJ1* gene may disturb clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis.

Our molecular results best correlate with clinical features of our patients who developed juvenile PD with infantile epilepsy in one case. Interestingly, this mutation causes a milder phenotype with a good response to levodopa treatment and no dyskinesia or motor fluctuations. This observation was in discordance with most studies, where patients carrying *SYNJ1* mutations had poor amelioration after levodopa treatment and in one case it worsened the oromandibular and limb dystonia. According to these findings, we suggest that mutations in the C-terminal domain of Synaptojanin 1 protein are responsible for less severe phenotype than mutations in SAC1-like and inositol-5-phosphatase domains. In fact, it has been noted that the pathophysiological consequences of *SYNJ1* mutations may lead to different phenotypes (Puschmann 2017). In general, mutations causing PD were identified in the SAC1-like domain of the protein and impair the Sac1 phosphatase activity targeting phosphatidylinositol monophosphate (Krebs et al. 2013; Olgiati et al. 2014; Kirola et al. 2016). Whereas,

mutations that affect the inositol-5-phosphatase domain and cause a critical reduction of the dual phosphatase activity underlies a more severe epileptic syndrome (Dyment et al. 2015; Hardies et al. 2016; Taghavi et al. 2018).

In addition, phenotypic variability was observed in our cases presenting the same *SYNJ1* mutation. The first case developed generalized tonic-clonic seizures but not his sister that presented supranuclear vertical gaze palsy. However, both siblings presented a moderate cognitive impairment. This particular phenotype was also reported in previous studies on three consanguineous families from Sicily, Iran, and Southern Italy with the same homozygous mutation c.773G>A (p.R258G) (Krebs et al. 2013; Quadri et al. 2013; Olgiati et al. 2014) and one Indian family with c.1376C>G (p.R459P) mutation (Kirola et al. 2016).

The UPDRS III score was 35 after 7 years of evolution for the male case, but it was 21 after 3 years of evolution for his sister. This suggested that evolution was faster at the beginning of the disease, whereas it is slower at a later stage. This observation was in concordance with the previous study on clinical progression of *SYNJ1*-PD after 3 years follow-up of the original Italian family carrying the p.R258G mutation (Picillo et al. 2014).

In conclusion, our results evidence the implication of a novel compound heterozygous mutation: p.Leu1406Phefs*42 and p.Lys1321Glu mutation; in the C-terminal domain of Synaptojanin 1 protein in autosomal recessive juvenile PD with generalized epilepsy and cognitive impairment. This mutation may lead to the deregulation in synaptic and vesicle endocytic recycling in neurons, since it disrupts the AP2 binding sites and subsequently disables clathrin and Eps15 binding. We also suggest that mutations in the *SYNJ1* C-terminal domain cause a milder phenotype with a good response to levodopa treatment and slower progression especially in adult age.

Acknowledgments The authors are grateful to the family for their cooperation and commitment to the study. The authors would like to acknowledge the valuable contribution of all the staff of the Department of Neurology of the University Hospital Habib Bourguiba, Sfax.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Di Paolo G, De Camilli P (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443:651–657. <https://doi.org/10.1038/nature05185>
- Dyment DA, Smith AC, Humphreys P, Schwartztruber J, Beaulieu CL, Bulman DE, Majewski J, Woulfe J, Michaud J, Boycott KM (2015) Homozygous nonsense mutation in *SYNJ1* associated with

- intractable epilepsy and tau pathology. *Neurobiol Aging* 36: 1222.e1–1222.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.005>
- Haffner C, Takei K, Chen H, Ringstad N, Hudson A, Butler MH, Salcini AE, di Fiore PP, de Camilli P (1997) Synaptojanin 1: localization on coated endocytic intermediates in nerve terminals and interaction of its 170 kDa isoform with Eps15. *FEBS Lett* 419:175–180. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01451-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01451-8)
- Hardies K, Cai Y, Jardel C, Jansen AC, Cao M, May P, Djémié T, Hachon le Camus C, Keymolen K, Deconinck T, Bhambhani V, Long C, Sajan SA, Helbig KL, AR working group of the EuroEPINOMICS RES Consortium, Suls A, Balling R, Helbig I, de Jonghe P, Depienne C, de Camilli P, Weckhuysen S (2016) Loss of SYNJ1 dual phosphatase activity leads to early onset refractory seizures and progressive neurological decline. *Brain* 139:2420–2430. <https://doi.org/10.1093/brain/aww180>
- Houlden H, Singleton AB (2012) The genetics and neuropathology of Parkinson's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 124:325–338. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1013-5>
- Kirola L, Behari M, Shishir C, Thelma BK (2016) Identification of a novel homozygous mutation Arg459Pro in SYNJ1 gene of an Indian family with autosomal recessive juvenile Parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord* 31:124–128. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.07.014>
- Krauß M, Haucke V (2007) Phosphoinositide-metabolizing enzymes at the interface between membrane traffic and cell signalling. *EMBO Rep* 8:241–246. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400919>
- Krebs CE, Karkheiran S, Powell JC, Cao M, Makarov V, Darvish H, di Paolo G, Walker RH, Shahidi GA, Buxbaum JD, de Camilli P, Yue Z, Paisán-Ruiz C (2013) The Sac1 domain of SYNJ1 identified mutated in a family with early-onset progressive Parkinsonism with generalized seizures. *Hum Mutat* 34:1200–1207. <https://doi.org/10.1002/humu.22372>
- Mani M, Lee SY, Lucast L, Cremona O, di Paolo G, de Camilli P, Ryan TA (2007) The dual phosphatase activity of synaptojanin1 is required for both efficient synaptic vesicle endocytosis and reavailability at nerve terminals. *Neuron* 56:1004–1018. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.10.032>
- Massano J, Bhatia KP (2012) Clinical approach to Parkinson's disease: features, diagnosis, and principles of management. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a008870. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008870>
- McPherson PS, Garcia EP, Slepnev VI et al (1996) A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature* 379:353–357. <https://doi.org/10.1038/379353a0>
- Mettlen M, Stoerber M, Loerke D, Antonescu CN, Danuser G, Schmid SL (2009) Endocytic accessory proteins are functionally distinguished by their differential effects on the maturation of clathrin-coated pits. *Mol Biol Cell* 20:3251–3260. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09-03-0256>
- Oligati S, De Rosa A, Quadri M et al (2014) PARK20 caused by SYNJ1 homozygous Arg258Gln mutation in a new Italian family. *Neurogenetics* 15:183–188. <https://doi.org/10.1007/s10048-014-0406-0>
- Perera RM, Zoncu R, Lucast L, de Camilli P, Toomre D (2006) Two synaptojanin 1 isoforms are recruited to clathrin-coated pits at different stages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19332–19337. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609795104>
- Picillo M, Ranieri A, Orefice G, Bonifati V, Barone P (2014) Clinical progression of SYNJ1-related early onset atypical parkinsonism: 3-year follow up of the original Italian family. *J Neurol* 261:823–824. <https://doi.org/10.1007/s00415-014-7270-6>
- Praefcke GJ, Ford MG, Schmid EM et al (2004) Evolving nature of the AP2 α -appendage hub during clathrin-coated vesicle endocytosis. *EMBO J* 23:4371–4383. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600445>
- Puschmann A (2013) Monogenic Parkinson's disease and parkinsonism: clinical phenotypes and frequencies of known mutations. *Parkinsonism Relat Disord* 19:407–415. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2013.01.020>
- Puschmann A (2017) New genes causing hereditary Parkinson's disease or parkinsonism. *Curr Neurol Neurosci Rep* 17:66. <https://doi.org/10.1007/s11910-017-0780-8>
- Quadri M, Fang M, Picillo M, Oligati S, Breedveld GJ, Graafland J, Wu B, Xu F, Erro R, Amboni M, Pappatà S, Quarantelli M, Annesi G, Quattrone A, Chien HF, Barbosa ER, The International Parkinsonism Genetics Network, Oostra BA, Barone P, Wang J, Bonifati V (2013) Mutation in the SYNJ1 gene associated with autosomal recessive, early-onset Parkinsonism. *Hum Mutat* 34: 1208–1215. <https://doi.org/10.1002/humu.22373>
- Ross CA, Smith WW (2007) Gene-environment interactions in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 13(Suppl 3): S309–S315. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(08\)70022-1](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(08)70022-1)
- Schmid EM, Ford MGJ, Burtey A, Praefcke GJK, Peak-Chew SY, Mills IG, Benmerah A, McMahon HT (2006) Role of the AP2 β -appendage hub in recruiting partners for clathrin-coated vesicle assembly. *PLoS Biol* 4:e262. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040262>
- Soda K, Balkin DM, Ferguson SM, Paradise S, Milosevic I, Giovedi S, Volpicelli-Daley L, Tian X, Wu Y, Ma H, Son SH, Zheng R, Moeckel G, Cremona O, Holzman LB, de Camilli P, Ishibe S (2012) Role of dynamin, synaptojanin, and endophilin in podocyte foot processes. *J Clin Invest* 122:4401–4411. <https://doi.org/10.1172/JCI65289>
- Taghavi S, Chaouni R, Tafakhori A, Azcona LJ, Firouzabadi SG, Omrani MD, Jamshidi J, Emamalizadeh B, Shahidi GA, Ahmadi M, Habibi SAH, Ahmadifard A, Fazeli A, Motallebi M, Petramfar P, Askarpour S, Askarpour S, Shahmohammadibeni HA, Shahmohammadibeni N, Eftekhari H, Shafiei Zarneh AE, Mohammadihosseinabad S, Khorrami M, Najmi S, Chitsaz A, Shokraeian P, Ehsanbakhsh H, Rezaeidian J, Ebrahimi Rad R, Madadi F, Andarva M, Alehabib E, Atakhorrami M, Mortazavi SE, Azimzadeh Z, Bayat M, Besharati AM, Harati-Ghavi MA, Omidvari S, Dehghani-Tafti Z, Mohammadi F, Mohammad Hossein Pour B, Noorollahi Moghaddam H, Esmaili Shandiz E, Habibi A, Taherian-Esfahani Z, Darvish H, Paisán-Ruiz C (2018) A clinical and molecular genetic study of 50 families with autosomal recessive parkinsonism revealed known and novel gene mutations. *Mol Neurobiol* 55:3477–3489. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0535-1>
- Tsujiyama Y, Guo S, Stolz LE, York JD, Hurley JH (2001) Specificity determinants in phosphoinositide dephosphorylation: crystal structure of an archetypal inositol polyphosphate 5-phosphatase. *Cell* 105:379–389

IV. Le gène *PINK1*

IV.1.1. Les mutations identifiées sur le gène *PINK1*

Les mutations sur le gène *PINK1* sont la deuxième cause la plus fréquente de la maladie de parkinson autosomique récessive à début précoce après le gène *PARK2*. Le gène *PINK1* code pour une sérine/thréonine kinase mitochondriale située dans l'espace inter membranaire [236]. Cette protéine a un rôle essentiel dans l'homéostasie des mitochondries en intervenant dans l'autophagie des mitochondries endommagées ou dépolarisées [237].

Dans notre cohorte, 3 mutations connues ont été identifiées à l'état homozygote : p.Q129fs*29, p.G440E et p.Q456* (identifiée chez 6 patients non apparentés). Les deux mutations p.Q129fs*29 et p.G440E ont été identifiées pour la première fois dans la population Tunisienne [409], alors que la mutation p.Q456* a été rapportée pour la première fois par Bonifati et al. chez un patient Italien [410]. Deux mutations hétérozygotes composites ont été également identifiées sur le gène *PINK1* : [duplication de l'exon 2 / p.R152W] et [p.T257I / p.L268V] (Figure 54). Ces variations co-ségrégent avec la MP dans ces familles et elles étaient prédites délétères par la plupart des outils de prédiction in silico (Tableau 23).

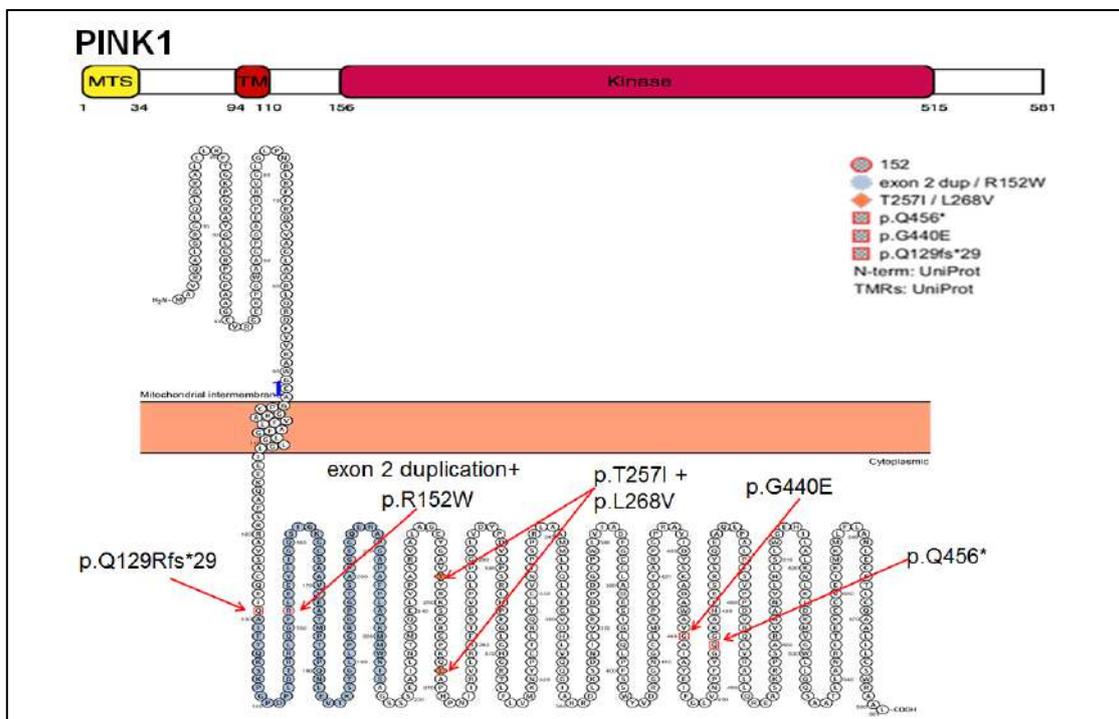


Figure 54. Ensemble de variations confirmées pathogènes identifiées à l'état homozygote ou hétérozygote composite sur le gène *PINK1*.

Tableau 23. Prédictions de la pathogénicité des variations exoniques identifiées sur le gène *PINK1* en utilisant différents outils de prédiction in-silico.

protein change	p.Q129fs*29	p. Q456* rs45539432	p.G440E rs45467995	p.R152W rs45608139	p.T257I	p.L268V
Freq in 1000G	–	0.0002	–	0.0002	–	–
Freq in Exac	–	0.00002	–	0.00002	–	–
Freq in gnomAD	–	0.00003	–	0.00002	–	–
ConSurf score	–	–	Score=9 buried structural residue	Score=3 exposed residue	Score=1 exposed residue	Score=7 exposed residue
Align GVGD	–	–	C0	C0	C0	C0
SIFT	–	–	Damaging	Damaging	Tolerated	Tolerated
Provean	–	–	Deleterious	Deleterious	Neutral	Neutral
Polyphen	–	–	Probably Damaging	Probably Damaging	Benign	Probably Damaging
MutTaster	–	–	Disease causing	Disease causing	Polymorphism	Disease causing
SNPs&GO	–	–	Disease	Disease	Neutral	Neutral
PMUT	–	–	Disease	Disease	Neutral	Neutral
Mut Pred	–	–	0.8	0.7	0.476	0.780

Sur le plan clinique, le phénotype des patients porteurs des mutations sur le gène *PINK1* était similaire, mais l'âge de début de la MP variait entre 29 et 60 ans. Ils présentaient souvent des caractéristiques atypiques comme la dystonie au début de la maladie. Les symptômes non moteurs tels que les troubles neurovégétatifs, les troubles de sommeil et les troubles neuropsychiatriques, étaient fréquentes (Tableau 24). Mais les patients ont bien réagi à la lévodopa et la progression de la maladie était très lente. Ce phénotype était en corrélation avec les observations des études précédentes [409–414]. Cependant, le patient porteur de la mutation composite duplication de l'exon 2 / p.R152W a présenté une progression rapide de la maladie, des déficits cognitifs (MMSE: 20/30) et il n'a pas bien répondu à la lévodopa mais une bonne amélioration a été obtenue avec le trihexyphenidyle (artane) dans un an (Tableau 24).

Tableau 24. Caractéristiques démographiques et cliniques des patients porteurs des mutations sur le gène *PINK1*.

Mutation	p.Q129fs*29	p. Q456*	p.G440E	p.T257I + p.L268V	exon 2 Dup + p.R152W
Nombre de patients	PD-TN-79-09	6 Patients	PD-TU-16	PD-TU-58	PD_TN-111-11
Zygosité	HMZ	HMZ	HMZ	C HTZ	C HTZ
Facteurs démographiques et caractéristiques de la maladie					
Sexe	Mâle	5 mâles	Femelle	Femelle	Femelle
Autres cas de MP dans la famille	2	1/2	0	0	0
Niveau d'éducation (années)	3	4*	0	3	4
Age de début (années)	43	41* [29-60]	52	48	47
Durée de la MP (années)	26	17*	15	5	3
Dose de Lévodopa (mg)	750	900	750	750	375
Caractéristiques motrices					
Score UPDRS	16	45	68	30	20
Score Hoehn et Yahr	3	2	3	2	1
Phénotype de la MP	PIGD	All TD	PIGD	TD	TD
Caractéristiques non motrices					
Score MMSE	24	26	18	26	20
Déficiência cognitive	Non	50%	Oui	Non	Oui
Troubles neurovégétatifs	Oui	83.3%	Non	Non	Oui
Troubles de sommeil	Non	66.6%	Oui	Non	Non
Dépression	Non	33.3%	Non	Non	Non

HMZ : mutation à l'état homozygote, C HTZ : mutation à l'état hétérozygote composite, IN : Indeterminante, TD : tremor dominant, PIGD: postural instability gait disorder. * : moyenne des scores des 6 patients porteurs de la mutation p.Q456*.

IV.2. Analyse de l'effet fondateur de la mutation p.Q456*

La mutation p.Q456* a été détectée chez 6 patients non apparentés dans notre cohorte. Ces résultats suggèrent que cette mutation est une mutation fondatrice chez les patients Parkinsoniens d'origine Tunisienne. Pour la validation de cette hypothèse nous avons génotypé l'haplotype porteur de cette mutation chez tous les patients porteurs de cette mutation. Ensuite pour identifier l'origine ethnique de l'ancêtre commun porteur de cette mutation, nous avons analysé les marqueurs des différents haplogroupes du chromosome Y chez les 5 patients mâles. Ces analyses ont montré que la mutation p. Q456* est portée sur le même haplotype couvrant 281 Kb chez tous les porteurs (Tableau 25).

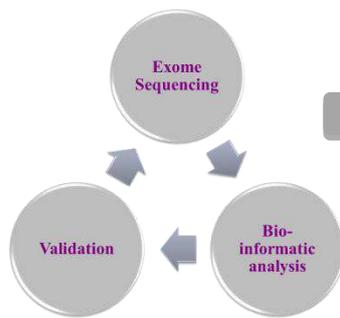
Ces résultats suggèrent que cette mutation n'est pas le résultat d'événements mutationnels indépendants, mais le résultat d'un même changement nucléotidique survenant chez un

ancêtre commun de tous les porteurs en Tunisie. Cela a été également supporté par le fait que cette mutation était rapportée chez sept autres patients tunisiens non apparentés [409]. Malheureusement, ayant un nombre limité de porteurs dans notre cohorte, nous ne pouvions pas dater cet événement fondateur. Par contre nous avons trouvé que tous les patients mâles (5 patients) portaient sur leur chromosome Y l'ensemble des SNP du sous-clade E1B1B1B (YAP/PN2/M215/M35/M81) représentatif de l'origine berbère, suggérant que la mutation p.Q456* aurait pu survenir chez un ancêtre commun d'origine berbère.

La fréquence beaucoup moins élevée de la mutation p.Q456* par rapport à celle de la mutation p.G2019S sur le gène *LRRK2* peut indiquer qu'elle a un âge plus précoce mais vu la différence de la nature de transmission entre les deux gènes (dominante pour *LRRK2* et récessive pour *PINK1*), cela reste incertain.

Tableau 25. Haplotype en commun entre les porteurs de la mutation p.Q456* à l'état homozygote.

Marqueur	Localisation	Distance	MAF	Haplotype
D1S2732	224-274 bps	339295		256-258pb
D1S3720	127-142	63320		127pb
rs45530340	g.20960230C>T	15372	22%	CC
rs148871409	g.20960385A>C	15217	14%	AA
rs2298298	g.20964328A>G	11274	17%	GG
rs115037254	g.20971999G>A	3603	7%	GG
rs3131713	g.20972048G>A	3554	17%	AA
rs3738136	g.20972111G>A	3491	12%	GG
rs45478900	g.20975105G>A	497	20%	GG
rs45539432	g.20975602C>T	0		TT
rs1043424	g.20977000A>C	1398	30%	AA
rs686658	g.20977221A>T	1619	16%	TT
rs513414	g.20977365C>G	1763	16%	GG
rs1043443	g.20977380T>C	1778	30%	TT
rs512550	g.20977449G>C/T	1847	47%	TT
rs1043502	g.20977748T>G	2146	30%	TT
rs8064	g.20977599C>G	1997	11%	CC
rs2078073	g.20977856T>C	2254	30%	TT
rs33999970	g.20977857_20977859dup	2255	34%	Ins/Ins
rs34361349	g.20977909_20977912dup	2307	13%	AA
rs1573132	g.20978024C>A	2422	30%	CC
rs674102	g.21023131C>G	47529	37%	GG
rs12135548	g.20757874G>A	217728	36%	GG
rs7512116	g.21501095C>A	525493	30%	CC/CA
D1S478	155-175	624003		176-179



Partie II

Recherche des nouveaux gènes candidats

Dans notre étude, parmi les 54 patients pour lesquels aucune mutation n'était identifiée, on a choisi 24 patients dont l'âge de début de la maladie est <40ans pour la recherche des nouveaux gènes impliqués dans la maladie de Parkinson par exome sequencing.

I. Exome sequencing et analyse bioinformatique

Pour chaque patient, environ 50000000 séquences ont été générées. Le pourcentage d'alignement était de 96% en moyenne, la profondeur moyenne était de 75X, la couverture moyenne était de 89% à 25X, l'ensemble témoignant un séquençage de bonne qualité.

Les variants détectés pour chaque patient ont été triés à l'aide du logiciel Polyweb en utilisant les filtres suivants dans un premier lieu (Figure 55):

- Variations à l'état homozygotes (pour les familles consanguines);
- Variations de perte de fonction d'abord (indels, SNVs non sens, SNVs au niveau des sites consensus d'épissage) puis les SNVs faux-sens prédits d'être délétères;
- Variations avec une fréquence allélique <1% rapportée dans les bases de données 1000GENOME, ESP, EXAC et TOPMED;
- Variations présentes dans les régions d'homozygoties identifiées par génotypage.

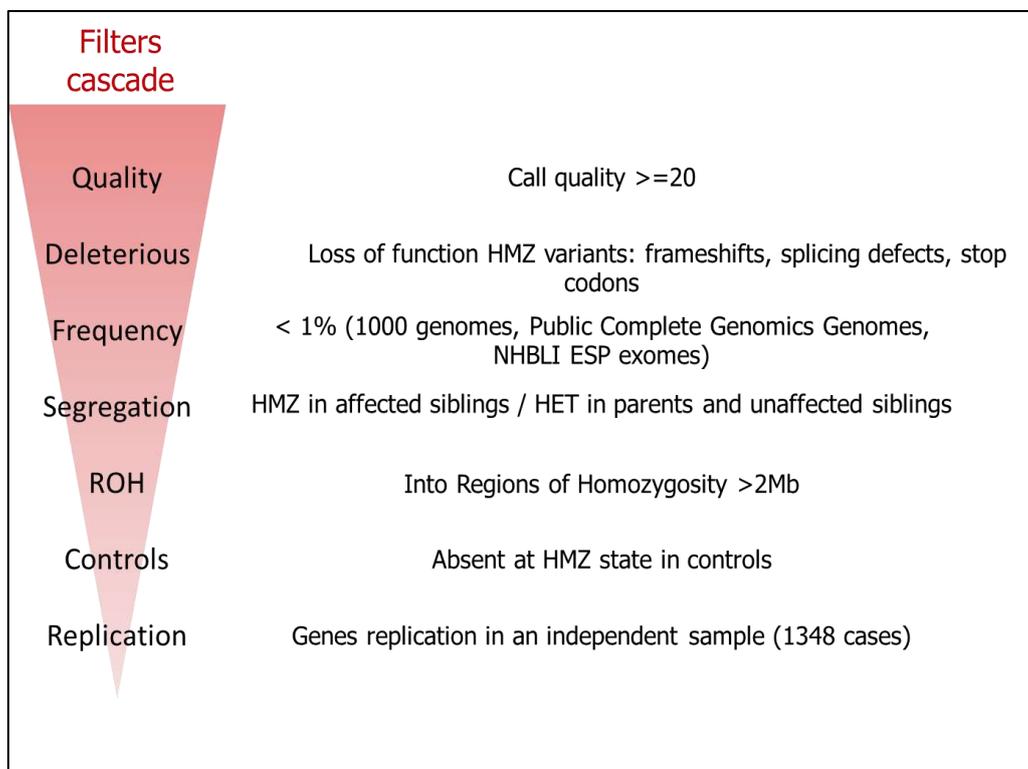


Figure 55. Filtres utilisés et stratégie d'analyse des résultats d'exome pour les familles consanguines.

Les gènes candidats ont été aussi priorisé par leur score Z fournit par la base de données EXAC. Pour les variations faux sens, les scores Z positifs indiquent une contrainte accrue (intolérance à la variation) et donc que le gène a moins de variants que prévu. Les scores Z négatifs sont donnés aux gènes qui avaient plus de variations que prévu. Pour les variations de perte de fonction (LoF), il existe trois classes de tolérance de gènes à la variation de LoF: nulle (où la variation de LoF est complètement tolérée), récessive (où les LoF hétérozygotes sont tolérés), et haplo-insuffisant (où les LoF hétérozygotes ne sont pas tolérés). Plus le score pLI est proche de 1, plus le gène semble être intolérant au LoF. Un gène avec un $pLI > 0.9$ est considéré comme gène extrêmement intolérant aux variations de perte de fonction.

Cette stratégie d'analyse nous a permis d'identifier un nombre restreint des variations sur seulement 19 gènes candidats (Figure 56). Les patients pour lesquels aucun gène candidat n'a été identifié, la recherche des variations à l'état hétérozygotes ou hétérozygotes composites dans les gènes susceptible d'être impliqué dans la maladie de Parkinson ou d'autres maladies neurodégénératives associé au parkinsonisme a été entamée.

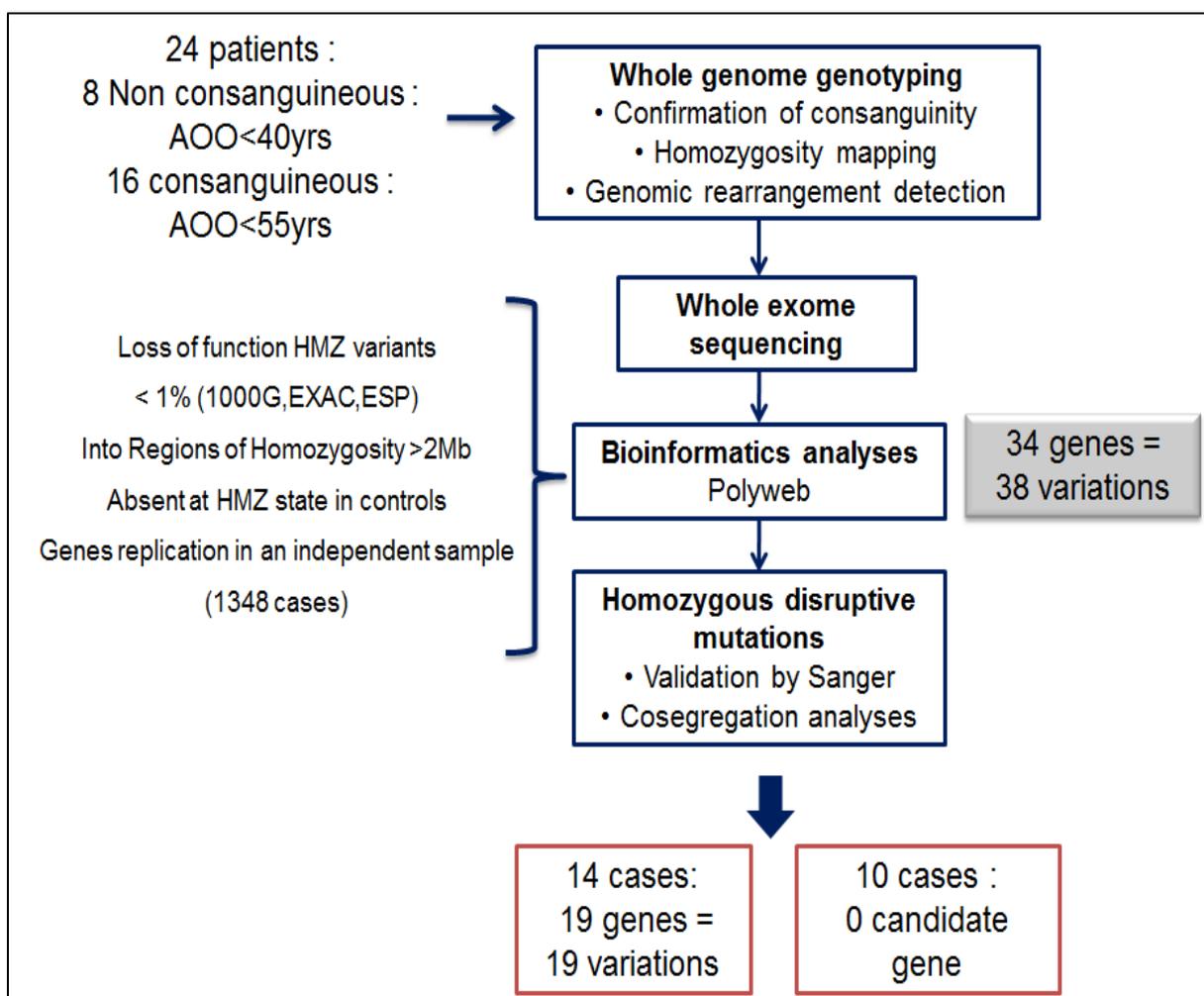


Figure 56. Analyse des résultats d'exome et identification des gènes candidats.

Tableau 26. Les variations identifiées à l'état homozygote après analyse des résultats d'exome

Patient	Gene	Variation	SIFT	P-2	M.T.	GVGD	1000G	EXAC	GnomAD	Conservation	Diff entre les aa	Domaine proteique
	ACADL											
22-11	Acyl-CoA Dehydrogenase, Long Chain	Ex6:c.722G>A p.Gly241Glu	D	D	DC	C65	4.956e-05	0.001	3.54e-5	Très conservé jusqu'à C. Elega	Important	Acyl-coa dehydrogenase/oxidase
	MAG											
22-11	Myelin Associated Glycoprotein	Ex8:c.1117A>C p.Ser373Arg	D	D	DC	C0	0.0004	0.0003	2.16e-4	Très conservé jusqu'à Tatou	Important	Immunoglobulin I-set
	ACAD11											
204-11	Acyl-coa Dehydrogenase Family Member 11	Ex10:c.1253C>G p.Pro418Arg	D	D	DC	C0	0.0026	0.0018	1.11e-3 7 hmz	Très conservé jusqu'à Poisson zèbre	Important	Acyl-coa dehydrogenase/oxidase
	ATAD3A											
PD-TU-34	Atpase Family, AAA Domain Containing 3A	EX7:c.790G>T p.Ala264Ser	D	D	DC	C0		0.0017	1.18e-3 2 hmz	Très conservé jusqu'à Tétrodon	Important	Atpase family AAA domain-containing protein 3
	BRE											
55-12	Brain And Reproductive Organ-Expressed	EX2:c.32C>G p.Ser11Cys	D	D	DC	C65	0.0010	0.0018	2.24e-3 2hmz	Très conservé jusqu'à Poisson zèbre	Important	
	DNAJB2											
55-12	Dnaj Heat Shock Protein Family	Ex5:c.238C>G p.Pro80Ala	T	P	P	C0	-	-	-	Moyennement conservé	Peu important	Heat shock protein dnaj

(Hsp40) Member B2												
PD-TU-10	SLC6A6 Solute Carrier Family 6 Member 6	EX5:c.524C>T p.Thr175Ile	D	D	DC	C65	--	-	-	Très conservé jusqu'à Poisson zèbre	Important	Sodium
PD-TU-33	MRPL53 Mitochondrial Ribosomal Protein L53	EX1:c.42A>T p.Lys14Asn	D	D	DC	C65	0.0002	6.36e-5	6.36e-5	Très conservé jusqu'à Poisson zèbre	Important	Proche domaine protéique
PD-TU-33	CACNA1S Calcium Voltage- Gated Channel Subunit Alpha1 S	EX34:c.4204T>C p.Phe1402Leu	D	D	DC	C15	-	-	-	Très conservé jusqu'à C. Elegans	Peu important	
PD-TU-34	KMO Kynurenine 3- Monooxygenase	Ex8:c.620C>T p.Ala207Val	D	D	DC	C0	-	-	-	Très conservé jusqu'à Levure de boulanger	Important	Monooxygenase, FAD-binding
PD-TU-34	CASP9 Caspase 9 apoptosis- related cysteine protease	EX2:c.151C>T p.Arg51Trp	D	D	DC	C0		4.61e-5	7.98e-6	Moyennement conservé	Important	Caspase, interleukin-1 beta convertase
PD-TU-59	ATP7B Atpase Copper Transporting Beta	Ex15:c.3275C>T p.Thr1092Met	T	B		C0		9.941e-05	9.97e-5	Moyennement conservé	Important	Atpase, P-type, heavy metal translocating
111-09	GLDC	Ex10:c.1331G>A p.Cys444Tyr	D	D	DC	C0	0.0030	0.0007496	7.42e-4 1hmz	Moyennement conservé	Très important	Pyridoxal phosphate-

												dependent transférase
111-09	Glycine Decarboxylase KLHL14 Kelch Like Family Member 14	Ex2:c.699G>C p.Glu233Asp	D	D	DC	C0		5.773e-05	3.69e-4	Très conservé jusqu'à Poisson zèbre	Peu important	BTB/Kelch- associated
197-11	SATL1 Spermidine/Sp ermine N1-Acetyl Transférase-Like 1	Ex2:c.1656T>A p.Cys552*	-	-	-	-	-	-	-			
200-11	IDE Insulin Degrading Enzyme	Ex18:c.2164C>T p.Arg722Trp	D	D	DC	C0	0.00008	3.305e-05	4.7e-5	Moyennement conservé	Important	
218-11	ARMCX3 Armadillo Repeat Containing, X-Linked 3	Ex6:c.136G>C p.Val46Leu+new splice site	T	D	DC	C0	-	0.000684	7.17e-4			
218-11	MAN2B2 Mannosidase Alpha Class 2B Member 2	Ex5:c.583C>T p.Arg195*	-	-	-	-	-	8.269e-06	2.79e-5			

Tableau 27. Les gènes candidats validés et leurs fonctions

Gene	Proteine localisation	Fonction	Mouse Genome Informatics MGI	Associated Disorders
ACADL Acyl-coa Dehydrogenase, Long Chain Ex6:c.722G>A p.Gly241Glu	Mitochondrion	Long-chain-acyl-coa + electron-transfer flavoprotein = long-chain-2,3-dehydroacyl-coa + reduced electron-transfer flavoprotein.	Homozygous mutation of this gene results in reduced litter size, sudden death between 2-14 weeks of age, reduced serum glucose levels, lipid accumulation in the liver and heart, and cardiomyopathy.	Acyl-coa dehydrogenase very long-chain deficiency (ACADVLD) [MIM:201475]: An inborn error of mitochondrial fatty acid beta-oxidation which leads to impaired long-chain fatty acid beta-oxidation
MAG Myelin Associated Glycoprotein Ex8:c.1117A>C p.Ser373Arg	Plasma membrane	Myelin associated glycoprotein, expressed on oligodendrocytes in the CNS and Schwann cells in the peripheral nervous system, interacting with neuronal processes, sialoadhesin family, Ig superfamily	Homozygotes for targeted null mutations exhibit delayed CNS myelination, late myelin degeneration in peripheral nerves, hypomyelination of optic nerves, and subtle intention tremors.	Spastic paraplegia 75, autosomal recessive (SPG75) [MIM:616680]: a neurodegenerative disorder characterized by a slow, gradual, progressive weakness and spasticity of the lower limbs.
ACAD11 Acyl-coa Dehydrogenase Family Member 11 Ex10:c.1253C>G p.Pro418Arg	Mitochondrion	Acyl-coa dehydrogenase, that exhibits maximal activity towards saturated C22-coa		Néphronophthose 3: autosomal recessive disorder resulting in end-stage renal disease. It is characterized by polyuria, polydipsia, and anemia.
ATAD3A Atpase Family, AAA Domain Containing 3A EX7:c.790G>T p.Ala264Ser	Mitochondrion	Essential for mitochondrial network organization, mitochondrial metabolism and cell growth at organism and cellular level. May play an important role in mitochondrial protein synthesis. May also participate in mitochondrial DNA replication.	Mice homozygous for a gene trapped allele die around E7.5 exhibiting growth retardation, failure to gastrulate, and impaired development of the trophoblast lineage immediately after implantation.	

<p>BRE Brain And Reproductive Organ-Expressed EX2:c.32C>G p.Ser11Cys</p>	<p>Mitochondrion</p>	<p>May play a role in homeostasis or cellular differentiation in cells of neural, epithelial and germline origins. May also act as a death receptor-associated anti-apoptotic protein, which inhibits the mitochondrial apoptotic pathway.</p>	<p>Homozygous mutation of this gene results in abnormal pattern of movement of the limbs of animals, characterized by elements of progression, stability, speed and length over the ground</p>	
<p>DNAJB2 Dnaj Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member B2 Ex5:c.238C>G p.Pro80Ala</p>	<p>Nucleus</p>	<p>DNAJB2 isoform reduced aggregation of mutant SOD1 in motor neuron-like cells. DNAJB2 has a neuroprotective effect in motor neurons.</p>		<p>Charcot-Marie-Tooth disease 2T/Distal spinal muscular atrophy, autosomal recessive, 5</p>
<p>SLC6A6 Solute Carrier Family 6 Member 6 EX5:c.524C>T p.Thr175Ile</p>	<p>Cytosol</p>	<p>Solute carrier family 6,member A6,neurotransmitter transporter,taurine</p>	<p>Homozygous mutant mice have impaired vision associated with retinal degeneration.</p>	
<p>MRPL53Mitochondrial Ribosomal Protein L53 EX1:c.42A>T p.Lys14Asn</p>	<p>Plasma membrane</p>	<p>Mitochondrial translation and Organelle biogenesis and maintenance.</p>		
<p>CACNA1S Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 S EX34:c.4204T>C p.Phe1402Leu</p>	<p>Mitochondrion</p>	<p>Voltage-sensitive calcium channels (VSCC) mediate the entry of calcium ions into excitable cells and are also involved in a variety of calcium-dependent processes, including muscle contraction, hormone or neurotransmitter release, gene expression,</p>	<p>Homozygous mutants show edema and failure of myoblast differentiation by day 13 of embryonic development and die perinatally. Some indication of occasional degeneration of spinal ganglia neurons at late stages of gestation, however most</p>	<p>Episodes of muscle weakness associated with elevated levels of potassium in the blood/rigidity/Periodic Paralysis with Transient Compartment-Like Syndrome/Hypokalemic Periodic Paralysis, Type 1(dominant)</p>

		cell motility, cell division and cell death.	neurons appear normal	
KMO Kynurenine 3-Monooxygenase Ex8:c.620C>T p.Ala207Val	Plasma membrane/endoplasmic reticulum	Required for synthesis of quinolinic acid, a neurotoxic NMDA receptor antagonist and potential endogenous inhibitor of NMDA receptor signaling in axonal targeting, synaptogenesis and apoptosis during brain development.	Mice homozygous for a knock-out allele lack kynurenine 3-monooxygenase activity and altered levels of several tryptophan metabolites	Metabolites in the kynurenine pathway are thought to play an important role in neurodegenerative disorders, including Alzheimer (AD; 104300) and Huntington (HD; 143100) diseases.
CASP9 Caspase 9 apoptosis-related cysteine protease EX2:c.151C>T p.Arg51Trp	Extracellular/mitochondrion	Sequential activation of caspases plays a central role in the execution-phase of cell apoptosis.	Homozygous targeted mutants die perinatally with enlarged and malformed cerebrums caused by reduced apoptosis during brain development.	
ATP7B Atpase Copper Transporting Beta Ex15:c.3275C>T p.Thr1092Met	Cytosol/mitochondrion	involved in subcellular transport and copper efflux	Targeted disruption of the mouse gene results in copper accumulation in various organs, primarily the liver, kidney and brain, and a form of liver cirrhosis that resembles Wilson disease in humans and the 'toxic milk' phenotype in mice.	Wilson disease: An autosomal recessive disorder of copper metabolism in which copper cannot be incorporated into ceruloplasmin in liver, and cannot be excreted from the liver into the bile. Copper accumulates in the liver and subsequently in the brain and kidney. The disease is characterized by neurologic manifestations and signs of cirrhosis.
GLDC Glycine Decarboxylase Ex10:c.1331G>A p.Cys444Tyr	Endosome/golgi apparatus/mitochondrion	The glycine cleavage system catalyzes the degradation of glycine.	Homozygous mutants show abnormal neural tube morphology, exencephaly, hydroencephaly and enlarged brain ventricles	Agenesis of corpus callosum/Aggressive behavior/Glycine Encephalopathy

KLHL14 Kelch Like Family Member 14 Ex2:c.699G>C p.Glu233Asp	Mitochondrion/nucleus	Its is known as printor (protein interactor of torsinA) and selectively binds to the ATP-free form, but not to the ATP-bound form of torsinA, suggesting a role for printor as a cofactor rather than a substrate of the AAA+ protein torsinA		Dystonia
SATL1 Spermidine/Spermine N1-Acetyl Transferase-Like 1 Ex2:c.1656T>A p.Cys552*	Endoplasmic reticulum/cytosol	N-acetyltransferase activity		
IDE Insulin Degrading Enzyme Ex18:c.2164C>T p.Arg722Trp	Cytosol/nucleus	Plays a role in the cellular breakdown of insulin, IAPP, glucagon, bradykinin, kallidin and other peptides, and thereby plays a role in intercellular peptide signaling. Degrades amyloid formed by APP and IAPP.	Mice homozygous for a disruption of this gene display beta amyloid accumulations in the brain, hyperinsulinemia and glucose intolerance.	Alzheimer's disease
ARMCX3 Armadillo Repeat Containing, X-Linked 3 Ex6:c.136G>C p.Val46Leu	Cytosol/extracellular/mitochondrion/nucleus/peroxisome	Regulates mitochondrial dynamics and trafficking in neurons.		
MAN2B2 Mannosidase Alpha Class 2B Member 2 Ex5:c.583C>T p.Arg195*	Mitochondrion/nucleus	Hydrolysis of terminal, non-reducing alpha-D-mannose residues in alpha-D-mannosides.	Homozygous mutants show small superior vagus ganglion	

Les α -mannosidases lysosomiales appartiennent à la famille des glycosides hydrolases 38 [415]. Les glycosides hydrolases 38 participent au catabolisme des glycanes des glycoprotéines liées à l'Asn et jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. La déficience de la α -mannosidase lysosomiale entraîne l'accumulation d'oligosaccharides non dégradés dans les lysosomes et, par conséquent, des symptômes compatibles avec la maladie de surcharge lysosomale [416–418].

La variation p.Arg195* avait une fréquence ExAC de 8.269e-06% et était présente seulement à l'état hétérozygote chez un seul cas. Cette variation provoque une protéine tronquée ce qui va altérer sa fonction enzymatique. Cela va entraîner l'accumulation d'oligosaccharides non dégradés riches en mannose dans les lysosomes affectant ainsi le cerveau, les viscères et d'autres tissus [419]. Cliniquement, les α -mannosidoses sont caractérisées par une détérioration neurologique progressive, différents degrés de retard mental, de dysostose multiplexe et de viscéralgie. En plus du stockage lysosomal primaire des oligosaccharides riches en mannose, une accumulation secondaire de gangliosides GM2 et GM3 et de nombreux changements cytopathologiques affectant l'intégrité neuronale, y compris la dendritogenèse ectopique, la formation de sphéroïdes axonaux et des anomalies de myélinisation, ont été documentés dans l' α -mannosidose féline [420–423].

Chez les animaux modèles, cette détérioration neurologique est progressive, augmente avec l'âge et indique une pathologie généralisée du SNC. Les tremblements corporels et l'ataxie étaient visibles de 7 à 10 mois, ce qui suggère des anomalies cérébelleuses. Une surdité déterminée par des réponses évoquées du tronc cérébral auditif a également été observée entre 5 et 10 mois [419]. Chez les souris les mutations au niveau du gène *MAN2B2* provoquent la diminution de la taille du ganglion vague supérieur.

Le patient porteur de la mutation p.Arg195* sur le gène *MAN2B2*, a été diagnostiqué à l'âge de 40 ans d'un phénotype tremblant (TD) d'une MP typique. Il a présenté une akinésie, une rigidité et un tremblement de repos au niveau du bras droit sans instabilité posturale. Il a été traité avec un traitement dopaminergique à 375 mg par jour, avec une très bonne réponse et sans aggravation motrices ni dyskinésies. Neuf ans après l'apparition de la maladie, la réponse au traitement est encore bonne. La progression était très lente (UPDRS-III= 9/108, stade Hoehn and Yahr = 2) Il n'a pas développé des troubles cognitifs (MMSE=30/30), ni des troubles de sommeil ou neurovégétatifs. Cependant, l'évaluation psychiatrique a révélé des troubles psychiatriques sévères.

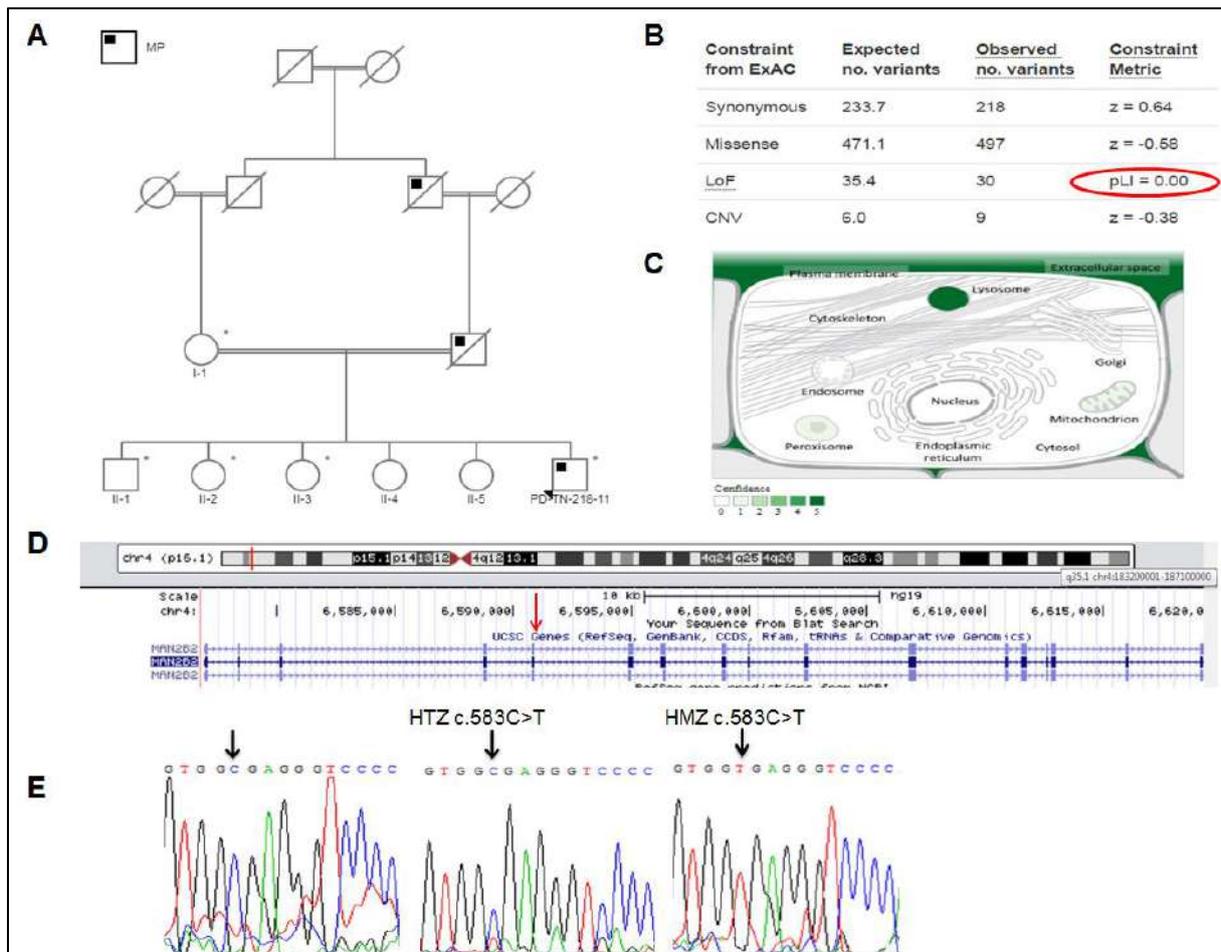


Figure 58. Variation identifiée sur le gène MAN2B2.

(A) Pedigree de la famille PD-TN-218-11. (B) Nombre de variations identifiées sur le gène MAN2B2 et son LoF score dans la base de donnée EXAC. (C) localisation de la protéine MAN2B2. (D)

Localisation chromosomique du gène MAN2B2, sa structure et localisation de la variation c.583C>T/p.Arg195*. (E) Electrophérogrammes montrant la variation c.583C>T identifiée sur le gène MAN2B2 à l'état homozygote chez le patient, à l'état hétérozygote chez la mère et une sœur et son absence chez les autres membres de la famille.

II.2. Le gène ATAD3A : p.Ala264Ser

La même variation (rs2767471) [exon 7: g.1520272G>T, c.790G>T, p.Ala264Ser] sur le gène *ATAD3A* a été identifiée à l'état homozygote chez deux familles consanguines non apparentées. *ATAD3A* est situé sur le bras court du chromosome 1 très proches des télomères (1p36.33) [Chromosome 1: 1,447,523-1,470,067 (GRCh37)]. Il s'étend sur 22,545 pb et il est composé de 16 exons codants (2612 pb) pour une protéine de 634 acides aminés. Ce gène code pour une protéine membranaire mitochondriale exprimée de façon omniprésente qui contribue à la dynamique mitochondriale, à la traduction des protéines, à la croissance cellulaire et au métabolisme du cholestérol [424]. Ce gène est un membre de la famille des

gènes de la famille des ATPase contenant le domaine AAA 3A qui, chez l'homme, comprend deux autres paralogues (ATAD3B et ATAD3C).

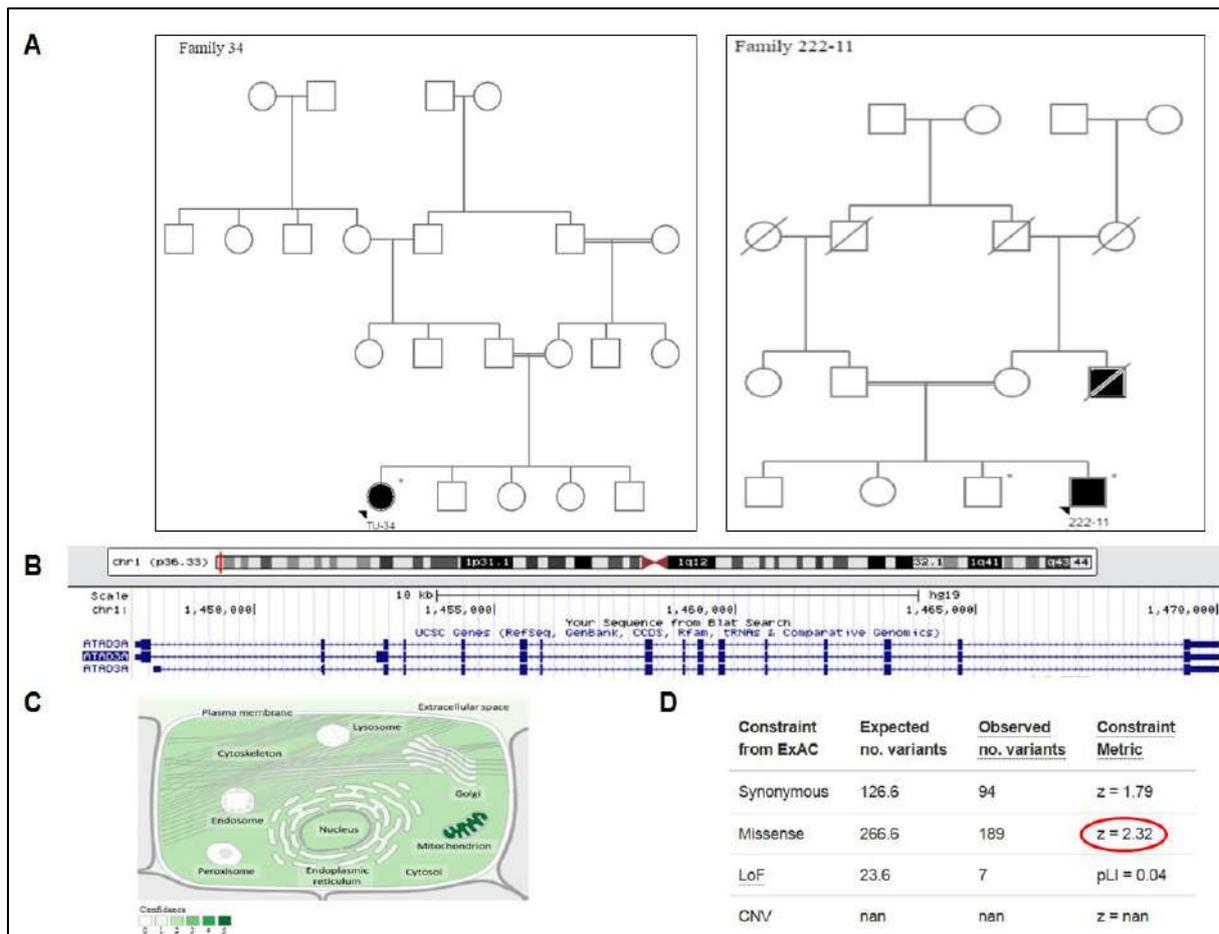


Figure 59. Variation identifiée sur le gène *ATAD3A*.

(A) Pedigree des deux familles PD-TN-222-11 et PD-TU-34. (B) Localisation chromosomique du gène *ATAD3A* et ses transcrits. (C) localisation de la protéine *ATAD3A*. (D) Nombre de variations identifiées sur le gène *ATAD3A* et son z score dans la base de donnée EXAC.

La protéine *ATAD3A* est composée de deux domaines coil-coils du côté N-terminal, d'un domaine d'adressage à la mitochondrie proche du domaine transmembranaire ainsi que d'un domaine C-terminal contenant le domaine ATPase. Le domaine N-terminal interagit avec la membrane mitochondriale externe[425]. Les interactions dynamiques entre les éléments des membranes externe et interne contrôlent un certain nombre de fonctions mitochondriales importantes comme le transfert de métabolites, la fission et la fusion. *ATAD3A* interagit avec les protéines de fission (Drp1) et l'inhibition de l'activité ATPase provoque la fission du réseau mitochondrial [426]. L'influence d'*ATAD3A* sur les fonctions mitochondriales essentielles suggère que cette protéine possède des propriétés uniques qui lui permette réguler les dynamiques mitochondriales et leurs fonctions dans les organismes multicellulaires [425, 427].

La perturbation du réseau mitochondrial lors de l'inhibition d'*ATAD3A* confirme qu'il joue un rôle vital dans l'équilibre métabolique de l'organisme. Une inactivation homozygote du gène orthologue chez la souris entraîne une létalité embryonnaire au jour 7.5 en raison du retard de croissance et du développement défectueux de la lignée trophoblastique. Les mutations sur ce gène sont associées à des syndromes neurologiques distincts, y compris le syndrome de Harel-Yoon[428] et la paraplégie spastique héréditaire dominante [429]. La mutation (c.1582C>T/p.Arg528Trp) sur le gène *ATAD3Aa* a été montrée de causer le syndrome de Harel-Yoon qui est un trouble neurologique caractérisé par un retard de développement psychomoteur, une déficience intellectuelle, une hypotonie tronculaire, une spasticité et une neuropathie périphérique [428].

La mutation (c.1064G > A/p.G355D) à l'état hétérozygote a récemment été trouvée de causer un syndrome neurologique avec retard de développement, hypotonie, spasticité, atrophie optique, neuropathie axonale et une cardiomyopathie hypertrophique [429].

Le gène *ATAD3A* possède une intolérance extrême aux variations faux-sens (score $z = 2.32$).

La mutation p.Ala264Ser identifiée a entraîné un changement d'alanine, un acide aminé aliphatique hydrophobe neutre, à un acide aminé polaire hydrophile neutre (différence physicochimique importante). L'alanine est modérément conservée, mais fortement conservée chez les mammifères situé au niveau du domaine catalytique Atpase family AAA domain-containing protein 3. Le changement a été prédit comme pathogène par les outils de prédiction in silico. Cette variation a une fréquence ExAC de 0.001 et elle était jamais décrite à l'état homozygote. Les modèles de la protéine sauvage et mutée ont été analysés à l'aide du programme DeepView / Swiss PDB Viewer 3.7 et la valeur de degré de déviation (RMSD) était significative (5.4 Å) (Figure 60).

La quantification de l'ADN mitochondrial chez les deux patients a révélé une légère diminution de la quantité relative de l'ADNmt de 15-20% par rapport aux témoins mais sans atteindre la déplétion de l'ADNmt. La réduction du nombre de copies de l'ADNmt (ou déplétion) à moins de 30% de la teneur normale en ADNmt est définie comme un appauvrissement en cet ADN. Cette déplétion est retrouvée dans un groupe hétérogène de maladies mitochondriales sévères et habituellement mortelles dans la petite enfance et l'enfance[430]. Ces résultats suggèrent l'effet pathogène de la mutation identifiée sur le gène *ATAD3A* et sa potentielle implication dans la MP.

Les deux patients porteurs de cette mutation ont développé un MP typique avec un âge de début précoce (43 ans). Les deux patients ont présenté une akinésie, une rigidité et un

tremblement de repos asymétrique sans instabilité posturale. La réponse au traitement lévodopa était de 80% et sans aggravation motrices ni dyskinésies. Ils n'ont pas développé des troubles cognitifs (MMSE=29/30).

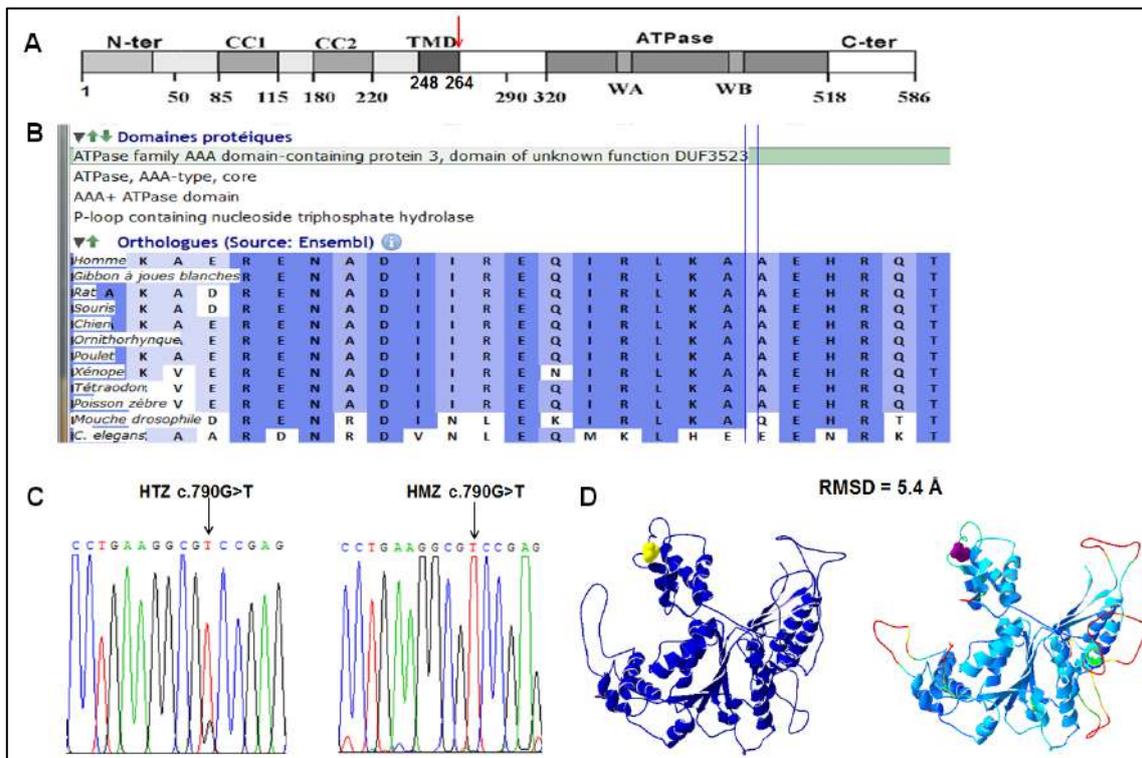


Figure 60. Analyse de la variation c.790G>T/p.Ala264Ser identifiée sur le gène *ATAD3A*. (A) Présentation de la protéine *ATAD3A*: coil-coil (CC1 & CC2), domaine transmembranaire (TMD), ATPase avec les séquences Walker A (WA) et Walker B (WB). (B) Alignement de la protéine *ATAD3A* dans différentes espèces montrant la conservation du résidu 264; l'acide aminé muté est encadré. (C) Electrophérogrammes montrant la variation c.790G>T identifiée sur le gène *ATAD3A* à l'état homozygote chez les deux patients et à l'état hétérozygote chez les autres membres de la famille. (D) structure 3D de la protéine *ATAD3A* obtenue par le logiciel 'DeepView / Swiss PDB Viewer 3.7' montrant la différence entre la protéine sauvage et la protéine mutée (la couleur rouge montre la position atomique avec le RMSD le plus significatif).

II.3. Le gène *IDE* : p.Arg722Trp

La variation (rs76587725) [exon 18: g.94230055G>A, c.2164C>T, p.Arg722Trp] sur le gène Insulin-Degrading Enzyme (*IDE*) a été identifiée à l'état homozygotes chez une famille consanguine. Dans cette famille deux autres gènes candidats ont été identifiés (CPS1 et ARMCX5) mais le seul qui coségrège avec la MP est le gène *IDE* ce qui le rend le candidat le plus convaincant. Cette mutation a entraîné la substitution de l'arginine à la position 722, un acide aminé polaire hydrophile chargé (+), en Tryptophane qui est un acide aminé aromatique hydrophobe neutre (différence physicochimique importante). L'arginine est modérément

conservée et cette variation a été prédite comme pathogène par les outils de prédiction in silico. Cette variation a une fréquence MAF =3.305e-05 sur ExAC, MAF=8e-05/1 sur GO-ESP et MAF =3e-05/1 sur TOPMED et elle était jamais décrite à l'état homozygote.

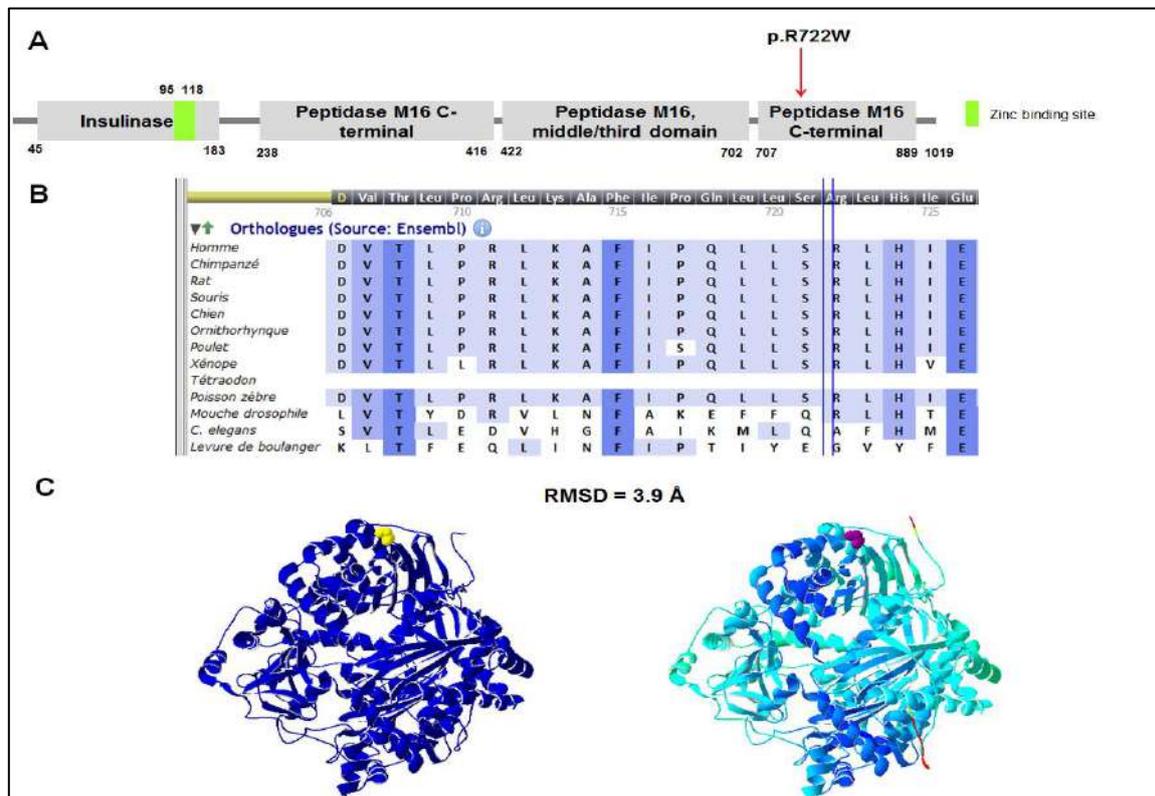


Figure 61. Analyse de la variation c.2164C>T/ p.Arg722Trp identifiée sur le gène IDE.

(A) Présentation de la protéine Insulin-Degrading Enzyme. (B) Alignement de la protéine IDE dans différentes espèces montrant la conservation du résidu Arginine 722; l'acide aminé muté est encadré.

(C) structure 3D de la protéine IDE obtenue par le logiciel 'DeepView / Swiss PDB Viewer 3.7' montrant la différence entre la protéine sauvage et la protéine mutée (la couleur rouge montre la position atomique avec le RMSD le plus significatif). La structure 3D a été fournie en utilisant la structure cristallisée de l'insulin-degrading enzyme Humaine (2G47).

Le gène *IDE* est situé sur le bras long du chromosome 10 (10q23.33) [Chromosome 10: 94 211 441-94 333 852 (GRCh37)]. Il est composé de 25 exons (119576pb) codant pour une protéine de 634 acides aminés (Figure 62). Ce gène code pour une métallo peptidase de 110-kD impliquée dans la dégradation de certain nombre de peptides [431]. L'épissage alternatif aboutit à plusieurs variants de transcription codant des isoformes distinctes [431]. Il joue un rôle dans la dégradation cellulaire de l'insuline, de l'IAPP, du glucagon, de la bradykinine, de la kallidine et d'autres peptides, et joue ainsi un rôle dans la signalisation des peptides intercellulaires. Il peut jouer un rôle dans la dégradation des protéines bêta-amyloïdes naturellement sécrétées par les neurones et la microglie [432, 433]. Cette protéine se localise

principalement dans le cytoplasme, mais dans certains types de cellules, elle se localise dans l'espace extracellulaire, la membrane cellulaire, le peroxyosome et la mitochondrie.

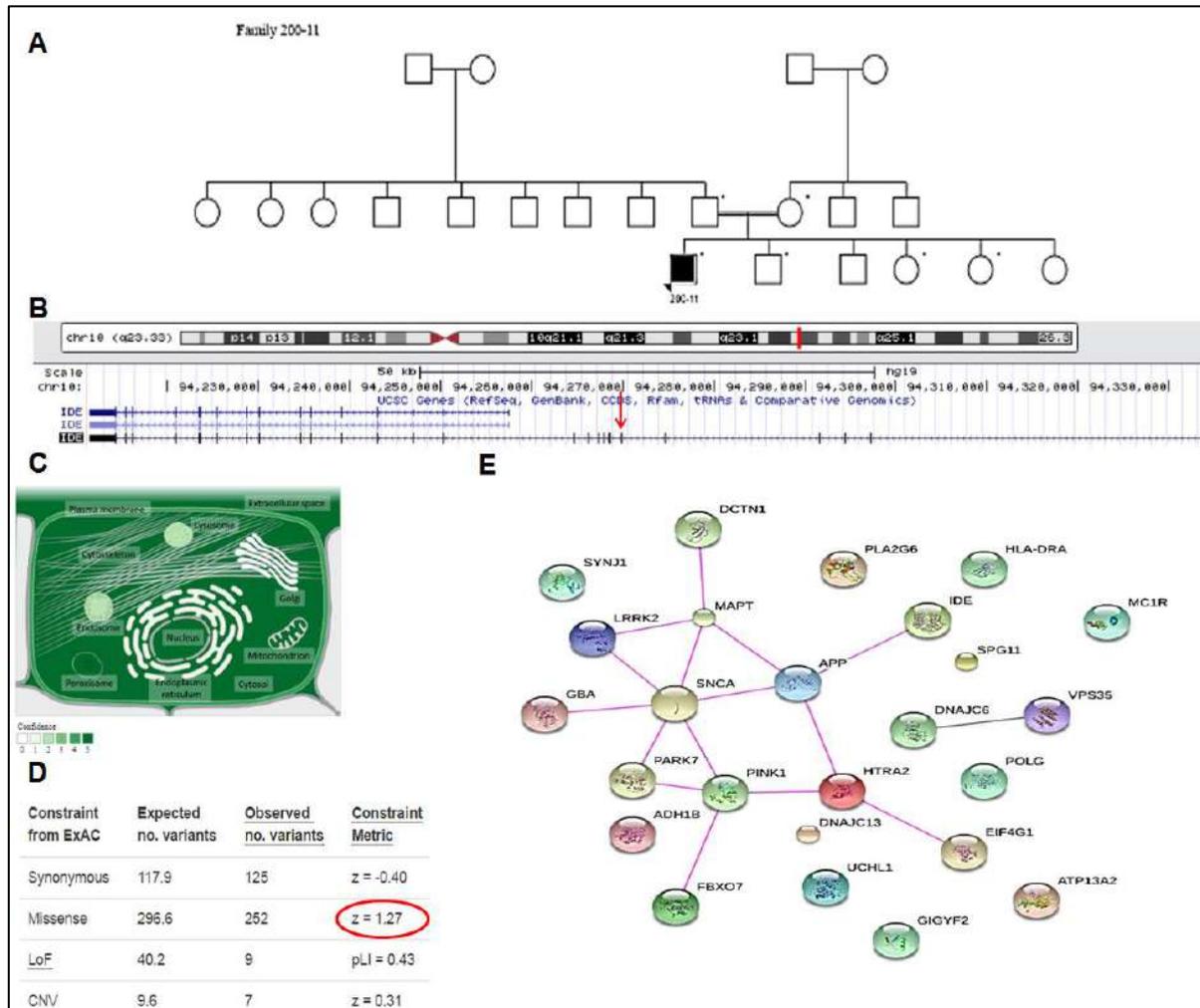


Figure 62. Variation identifiée sur le gène IDE.

(A) Pedigree de la famille PD-TN-200-11. (B) Localisation chromosomique du gène *IDE* et ses transcrits. (C) localisation de la protéine IDE dans la cellule. (D) Nombre de variations identifiées sur le gène *IDE* et son z score dans la base de donnée Exac.(E) interaction qui relie le gène *IDE* aux autres gènes impliqués dans la MP.

Les souris homozygotes pour une mutation sur ce gène présentent une accumulation de bêta-amyloïde dans le cerveau, une hyperinsulinémie et une intolérance au glucose. Ces facteurs qui augmentent les taux de peptide bêta-amyloïde sont associés à un risque accru de la maladie d'Alzheimer[434–436]. En effet, la β -amyloïde, générée à partir du clivage protéolytique de la protéine précurseur amyloïde (APP) [437], s'accumule dans les espaces intracellulaire et dans l'espace extracellulaire, conduisant à la formation de plaques amyloïdes[438–440]. Ce peptide composé de 39-43 acides aminés est le principal constituant de la plaque dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer [441].

L'analyse de l'interaction du gène *IDE* et les autres gènes impliqués dans la maladie de Parkinson a montré une interaction entre le gène *IDE* et le gène *SNCA* via le précurseur amyloïde (APP) (Figure 62). En effet, une étude *in vivo* récente a montré que la β -amyloïde favorise l'agrégation la α -synucléine. Cela suggère qu'un déficit dans le gène *IDE* qui provoque l'accumulation du β -amyloïde mal repliées pourrait contribuer à la pathogenèse de la maladie de Parkinson[442, 443].

II.4. Le gène *BRE* : p.Ser11Cys

La variation (rs144572761) [exon 2: g.28117455C>G, c.32C>G, p.Ser11Cys] sur le gène brain and reproductive organ-expressed TNFRSF1A modulator (*BRE*) a été identifiée à l'état homozygote chez une famille consanguine. Pour cette famille un autre gène candidat a été identifié (*DNAJB2*) qui est impliqué dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth disease 2T, mais la variation touche un acide aminé non conservé et elle a été prédite comme non délétère par la plupart des logiciels de prédiction *in-silico*. Cependant, la mutation p.Ser11Cys identifiée sur le gène *BRE* touche la sérine à la position 11 qui est très conservée jusqu'à Poisson zèbre. La différence physicochimique entre les deux acides aminés est importante (la sérine : un acide aminé hydrophiles hydroxylés, la cystéine : un acide aminé soufré). Cette substitution a été prédite comme pathogène par tous les logiciels de prédiction *in-silico* utilisés. La fréquence de cette variation est MAF= 0.002 sur la base de données ExAC et MAF= 0.001 sur la base 1000G et elle était jamais décrite à l'état homozygote. Dans notre cohorte de réplique de 1348 résultats d'exome, la même mutation p.Ser11Cys sur le gène *BRE* a été identifiée chez un patient d'origine française et une autre mutation qui crée un codant stop à l'état homozygote chez un patient Turc a été révélée sur le même gène.

Le gène *BRE* est situé sur le bras court du chromosome 2 (p23.3) [Chromosome 2: 27,888,709-28,338,900 (GRCh37)]. Il est composé de 13 exons (448,173pb) dont 11 sont codants pour une protéine de 383 acides aminés de 1.9kD. La protéine *BRE* est une protéine hautement conservée sur le plan évolutif, sans homologue chez la même espèce. Cette protéine anti-apoptotique interagit avec le récepteur de facteur de nécrose tumorale-1. La protéine codée agit comme un adaptateur dans plusieurs complexes protéiques, y compris le complexe BRCA1-A et le complexe BRISC. Le complexe BRCA1-A possède une activité ubiquitinase et cible les sites de cassures d'ADN double brin, tandis que le complexe BRISC présente une activité de deubiquitinase et il est impliqué dans l'assemblage du fuseau mitotique. Dans le complexe BRCA1-A, le gène *BRE* agit comme un adaptateur qui comble

l'interaction entre BABAM1 / NBA1 et le reste du complexe, ce qui est nécessaire pour l'intégrité du complexe et la modulation de l'activité ubiquitine ligase E3 (*PARK2*) [444, 445]. Les souris homozygotes pour un allèle knock-out sont fertiles. Cependant, les fibroblastes présentent une prolifération diminuée et une duplication cellulaire accrue en réponse à l'irradiation et au peroxyde d'hydrogène avec une altération de la réparation des dommages à l'ADN. Ainsi, il est probable que la surexpression de *BRE* améliore la survie tumorale grâce à son activité anti-apoptotique, plutôt que d'initier la formation de tumeurs.

La réduction de la teneur de l'ADNmt au niveau des cellules est habituellement causée par des défauts moléculaires dans les gènes responsables de la biogenèse et du maintien de l'intégrité de l'ADNmt ou dans la reconstitution de la réserve de désoxyribonucléoside triphosphate (dNTP) mitochondrial pour la synthèse de l'ADNmt. La quantification de l'ADN mitochondriale moyennant la PCR en temps réel et en utilisant comme gène cible le gène mitochondrial ND4 (NADH déshydrogénase 4), qui est localisé dans une région non polymorphe et stable, et le gène nucléaire GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Déshydrogénase) comme gène de ménage, nous a permis d'identifier une déplétion de l'ADNmt. Nous avons constaté une diminution importante de 40% de la quantité relative de l'ADNmt.

La patiente a développé un tremblement de la main droite particulièrement au repos associé à la rigidité des membres inférieurs et supérieurs résultant à des difficultés de marche à l'âge de 36 ans. Elle avait une allure lente et traînante avec une instabilité posturale. La progression de la maladie était très rapide. Après un an d'évolution de la maladie, l'examen neurologique a révélé un tremblement de repos bilatéral, une raideur axiale et une rigidité des quatre membres sévère. La réponse au traitement lévodopa était mauvaise et a induit des dyskinésies et des fluctuations motrices (phénomène ON/OFF). Les scores UPDRS-III et MMSE étaient non évaluables et le stade de Hoehn et Yahr était de 4.5 après 1 an de progression de la maladie. L'IRM a montré des anomalies dans la substance blanche du cerveau. En plus la patiente a développé un retard mental depuis le jeune âge. Ce phénotype particulier supporte les résultats de la PCR temps réel qui a révélé une déplétion mitochondriale. En fait la déplétion de l'ADNmt provoque un groupe hétérogène de troubles qui se manifeste cliniquement par des formes hépatocérébrales, des myopathiques, des cardiomyopathiques et des maladies neurodégénératives.

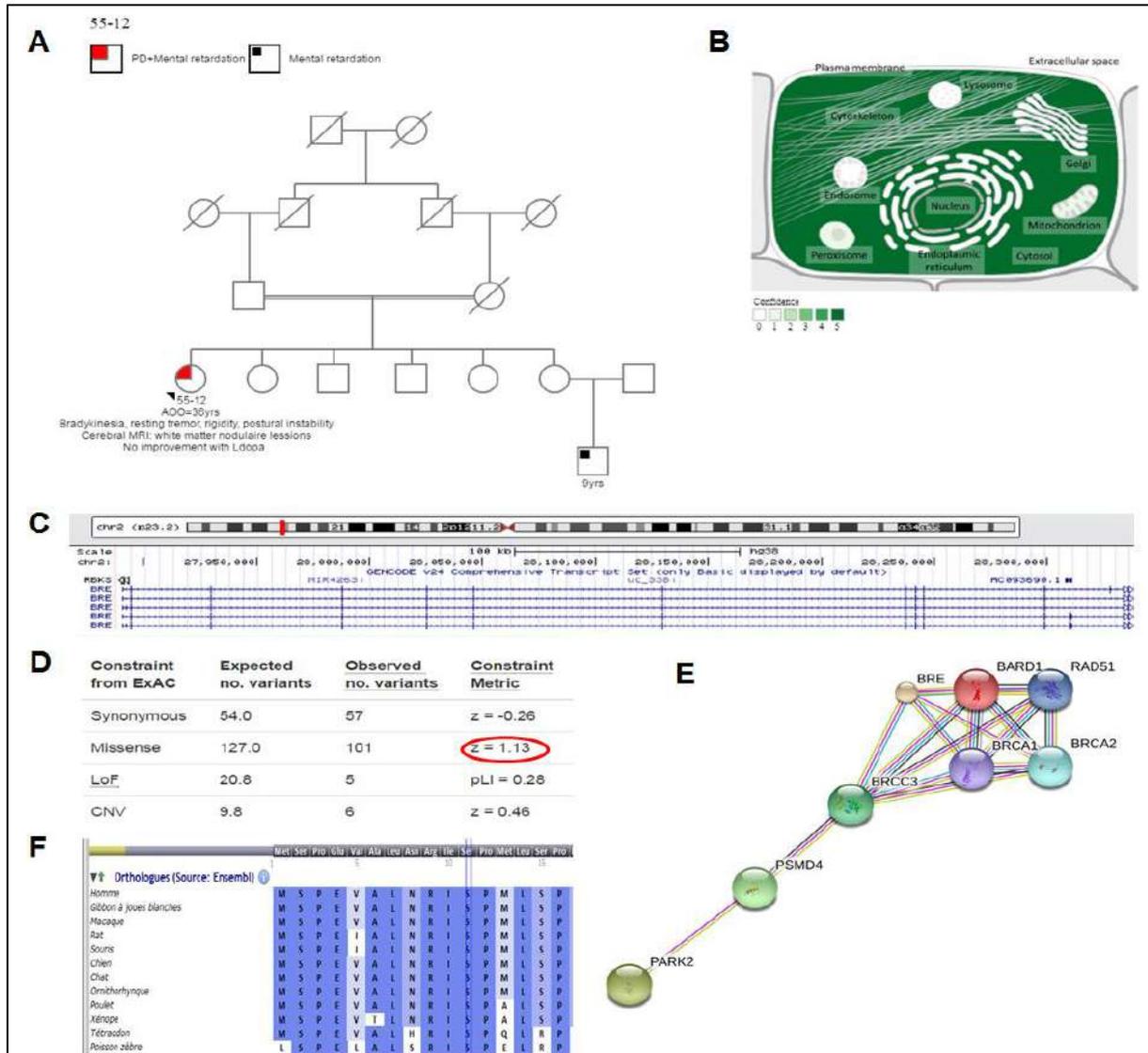


Figure 63. Variation identifiée sur le gène BRE.

(A) Pedigree de la famille PD-TN-55-12. (B) localisation de la protéine BRE dans la cellule. (C) Localisation chromosomique du gène BRE et ses transcrits. (D) Nombre de variations identifiées sur le gène BRE et score z dans la base de donnée Exac. (E) interaction entre le gène BRE aux autres gènes impliqués dans la MP. (F) Alignement multiple montrant la conservation de l'acide aminé serine 11.

III. Variations identifiées sur autres gènes associés précédemment à la maladie de Parkinson

III.1. Le gène ATXN3

Les expansions de trinuécléotides (CAG) dans le gène ATXN3 (ataxin-3) provoquent habituellement une ataxie spinocérébelleuse qui peut inclure un parkinsonisme (expansions normal= 16-34). Cependant il a été rapporté que ce gène est impliqué dans la MP proprement dit sans autres signes neurologiques, au moins pendant les années suivant la présentation

initiale de la maladie [199, 200]. Des expansions pathogènes ($n = 67-75$) sur le gène *ATXN3* ont été identifiées chez des patients qui présentaient des caractéristiques phénotypiques typiques de la MP et une bonne réponse à la dopamine [446].

Dans notre cohorte, en plus de l'expansion $(CAG)_{19}$ à l'état homozygote, nous avons identifié à l'état hétérozygote une nouvelle délétion de 3 nucléotides sur l'exon 10 qui provoque la délétion de deux acides aminés à la position 305 et 306 et l'insertion d'un Arginine à cette position (*p.Gln305_Gly306delinsArg*). Cette variation a été identifiée chez 3 patients non apparentés qui ont développé une MP typique avec une bonne réponse au traitement avant l'âge de 40 ans. Le nombre d'expansion CAG chez ces patients était inférieur à celui identifié précédemment (>67), cependant il reste largement supérieur à celui observé dans notre population ($n=8$). On suggère que ces deux variations identifiées peuvent être associées à la MP chez ces 3 patients Tunisiens.

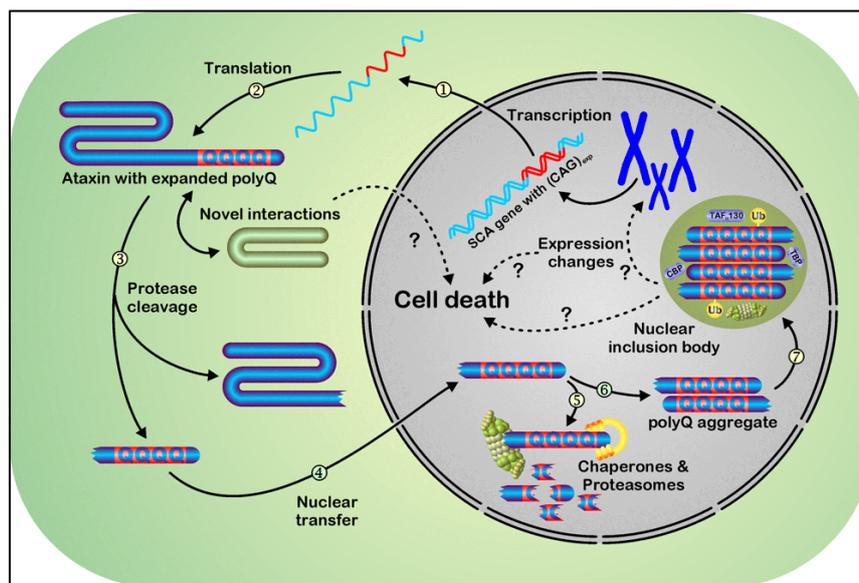


Figure 64. Mécanisme de pathogénicité liée à l'expansion CAG sur le gène *ATXN3*.

III.2. Le gène *HTRA2* : *p.Pro239Leu*

Ce gène code pour une protéine impliquée dans l'apoptose mitochondriale. La protéine *HTRA2* de pleine longueur est constituée d'un domaine transmembranaire (TM, résidus 105-124), d'un domaine catalytique protéase (trypsine SPc, résidus 178-342) et d'un domaine PDZ C-terminal (résidus 363-445) (Figure 65).

Deux mutations (G399S, A141S) identifiées sur le gène *HTRA2* chez 4 patients allemands ont été associées à la MP [209]. Ces deux mutations ont entraîné une activation déficiente de l'activité protéase du gène *HTRA2* induisant un dysfonctionnement mitochondrial. Cependant,

la plupart des études de répliation ont exclu l'association entre le gène *HTRA2* et la MP incluant une étude multicentrique sur 6378 patients parkinsoniens [210, 211].

Dans notre cohorte, nous avons identifié une variation c.716C>T/p.Pro239Leu (rs777079325) sur l'exon 3 du gène *HTRA2* chez un patient qui a développé une MP typique à l'âge de 45ans. Cette variation a été identifié chez un seul individu à l'état hétérozygote dans la base de donnée Exac (fréquence=8.24e-06). Le résidu touché est très conservé jusqu'à Poisson zèbre et la différence chimique entre les deux acides aminés est importante. La variation est située sur le domaine protéique catalytique Trypsin-like cysteine/serine peptidase et elle a été prédite comme délétère par tous les outils de prédiction utilisés. Le criblage de cette variation chez toute la famille a montré son absence, ce qui supporte son effet pathogène.

Le patient a présenté un phénotype typique avec une bonne réponse à 375 mg/jour du traitement lévodopa. Après 19 ans d'évolution de la maladie, elle a gardé un bon état avec une bonne réponse au traitement, sans développer des complications motrices ou une instabilité posturale et l'UPDRS était à 35. Elle a souffert des troubles neurovégétatifs et de sommeil sans aucun signe de troubles cognitifs ou psychiatriques.

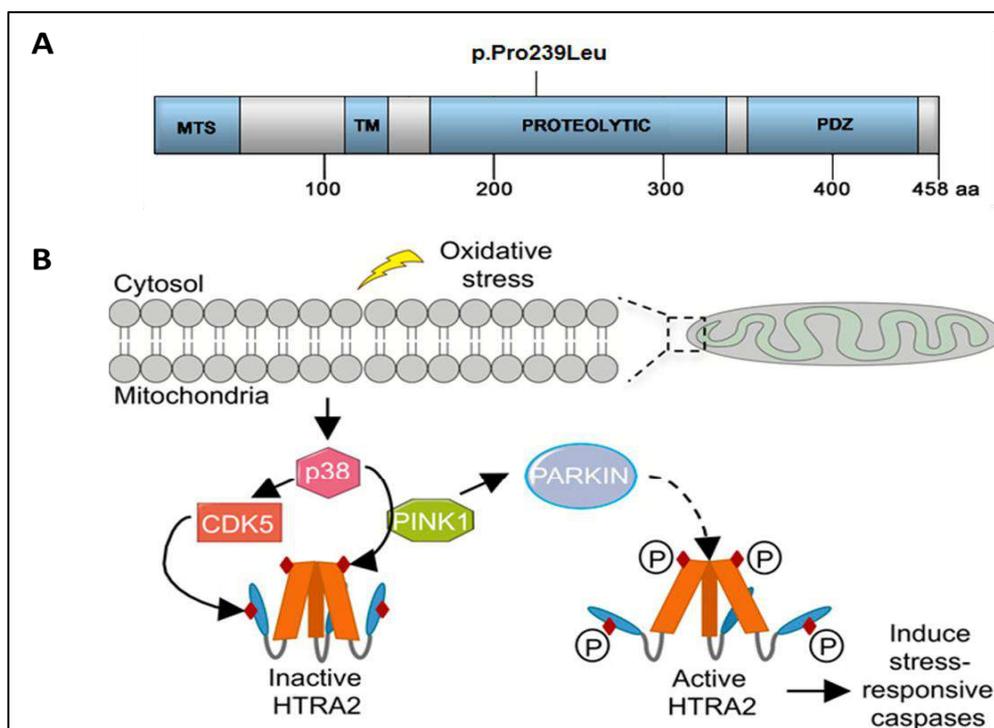


Figure 65. Représentation de la protéine HTRA2 et son activité.

A : structure de la protéine *HTRA2* et l'emplacement de la mutation p.Pro239Leu. (B) Le stress oxydatif entraîne l'activation de la voie de la kinase p38. P38 phosphoryle la sérine-142 de la protéine HTRA2 d'une manière dépendante de PINK1; alors que CDK5 phosphoryle la sérine-400, augmentant l'activité protéolytique de *HTRA2*. L'HTRA2 active induit des caspases sensibles au stress qui sous l'action de Parkin induit la mitophagie[447].

III.3. Le gène *MAPT* : p.Arg222Ser et p.Pro512His

Ce gène code la protéine tau associée aux microtubules (*MAPT*). Les protéines Tau sont exprimées principalement dans le cerveau. Tau est impliqué dans le transport axonal, la plasticité, fonction synaptique[448]. La protéine tau associée aux microtubules est une protéine à prédominance neuronale dont la fonction principale est de se lier aux microtubules et de les stabiliser[449].

Les mutations du gène *MAPT* ont été associées à plusieurs troubles neurodégénératifs tels que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Pick, la démence frontotemporale, la dégénérescence cortico-basale et la paralysie supranucléaire progressive [241,242,243]. Une association entre l'homozygotie de l'haplotype H1 et l'augmentation du risque de la MP a été décrite par plusieurs groupes [450]. On peut mieux comprendre le rôle de la protéine tau en tant que facteur de risque dans la maladie de Parkinson en comprenant comment interagit *MAPT* avec les deux autres influences génétiques majeures sur le risque de maladie de Parkinson: *SNCA* et *LRRK2*.

Dans notre étude nous avons identifié 2 variations sur le gène *MAPT* chez 3 patients avec une MP typique précoce et bonne réponse au traitement.

Tableau 28. Prédiction in silico de la pathogénicité des variations identifiées sur le gène *MAPT*

Patient	Zygoty	Variation		snp138	SIFT	Polyphen-2	Mutation Taster	GVG D	1000G	EXAC Freq
198-11	HTZ	EX6:c.664C>A	p.Arg222Ser	rs150983093	T	D	P	C0	0.0006	0.000249
30-12										
81-11		EX10:c.1535C>A	p.Pro512His	rs192236920	D	D	P	C0	0.0004	6.766e-05

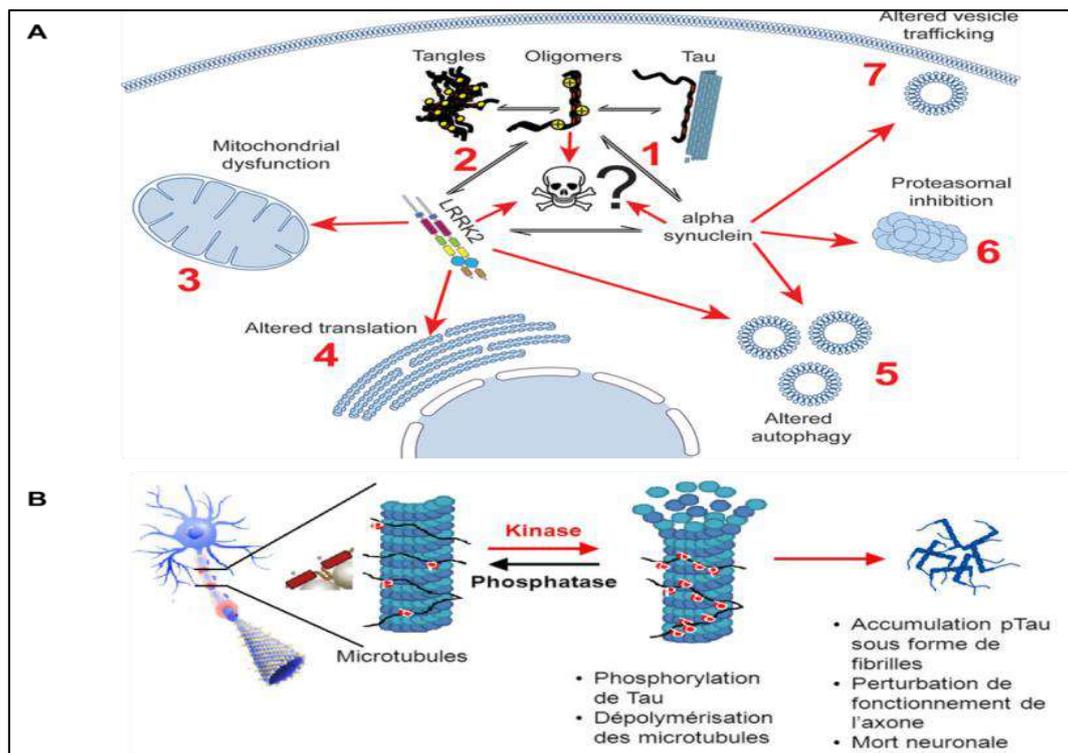


Figure 66. La protéine tau et son implication dans la maladie de Parkinson.

A : Interactions potentielles reliant tau à la mort cellulaire chez les patients atteints de la maladie de Parkinson, montrant des liens établis entre tau, *LRRK2*, α -synucléine et dysfonction cellulaire. Tau a été montré pour modifier l'agrégation de l' α -synucléine (1), et a été décrit comme étant agrégé dans des modèles murins de la maladie *LRRK2* (2). Une interaction cellulaire présumée entre tau, α -synucléine et *LRRK2* pourrait avoir un impact sur un grand nombre de processus cellulaires dans lesquels les trois protéines ont été impliquées, y compris la dysfonction mitochondriale (3), la traduction altérée (4), l'autophagie altérée (5), un dysfonctionnement du protéasome (6) et un trafic de vésicules altéré (7). **B :** Les protéines Tau, dans les neurones, peuvent se désagréger et former des enchevêtrements qui paralysent le trafic interne des neurones et aboutit à leur mort.

IV. Conclusion

Depuis la description de la maladie de Parkinson, des progrès majeurs ont été réalisés dans le traitement et la compréhension des mécanismes physiopathologiques liés à diverses formes génétiques de la maladie. Au cours de la dernière décennie, le développement des nouvelles techniques d'exploration du génome a mené à l'identification de plusieurs gènes impliqués dans le développement de la MP. Néanmoins, chez près de 50% des formes familiales et plus de 80% des formes sporadiques avec un début précoce de la maladie, aucune cause génétique n'a été identifiée.

Dans notre étude, nous avons utilisé la technique de séquençage d'exome chez 24 patients dont l'âge de début de la maladie était inférieur à 40ans pour la recherche de nouveaux gènes

impliqués dans la maladie de Parkinson. Cette stratégie d'analyse nous a permis d'identifier des variations dans 19 gènes candidats, y compris des gènes impliqués dans des voies physiopathologiques qui interagissent avec les gènes responsables des formes monogéniques de la MP.

Les résultats de cette étude ont été en faveur de l'hypothèse que la dysfonction mitochondriale et la génération de stress oxydatif entraînant la mort des cellules neuronales sont les principaux facteurs impliqués dans l'étiologie de la MP. En fait, la plupart des gènes candidats sélectionnés (*ATAD3A*, *BRE*, *ACAD11*, *MRPL53*, *CACNA1S*, *ARMCX3*, *CASP9*) sont impliqués dans la dynamique et la fonction mitochondriales. Une même variation du gène *ATAD3A* a été identifiée à l'état homozygote chez deux patients consanguins non apparentés qui ont développé une MP typique avec un âge de début précoce (43 ans). La quantification de l'ADN mitochondrial chez les deux patients a révélé une légère diminution de la quantité relative de l'ADNmt de 15-20%.

Chez un autre patient porteur d'une mutation sur le gène *BRE*, nous avons constaté une déplétion importante de 40% de la quantité relative de l'ADNmt. Le patient porteur de cette mutation a présenté un phénotype sévère avec une progression très rapide de la maladie et un retard mental depuis le jeune âge.

Nos résultats incriminent également le rôle des troubles du stockage lysosomal dans le développement de la MP. En particulier, nous avons identifié un variant sur le gène *MAN2B2*, une α -mannosidase lysosomale, à l'état homozygote chez un cas index présentant une MP typique à début précoce.

Une autre variation identifiée sur le gène *IDE* suggère qu'un déficit dans ce gène qui provoque l'accumulation du peptide β -amyloïde mal replié pourrait contribuer à la pathogénèse de la maladie de Parkinson.

Nos résultats, qui devront être répliqués, soulignent l'intérêt d'utiliser une population fondatrice comme la population Tunisienne pour l'étude de la structure génétique de la MP et devraient permettre d'approfondir les connaissances sur la pathogénèse moléculaire de la MP. Cependant, l'étude génétique de la MP et l'identification des nouveaux gènes impliqués dans notre cohorte se confronte à certaines limites qui sont notamment l'absence de familles étendues avec plusieurs cas apparentés. La plupart de nos patients étaient des cas sporadiques, ceci avait pour conséquence de restreindre les possibilités d'études familiales et les cohortes de répliqués.

Conclusion

Dans notre cohorte, les mutations sur le gène *LRRK2* sont la principale cause génétique de la maladie de Parkinson, responsable également des formes à début précoce et à début tardif. La mutation *LRRK2*-p.G2019S seule était responsable de 42,8% de tous les cas. Nous avons confirmé que cette fréquence élevée est due à un effet fondateur qui a survécu il y a au moins 4000 ans chez un ancêtre commun de tous les porteurs Tunisiens de cette mutation et nous avons montré que cet ancêtre commun a une origine berbère. Cliniquement ces patients sont plus susceptibles de développer la MP à un âge plus précoce mais leur phénotype est généralement plus bénin que celui des formes idiopathiques. L'âge de début de la maladie pour ces patients était très variable d'un patient à un autre, nous avons montré qu'une variation synonyme sur le gène *LRRK2* (p.L953L) augmente le niveau d'expression du gène *LRRK2* ce qui provoque le développement de la maladie à un âge plus précoce. La sévérité de la maladie ne différait pas entre les porteurs homozygotes et hétérozygotes de la mutation p.G2019S. Alors que les porteurs mâles ont une meilleure cognition et un risque plus faible de dépression en comparaison des porteurs femelles.

Dans cette étude, nous avons également trouvé que la mutation *PINK1* p.Q456* est présente sur un seul haplotype commun parmi 6 familles non apparentées suggérant que cette mutation est le résultat d'un seul changement nucléotidique dans un ancêtre commun de tous les porteurs de la mutation p.Q456* en Tunisie. Malheureusement, ayant un nombre limité de porteurs dans notre cohorte, nous n'avons pas pu dater cet événement fondateur. Cependant, les analyses de l'origine ethnique ont montré que tous les porteurs mâles avaient une origine berbère portant le sous-clade E1B1B1B (M81).

En plus de la mutation p.Q456*, quatre autres mutations ont été identifiées sur le gène *PINK1* (détectées dans 4% de tous les cas). Cette fréquence élevée de mutations *PINK1* dans la population tunisienne a également été rapportée par Ishihara-Paul et al. En effet, les mutations Q129fs*29 et G440E identifiées dans cette étude ont été décrites pour la première fois dans la cohorte tunisienne et elles pourraient aussi résulter d'un événement fondateur plus rare ou plus récent. Ces données nous amènent à conclure que cette fréquence inhabituellement élevée des mutations *PINK1* peut être limitée à la population tunisienne d'origine berbère.

En revanche, la fréquence des mutations sur le gène *PARK2* a été relativement plus faible dans notre cohorte tunisienne que dans les autres populations. Seulement deux patients avaient des réarrangements exoniques dans le gène *PARK2* y compris une nouvelle triplication des exons 5-7 (0,8% de tous les cas).

Dans le gène *GBA*, en plus de la mutation p.L483P (p.L444P) pathogène, 3 nouvelles mutations (p.D180G, p.A215V et p.F290Y) ont également été identifiées chez 1,6% des patients.

Dans l'ensemble, les causes génétiques ont été identifiées dans un nombre considérable de cas (51,2%). Cette haute fréquence était en accord avec les résultats de Gouider-Khouja et Nishioka et al. sur la population tunisienne. Au contraire, dans la plupart des populations, les formes monogéniques connues sont rares, et ne peuvent expliquer qu'une très faible partie des cas de MP estimés à 10-20%. Habituellement, les mutations sont plus fréquentes chez les patients avec un âge de début de la maladie inférieur à 40ans, avec des antécédents familiaux de PD ou consanguinité parentale. Cependant, dans notre étude, la fréquence des formes monogéniques chez les patients avec un âge tardif de début de la MP était relativement élevée et similaire à celle des patients avec un âge précoce de début de la MP. Ceci confirme que la population berbéro-tunisienne est distincte des autres populations.

Nos résultats ont montré que la population tunisienne est distincte des autres populations, car il est frappant de constater que plus de 50% de tous les cas parkinsoniens ont une origine génétique. En effet, outre que la prévalence très élevée de la mutation p.G2019S sur le gène *LRRK2*; une fréquence élevée inhabituelle des mutations sur le gène *PINK1* a été notée. Cette structure génétique particulière de la MP en Tunisie pourrait être principalement le résultat de l'origine historique berbère de notre population Tunisienne.

Après avoir déterminé les gènes responsables de formes familiales de la maladie de Parkinson, nous pouvons donner un conseil génétique bien fondé. De plus, ces avancées en génétique ont permis une meilleure compréhension de la physiopathologie de la maladie ce qui pourrait aider à découvrir des nouvelles approches thérapeutiques. En connaissant le background génétique de notre population Parkinsonienne, nous pouvons participer à des protocoles de thérapie ciblée et nous pouvons donner un conseil génétique bien fondé.

Perspectives

Suite à ce travail de thèse, de nombreuses perspectives sont envisageables et certaines déjà prévues.

- ❖ Etudier d'autres familles atteintes de la maladie de Parkinson précoce et chercher les mutations responsables de ces formes.
- ❖ Elargir l'effectif des patients porteurs de la mutation p.G2019S sur le gène *LRRK2* pour pouvoir confirmer l'influence de la variation p.L953L en utilisant une méthode d'analyse plus adéquate.
- ❖ Etudier l'âge de la mutation fondatrice p.Q456 * sur le gène *PINK1*.
- ❖ Approfondir l'analyse des résultats d'exome pour identifier les gènes candidats à transmission dominante.
- ❖ Analyse fonctionnelle des variations identifiées sur les gènes candidats pour confirmer leur implication dans la maladie de Parkinson.

Références Bibliographiques

1. Parkinson J (2002) An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14:223–236; discussion 222. <https://doi.org/10.1176/jnp.14.2.223>
2. Charcot JM (Jean M, Bourneville b 1840 (1884) *Leçons sur les maladies du système nerveux faites à la salpêtrière*. Paris : A. Delahaye
3. Charcot J-M (1987) *Charcot, the Clinician: The Tuesday Lessons: Excerpts from Nine Case Presentations on General Neurology Delivered at the Salpêtrière Hospital in 1887-88*. Raven Press, New York
4. Hirtz D, Thurman DJ, Gwinn-Hardy K, et al (2007) How common are the “common” neurologic disorders? *Neurology* 68:326–337.
5. Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves TDL (2014) The prevalence of Parkinson’s disease: A systematic review and meta-analysis. *Mov Disord* 29:1583–1590.
6. Hirsch L, Jette N, Frolkis A, et al (2016) The Incidence of Parkinson’s Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *NED* 46:292–300.
7. Cacabelos R (2017) Parkinson’s Disease: From Pathogenesis to Pharmacogenomics. *Int J Mol Sci* 18:. <https://doi.org/10.3390/ijms18030551>
8. Taylor KSM, Cook JA, Counsell CE (2007) Heterogeneity in male to female risk for Parkinson’s disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78:905–906.
9. Wooten G, Currie L, Bovbjerg V, et al (2004) Are men at greater risk for Parkinson’s disease than women? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75:637–639.
10. Moisan F, Kab S, Mohamed F, et al (2016) Parkinson disease male-to-female ratios increase with age: French nationwide study and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 87:952–957. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2015-312283>
11. Benedetti MD, Maraganore DM, Bower JH, et al (2001) Hysterectomy, menopause, and estrogen use preceding Parkinson’s disease: an exploratory case-control study. *Mov Disord* 16:830–837
12. Rocca WA, Bower JH, Maraganore DM, et al (2008) Increased risk of parkinsonism in women who underwent oophorectomy before menopause. *Neuro*. 70:200–209.
13. Alamri Y, MacAskill M, Anderson T, Benamer H (2015) Parkinson’s Disease in the Gulf Countries: An Updated Review. *ENE* 74:222–225.
14. Okubadejo NU, Bower JH, Rocca WA, Maraganore DM (2006) Parkinson’s disease in Africa: A systematic review of epidemiologic and genetic studies. *Movement Disorders* 21:2150–2156.
15. Blanckenberg J, Bardien S, Glanzmann B, et al (2013) The prevalence and genetics of Parkinson’s disease in sub-Saharan Africans. *Journal of the Neurological Sciences* 335:22–25.
16. Attia Romdhane N, Ben Hamida M, Mrabet A, et al (1993) Prevalence study of neurologic disorders in Kelibia (Tunisia). *Neuroepidemiology* 12:285–299
17. Mehanna R, Moore S, Hou JG, et al (2014) Comparing clinical features of young onset, middle onset and late onset Parkinson’s disease. *Parkinsonism & Related Disorders* 20:530–534.
18. Defebvre L, Vérin M (2011) *La maladie de Parkinson*, 2e édition. Elsevier Masson, Issy-les-Moulineaux
19. Jankovic J (2008) Parkinson’s disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79:368–376. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2007.131045>
20. Gowers W (1893) *A manual of diseases of the nervous system*. Philadelphia: Blakiston
21. Ling H, Massey LA, Lees AJ, et al (2012) Hypokinesia without decrement distinguishes progressive supranuclear palsy from Parkinson’s disease. *Brain* 135:1141–1153.

22. Williams DR, Watt HC, Lees AJ (2006) Predictors of falls and fractures in bradykinetic rigid syndromes: a retrospective study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77:468–473. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2005.074070>
23. Macht M, Kaussner Y, Möller JC, et al (2007) Predictors of freezing in Parkinson's disease: a survey of 6,620 patients. *Mov Disord* 22:953–956.
24. Pfeiffer RF (2016) Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 22 Suppl 1:S119-122.
25. Sveinbjornsdottir S (2016) The clinical symptoms of Parkinson's disease. *J Neurochem* 139:318–324. <https://doi.org/10.1111/jnc.13691>
26. Schapira AHV, Chaudhuri KR, Jenner P (2017) Non-motor features of Parkinson disease. *Nature Reviews Neuroscience* 18:435.
27. Schrag A, Horsfall L, Walters K, et al (2015) Prediagnostic presentations of Parkinson's disease in primary care: a case-control study. *Lancet Neurol* 14:57–64.
28. Chen H, Burton EA, Ross GW, et al (2013) Research on the Premotor Symptoms of Parkinson's Disease: Clinical and Etiological Implications. *Environmental Health Perspectives* 121:1245. <https://doi.org/10.1289/ehp.1306967>
29. Jost WH (2003) Autonomic dysfunctions in idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol* 250:i28–i30. <https://doi.org/10.1007/s00415-003-1105-z>
30. Lahrmann H, Cortelli P, Hilz M, et al (2006) EFNS guidelines on the diagnosis and management of orthostatic hypotension. *Eur J Neurol* 13:930–936.
31. Mathers SE, Kempster PA, Law PJ, et al (1989) Anal sphincter dysfunction in Parkinson's disease. *Arch Neurol* 46:1061–1064
32. Derkinderen P, Rouaud T, Lebouvier T, et al (2011) Parkinson disease: the enteric nervous system spills its guts. *Neurology* 77:1761–1767.
33. Jost WH (2010) Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's Disease. *J Neurol Sci* 289:69–73. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2009.08.020>
34. Abbott RD, Petrovitch H, White LR, et al (2001) Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease. *Neurology* 57:456–462
35. Winge K (2015) Lower urinary tract dysfunction in patients with parkinsonism and other neurodegenerative disorders. *Handb Clin Neurol* 130:335–356.
36. Araki I, Kitahara M, Oida T, Kuno S (2000) Voiding dysfunction and Parkinson's disease: urodynamic abnormalities and urinary symptoms. *J Urol* 164:1640–1643
37. Hirayama M (2006) Sweating dysfunctions in Parkinson's disease. *J Neurol* 253 Suppl 7:VII42-47. <https://doi.org/10.1007/s00415-006-7010-7>
38. Fischer M, Gemende I, Marsch WC, Fischer PA (2001) Skin function and skin disorders in Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 108:205–213.
39. Cersósimo MG, Tumilasci OR, Raina GB, et al (2009) Hyposialorrhea as an early manifestation of Parkinson disease. *Auton Neurosci* 150:150–151.
40. Palma J-A, Kaufmann H (2014) Autonomic disorders predicting Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord* 20:S94–S98.
41. Mehta SH, Morgan JC, Sethi KD (2008) Sleep disorders associated with Parkinson's disease: role of dopamine, epidemiology, and clinical scales of assessment. *CNS Spectr* 13:6–11
42. Olanow CW, Schapira AH, Roth T (2000) Waking up to sleep episodes in Parkinson's disease. *Mov Disord* 15:212–215
43. Larsen JP, Tandberg E (2001) Sleep disorders in patients with Parkinson's disease: epidemiology and management. *CNS Drugs* 15:267–275

44. Louter M, van der Marck MA, Pevernagie D a. A, et al (2013) Sleep matters in Parkinson's disease: use of a priority list to assess the presence of sleep disturbances. *Eur J Neurol* 20:259–265.
45. Monderer R, Thorpy M (2009) Sleep disorders and daytime sleepiness in Parkinson's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 9:173–180.
46. Knie B, Mitra MT, Logishetty K, Chaudhuri KR (2011) Excessive daytime sleepiness in patients with Parkinson's disease. *CNS Drugs* 25:203–212.
47. Pfeiffer HCV, Løkkegaard A, Zoetmulder M, et al (2014) Cognitive impairment in early-stage non-demented Parkinson's disease patients. *Acta Neurologica Scandinavica* 129:307–318.
48. Kehagia AA, Barker RA, Robbins TW (2012) Cognitive Impairment in Parkinson's Disease: The Dual Syndrome Hypothesis. *Neurodegener Dis* 11:79–92.
49. Mattay VS, Tessitore A, Callicott JH, et al (2002) Dopaminergic modulation of cortical function in patients with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 51:156–164.
50. Aarsland D, Andersen K, Larsen JP, et al (2003) Prevalence and characteristics of dementia in Parkinson disease: an 8-year prospective study. *Arch Neurol* 60:387–392
51. Irwin DJ, White MT, Toledo JB, et al (2012) Neuropathologic substrates of Parkinson's disease dementia. *Ann Neurol* 72:587–598.
52. Alves G, Larsen JP, Emre M, et al (2006) Changes in motor subtype and risk for incident dementia in Parkinson's disease. *Mov Disord* 21:1123–1130.
53. Wang J, You H, Liu J-F, et al (2011) Association of Olfactory Bulb Volume and Olfactory Sulcus Depth with Olfactory Function in Patients with Parkinson Disease. *American Journal of Neuroradiology* 32:677–681.
54. Archibald NK, Clarke MP, Mosimann UP, Burn DJ (2011) Visual symptoms in Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia. *Mov Disord* 26:2387–2395.
55. Baker WL, Silver D, White CM, et al (2009) Dopamine agonists in the treatment of early Parkinson's disease: A meta-analysis. *Parkinsonism & Related Disorders* 15:287–294. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2008.07.004>
56. Fénelon G, Mahieux F, Huon R, Ziegler M (2000) Hallucinations in Parkinson's disease: prevalence, phenomenology and risk factors. *Brain* 123 (Pt 4):733–745
57. Muller AJ, Shine JM, Halliday GM, Lewis SJG (2014) Visual hallucinations in Parkinson's disease: theoretical models. *Mov Disord* 29:1591–1598.
58. Archibald NK, Hutton SB, Clarke MP, et al (2013) Visual exploration in Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia. *Brain* 136:739–750.
59. Beiske AG, Loge JH, Rønningen A, Svensson E (2009) Pain in Parkinson's disease: Prevalence and characteristics. *PAIN®* 141:173–177.
60. Rihmer Z, Gonda X, Döme P (2014) Depression in Parkinson's disease. *Ideggyogy Sz* 67:229–236
61. Tan LCS (2012) Mood disorders in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders* 18:S74–S76. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(11\)70024-4](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(11)70024-4)
62. Fontoura JL, Baptista C, Pedrosa F de B, et al (2017) Depression in Parkinson's Disease: The Contribution from Animal Studies. *Parkinsons Dis* 2017:.
63. Burn DJ (2002) Beyond the iron mask: towards better recognition and treatment of depression associated with Parkinson's disease. *Mov Disord* 17:445–454.
64. Lin C-H, Lin J-W, Liu Y-C, et al (2015) Risk of Parkinson's disease following anxiety disorders: a nationwide population-based cohort study. *Eur J Neurol* 22:1280–1287. <https://doi.org/10.1111/ene.12740>

65. Goetz CG, Tilley BC, Shaftman SR, et al (2008) Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): scale presentation and clinimetric testing results. *Mov Disord* 23:2129–2170.
66. Postuma RB, Berg D, Stern M, et al (2015) MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord* 30:1591–1601.
67. Fahn S, Elton R (1987) The Unified Parkinson's Disease Rating Scale. In: *Recent Developments in Parkinson's Disease*, 2nd ed. S. Fahn, C.D. Marsden, D.B. Calne, M. Goldstein, Florham Park, NJ, pp 153–163
68. Goetz CG, Fahn S, Martinez-Martin P, et al (2007) Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): Process, format, and clinimetric testing plan. *Mov Disord* 22:41–47.
69. Hoehn MM, Yahr MD (1967) Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 17:427–442
70. England AC, Schwab RS (1956) Postoperative medical evaluation of 26 selected patients with Parkinson's disease. *J Am Geriatr Soc* 4:1219–1232
71. Guy W (1976) ECDEU assessment manual for psychopharmacology, Rev. 1976. U.S. Dept. of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Alcohol, Drug Abuse, and Mental Health Administration, National Institute of Mental Health, Psychopharmacology Research Branch, Division of Extramural Research Programs, Rockville, Md
72. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR (1975) "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12:189–198
73. Crum RM, Anthony JC, Bassett SS, Folstein MF (1993) Population-based norms for the Mini-Mental State Examination by age and educational level. *JAMA* 269:2386–2391
74. Nasreddine ZS, Phillips NA, Bédirian V, et al (2005) The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *J Am Geriatr Soc* 53:695–699. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2005.53221.x>
75. Dubois B, Slachevsky A, Litvan I, Pillon B (2000) The FAB: a Frontal Assessment Battery at bedside. *Neurology* 55:1621–1626
76. Yesavage JA, Brink TL, Rose TL, et al (1982) Development and validation of a geriatric depression screening scale: a preliminary report. *J Psychiatr Res* 17:37–49
77. Beck AT, Steer RA, Ball R, Ranieri W (1996) Comparison of Beck Depression Inventories -IA and -II in psychiatric outpatients. *J Pers Assess* 67:588–597.
78. Ware JE, Sherbourne CD (1992) The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection. *Med Care* 30:473–483
79. Peto V, Jenkinson C, Fitzpatrick R, Greenhall R (1995) The development and validation of a short measure of functioning and well being for individuals with Parkinson's disease. *Qual Life Res* 4:241–248
80. Foix C, Nicolesco J (1925) Anatomie cérébrale. Les noyaux gris centraux et la région mesencephalo-sous-optique; suivi d'une appendice sur l'anatomie pathologique de la maladie de Parkinson, Masson. Paris
81. Yelnik J, François C, Percheron G, Tandé D (1991) Morphological taxonomy of the neurons of the primate striatum. *J Comp Neurol* 313:273–294.
82. Penney JB, Young AB (1981) GABA as the pallidothalamic neurotransmitter: implications for basal ganglia function. *Brain Res* 207:195–199

83. Rinvik E, Ottersen OP (1993) Terminals of subthalamonigral fibres are enriched with glutamate-like immunoreactivity: an electron microscopic, immunogold analysis in the cat. *J Chem Neuroanat* 6:19–30
84. Alexander GE, DeLong MR, Strick PL (1986) Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci* 9:357–381. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.09.030186.002041>
85. Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366–375
86. Alexander GE, Crutcher MD, DeLong MR (1990) Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, “prefrontal” and “limbic” functions. *Prog Brain Res* 85:119–146
87. Viallet J, Gayraud D, Bonnefoi-Kyriacou E, et al (2001) *Maladie de Parkinson idiopathique : aspects cliniques, diagnostiques et thérapeutiques*. Encycl Med Chir Elsevier SAS, Paris
88. Levy R, Hazrati L-N, Herrero M-T, et al (1997) Re-evaluation of the functional anatomy of the basal ganglia in normal and Parkinsonian states. *Neuroscience* 76:335–343. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(96\)00409-5](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(96)00409-5)
89. Dickson DW (2018) Neuropathology of Parkinson disease. *Parkinsonism & Related Disorders* 46:S30–S33. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2017.07.033>
90. Dahlström A, Fuxe K (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20:398–399
91. Ehringer H, Hornykiewicz O (1960) [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin Wochenschr* 38:1236–1239
92. Hornykiewicz O (1998) Biochemical aspects of Parkinson’s disease. *Neurology* 51:S2-9
93. German DC, Manaye K, Smith WK, et al (1989) Midbrain dopaminergic cell loss in Parkinson’s disease: computer visualization. *Ann Neurol* 26:507–514.
94. Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM (1999) The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson’s disease. *Brain* 122 (Pt 8):1437–1448
95. Cheng H-C, Ulane CM, Burke RE (2010) Clinical progression in Parkinson disease and the neurobiology of axons. *Ann Neurol* 67:715–725.
96. Tretiakoff C (1919) *Contributions a l’étude de l’anatomie pathologique du locus niger de soemmering avec quelques deductions relatives a la pathogenie des troubles de tonus musculaire et de la maladie de Parkinson*. Theses de Paris
97. Zarow C, Lyness SA, Mortimer JA, Chui HC (2003) Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. *Arch Neurol* 60:337–341
98. Gai WP, Blumbergs PC, Geffen LB, Blessing WW (1992) Age-related loss of dorsal vagal neurons in Parkinson’s disease. *Neurology* 42:2106–2111
99. Hirsch EC, Graybiel AM, Duyckaerts C, Javoy-Agid F (1987) Neuronal loss in the pedunculopontine tegmental nucleus in Parkinson disease and in progressive supranuclear palsy. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5976–5980
100. Jellinger KA (1991) Pathology of Parkinson’s disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Mol Chem Neuropathol* 14:153–197
101. Cersosimo MG, Benarroch EE (2012) Autonomic involvement in Parkinson’s disease: pathology, pathophysiology, clinical features and possible peripheral biomarkers. *J Neurol Sci* 313:57–63. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.09.030>

102. Orimo S, Uchihara T, Nakamura A, et al (2008) Axonal alpha-synuclein aggregates herald centripetal degeneration of cardiac sympathetic nerve in Parkinson's disease. *Brain* 131:642–650. <https://doi.org/10.1093/brain/awm302>
103. Pearce RK, Hawkes CH, Daniel SE (1995) The anterior olfactory nucleus in Parkinson's disease. *Mov Disord* 10:283–287.
104. Greffard S, Verny M, Bonnet A-M, et al (2010) A stable proportion of Lewy body bearing neurons in the substantia nigra suggests a model in which the Lewy body causes neuronal death. *Neurobiol Aging* 31:99–103.
105. Jellinger K (1987) Neuropathological substrates of Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 24:109–129
106. Lewy FH (1912) Paralysis agitans. 1. Pathologische Anatomie. In: *Handbuch der Neurologie*, Julius Springer. Lewandowsky M, Berlin, p 920— 933
107. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, et al (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388:839–840. <https://doi.org/10.1038/42166>
108. Fujishiro H, Ferman TJ, Boeve BF, et al (2008) Validation of the Neuropathologic Criteria of the Third Consortium for Dementia with Lewy Bodies for Prospectively Diagnosed Cases. *J Neuropathol Exp Neurol* 67:649–656.
109. Barreto GE, Iarkov A, Moran VE (2015) Beneficial effects of nicotine, cotinine and its metabolites as potential agents for Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci* 6:. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00340>
110. Ross CA, Smith WW (2007) Gene-environment interactions in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 13 Suppl 3:S309-315. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(08\)70022-1](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(08)70022-1)
111. Ascherio A, Schwarzschild MA (2016) The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *The Lancet Neurology* 15:1257–1272.
112. Kieburtz K, Wunderle KB (2013) Parkinson's disease: Evidence for environmental risk factors. *Mov Disord* 28:8–13. <https://doi.org/10.1002/mds.25150>
113. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219:979–980
114. Sherer TB, Kim JH, Betarbet R, Greenamyre JT (2003) Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp Neurol* 179:9–16
115. Tanner CM, Ross GW, Jewell SA, et al (2009) Occupation and risk of parkinsonism: a multicenter case-control study. *Arch Neurol* 66:1106–1113. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.195>
116. Tanner CM, Kamel F, Ross GW, et al (2011) Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect* 119:866–872.
117. Costello S, Cockburn M, Bronstein J, et al (2009) Parkinson's Disease and Residential Exposure to Maneb and Paraquat From Agricultural Applications in the Central Valley of California. *Am J Epidemiol* 169:919–926.
118. Curtin K, Fleckenstein AE, Robison RJ, et al (2015) Methamphetamine/amphetamine abuse and risk of Parkinson's disease in Utah: A population-based assessment. *Drug and Alcohol Dependence* 146:30–38.
119. Guilarte TR, Nihei MK, McGlothan JL, Howard AS (2003) Methamphetamine-induced deficits of brain monoaminergic neuronal markers: distal axotomy or neuronal plasticity. *Neuroscience* 122:499–513.
120. Goldman SM, Tanner CM, Oakes D, et al (2006) Head injury and Parkinson's disease risk in twins. *Ann Neurol* 60:65–72. <https://doi.org/10.1002/ana.20882>

121. Marras C, Hincapié CA, Kristman VL, et al (2014) Systematic Review of the Risk of Parkinson's Disease After Mild Traumatic Brain Injury: Results of the International Collaboration on Mild Traumatic Brain Injury Prognosis. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 95:S238–S244.
122. Hernán MA, Takkouche B, Caamaño-Isorna F, Gestal-Otero JJ (2002) A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 52:276–284. <https://doi.org/10.1002/ana.10277>
123. Kachroo A, Irizarry MC, Schwarzschild MA (2010) Caffeine protects against combined paraquat and maneb-induced dopaminergic neuron degeneration. *Experimental Neurology* 223:657–661.
124. Xu K, Xu Y-H, Chen J-F, Schwarzschild MA (2010) Neuroprotection by caffeine: time course and role of its metabolites in the MPTP model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 167:475–481. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.02.020>
125. Kitagawa M, Houzen H, Tashiro K (2012) Caffeine in Parkinson's disease: Comment on its importance and the dose proposal. *Mov Disord* 27:808–808.
126. Postuma RB, Lang AE, Munhoz RP, et al (2012) Caffeine for treatment of Parkinson disease. *Neurology* 79:651–658.
127. Weisskopf MG, O'Reilly E, Chen H, et al (2007) Plasma urate and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol* 166:561–567.
128. Schwarzschild MA, Schwid SR, Marek K, et al (2008) Serum urate as a predictor of clinical and radiographic progression in Parkinson disease. *Arch Neurol* 65:716–723. <https://doi.org/10.1001/archneur.2008.65.6.nct70003>
129. Zhang SM, Hernán MA, Chen H, et al (2002) Intakes of vitamins E and C, carotenoids, vitamin supplements, and PD risk. *Neurology* 59:1161–1169
130. Marsden CD (1987) Parkinson's disease in twins. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 50:105–106
131. Marttila RJ, Kaprio J, Koskenvuo M, Rinne UK (1988) Parkinson's disease in a nationwide twin cohort. *Neurology* 38:1217–1219
132. Ward CD, Duvoisin RC, Ince SE, et al (1983) Parkinson's disease in 65 pairs of twins and in a set of quadruplets. *Neurology* 33:815–824
133. Johnson WG, Hodge SE, Duvoisin R (1990) Twin studies and the genetics of Parkinson's disease--a reappraisal. *Mov Disord* 5:187–194.
134. Tanner CM, Ottman R, Goldman SM, et al (1999) Parkinson disease in twins: an etiologic study. *JAMA* 281:341–346
135. Lazzarini AM, Myers RH, Zimmerman TR, et al (1994) A clinical genetic study of Parkinson's disease: evidence for dominant transmission. *Neurology* 44:499–506
136. Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, et al (1996) Mapping of a Gene for Parkinson's Disease to Chromosome 4q21-q23. *Science* 274:1197–1199.
137. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, et al (1997) Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science* 276:2045–2047.
138. Houlden H, Singleton AB (2012) The genetics and neuropathology of Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 124:325–338. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1013-5>
139. Puschmann A (2013) Monogenic Parkinson's disease and parkinsonism: clinical phenotypes and frequencies of known mutations. *Parkinsonism Relat Disord* 19:407–415. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2013.01.020>
140. Puschmann A (2017) New Genes Causing Hereditary Parkinson's Disease or Parkinsonism. *Curr Neurol Neurosci Rep* 17:66.

141. Deng H, Wang P, Jankovic J (2018) The genetics of Parkinson disease. *Ageing Research Reviews* 42:72–85. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.12.007>
142. Alcalay R, Caccappolo E, Mejia-Santana H, et al (2010) Frequency of known mutations in early onset PD; implication for genetic counseling: the CORE-PD study. *Arch Neurol* 67:1116–1122. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2010.194>
143. Kilarski LL, Pearson JP, Newsday V, et al (2012) Systematic Review and UK-Based Study of PARK2 (parkin), PINK1, PARK7 (DJ-1) and LRRK2 in early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 27:1522–1529.
144. Lesage S, Brice A (2009) Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet* 18:R48–R59.
145. Crosiers D, Theuns J, Cras P, Van Broeckhoven C (2011) Parkinson disease: insights in clinical, genetic and pathological features of monogenic disease subtypes. *J Chem Neuroanat* 42:131–141.
146. Touchman JW, Dehejia A, Chiba-Falek O, et al (2001) Human and Mouse α -Synuclein Genes: Comparative Genomic Sequence Analysis and Identification of a Novel Gene Regulatory Element. *Genome Res* 11:78–86.
147. Jakes R, Spillantini MG, Goedert M (1994) Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett* 345:27–32
148. Liu S, Ninan I, Antonova I, et al (2004) α -Synuclein produces a long-lasting increase in neurotransmitter release. *The EMBO Journal* 23:4506–4516.
149. Abeliovich A, Schmitz Y, Fariñas I, et al (2000) Mice Lacking α -Synuclein Display Functional Deficits in the Nigrostriatal Dopamine System. *Neuron* 25:239–252.
150. Nakamura K, Nemani VM, Azarbal F, et al (2011) Direct Membrane Association Drives Mitochondrial Fission by the Parkinson Disease-associated Protein α -Synuclein. *J Biol Chem* 286:20710–20726.
151. Cooper AA, Gitler AD, Cashikar A, et al (2006) α -Synuclein Blocks ER-Golgi Traffic and Rab1 Rescues Neuron Loss in Parkinson's Models. *Science* 313:324–328.
152. Stefanis L, Larsen KE, Rideout HJ, et al (2001) Expression of A53T Mutant But Not Wild-Type α -Synuclein in PC12 Cells Induces Alterations of the Ubiquitin-Dependent Degradation System, Loss of Dopamine Release, and Autophagic Cell Death. *J Neurosci* 21:9549–9560
153. Krüger R, Kuhn W, Müller T, et al (1998) AlaSOPro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease. *Nature Genetics* 18:106–108.
154. Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, et al (2004) The new mutation, E46K, of α -synuclein causes parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 55:164–173.
155. Ibáñez P, Lesage S, Janin S, et al (2009) α -Synuclein Gene Rearrangements in Dominantly Inherited Parkinsonism: Frequency, Phenotype, and Mechanisms. *Arch Neurol* 66:102–108. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2008.555>
156. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, et al (2004) Mutations in LRRK2 Cause Autosomal-Dominant Parkinsonism with Pleomorphic Pathology. *Neuron* 44:601–607. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.005>
157. Paisán-Ruíz C, Jain S, Evans EW, et al (2004) Cloning of the Gene Containing Mutations that Cause PARK8-Linked Parkinson's Disease. *Neuron* 44:595–600.
158. Bosgraaf L, Van Haastert PJM (2003) Roc, a Ras/GTPase domain in complex proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1643:5–10. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2003.08.008>
159. MacLeod D, Dowman J, Hammond R, et al (2006) The Familial Parkinsonism Gene LRRK2 Regulates Neurite Process Morphology. *Neuron* 52:587–593.

160. Piccoli G, Condliffe SB, Bauer M, et al (2011) LRRK2 controls synaptic vesicle storage and mobilization within the recycling pool. *J Neurosci* 31:2225–2237.
161. Sakaguchi-Nakashima A, Meir JY, Jin Y, et al (2007) LRK-1, a *C. elegans* PARK8-related kinase, regulates axonal-dendritic polarity of SV proteins. *Curr Biol* 17:592–598. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.01.074>
162. Shin N, Jeong H, Kwon J, et al (2008) LRRK2 regulates synaptic vesicle endocytosis. *Exp Cell Res* 314:2055–2065. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.02.015>
163. Smith WW, Pei Z, Jiang H, et al (2005) Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) interacts with parkin, and mutant LRRK2 induces neuronal degeneration. *PNAS* 102:18676–18681. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508052102>
164. Qing H, Wong W, McGeer EG, McGeer PL (2009) Lrrk2 phosphorylates alpha synuclein at serine 129: Parkinson disease implications. *Biochem Biophys Res Commun* 387:149–152. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.06.142>
165. Esteves AR, Swerdlow RH, Cardoso SM (2014) LRRK2, a puzzling protein: insights into Parkinson's disease pathogenesis. *Exp Neurol* 0:206–216.
166. Funayama M, Hasegawa K, Kowa H, et al (2002) A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2–q13.1. *Ann Neurol* 51:296–301.
167. Dächsel JC, Farrer MJ (2010) LRRK2 and Parkinson Disease. *Arch Neurol* 67:542–547. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2010.79>
168. Mata IF, Hutter CM, González-Fernández MC, et al (2009) Lrrk2 R1441G-related Parkinson's disease: evidence of a common founding event in the seventh century in Northern Spain. *Neurogenetics* 10:347.
169. Lesage S, Dürr A, Tazir M, et al (2006) *LRRK2* G2019S as a Cause of Parkinson's Disease in North African Arabs. *New England Journal of Medicine* 354:422–423.
170. Orr-Urtreger A, Shifrin C, Rozovski U, et al (2007) The LRRK2 G2019S mutation in Ashkenazi Jews with Parkinson disease: is there a gender effect? *Neurology* 69:1595–1602. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000277637.33328.d8>
171. Lesage S, Patin E, Condroyer C, et al (2010) Parkinson's disease-related LRRK2 G2019S mutation results from independent mutational events in humans. *Hum Mol Genet* 19:1998–2004. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq081>
172. Alcalay RN, Mejia-Santana H, Tang MX, et al (2009) Motor phenotype of LRRK2 G2019S carriers in early-onset Parkinson disease. *Arch Neurol* 66:1517–1522.
173. Nabli F, Ben Sassi S, Amouri R, et al (2015) Motor phenotype of LRRK2-associated Parkinson's disease: a Tunisian longitudinal study. *Mov Disord* 30:253–258.
174. Nishioka K, Kefi M, Jasinska-Myga B, et al (2010) A comparative study of LRRK2, PINK1 and genetically undefined familial Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81:391–395. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2009.185231>
175. Zhang P, Yu L, Gao J, et al (2000) Cloning and Characterization of Human VPS35 and Mouse Vps35 and Mapping of VPS35 to Human Chromosome 16q13–q21. *Genomics* 70:253–257. <https://doi.org/10.1006/geno.2000.6380>
176. Edgar AJ, Polak JM (2000) Human Homologues of Yeast Vacuolar Protein Sorting 29 and 35. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 277:622–630.
177. Vilariño-Güell C, Wider C, Ross OA, et al (2011) VPS35 Mutations in Parkinson Disease. *The American Journal of Human Genetics* 89:162–167.
178. Zimprich A, Benet-Pagès A, Struhal W, et al (2011) A Mutation in VPS35, Encoding a Subunit of the Retromer Complex, Causes Late-Onset Parkinson Disease. *The American Journal of Human Genetics* 89:168–175.
179. Ando M, Funayama M, Li Y, et al (2012) VPS35 mutation in Japanese patients with typical Parkinson's disease. *Mov Disord* 27:1413–1417.

180. Lesage S, Condroyer C, Klebe S, et al (2012) Identification of VPS35 mutations replicated in French families with Parkinson disease. *Neurology* 78:1449–1450.
181. Kumar KR, Weissbach A, Heldmann M, et al (2012) Frequency of the D620N Mutation in VPS35 in Parkinson Disease. *Arch Neurol* 69:1360–1364.
182. Horowitz M, Wilder S, Horowitz Z, et al (1989) The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: Structure and evolution. *Genomics* 4:87–96.
183. Beutler E (1992) Gaucher disease: new molecular approaches to diagnosis and treatment. *Science* 256:794–799
184. Dvir H, Harel M, McCarthy AA, et al (2003) X-ray structure of human acid- β -glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *EMBO Rep* 4:704–709.
185. Beutler E, Grabowski G. (2001) Glucosylceramide lipidosis–Gaucher disease. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Scriver, C.R., Sly, W.S., Childs, B., Beaudet, A.L., Valle, D., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B, McGraw-Hill, Inc., New York, USA., pp 3635–3668
186. Tsuji S, Choudary PV, Martin BM, et al (1987) A mutation in the human glucocerebrosidase gene in neuronopathic Gaucher's disease. *N Engl J Med* 316:570–575. <https://doi.org/10.1056/NEJM198703053161002>
187. Giraldo P, Capablo JL, Alfonso P, et al (2011) Neurological manifestations in patients with Gaucher disease and their relatives, it is just a coincidence? *J Inherit Metab Dis* 34:781–787. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9298-4>
188. Halperin A, Elstein D, Zimran A (2006) Increased incidence of Parkinson disease among relatives of patients with Gaucher disease. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 36:426–428. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2006.02.004>
189. Neudorfer O, Giladi N, Elstein D, et al (1996) Occurrence of Parkinson's syndrome in type I Gaucher disease. *QJM* 89:691–694
190. Tayebi N, Walker J, Stubblefield B, et al (2003) Gaucher disease with parkinsonian manifestations: does glucocerebrosidase deficiency contribute to a vulnerability to parkinsonism? *Molecular Genetics and Metabolism* 79:104–109.
191. Goker-Alpan O, Lopez G, Vithayathil J, et al (2008) The Spectrum of Parkinsonian Manifestations Associated With Glucocerebrosidase Mutations. *Arch Neurol* 65:1353–1357. <https://doi.org/10.1001/archneur.65.10.1353>
192. Lesage S, Anheim M, Condroyer C, et al (2011) Large-scale screening of the Gaucher's disease-related glucocerebrosidase gene in Europeans with Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 20:202–210. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq454>
193. Nichols WC, Pankratz N, Marek DK, et al (2009) Mutations in GBA are associated with familial Parkinson disease susceptibility and age at onset. *Neurology* 72:310–316. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000327823.81237.d1>
194. Gegg ME, Schapira AHV (2018) The role of glucocerebrosidase in Parkinson disease pathogenesis. *FEBS J Epub ahead of print*.
195. Jesús S, Huertas I, Bernal-Bernal I, et al (2016) GBA Variants Influence Motor and Non-Motor Features of Parkinson's Disease. *PLoS ONE* 11:e0167749.
196. Lythe V, Athauda D, Foley J, et al (2017) GBA-Associated Parkinson's Disease: Progression in a Deep Brain Stimulation Cohort. *J Parkinsons Dis* 7:635–644.
197. Senkevich KA, Miliukhina IV, Beletskaya MV, et al (2017) [The clinical features of Parkinson's disease in patients with mutations and polymorphic variants of GBA gene]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova* 117:81–86.
198. Winder-Rhodes SE, Evans JR, Ban M, et al (2013) Glucocerebrosidase mutations influence the natural history of Parkinson's disease in a community-based incident cohort. *Brain* 136:392–399. <https://doi.org/10.1093/brain/aws318>

199. Lu C-S, Chang H-C, Kuo P-C, et al (2004) The parkinsonian phenotype of spinocerebellar ataxia type 3 in a Taiwanese family. *Parkinsonism Relat Disord* 10:369–373. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2004.03.009>
200. Socal MP, Emmel VE, Rieder CRM, et al (2009) Intrafamilial variability of Parkinson phenotype in SCAs: novel cases due to SCA2 and SCA3 expansions. *Parkinsonism Relat Disord* 15:374–378.
201. Charles P, Camuzat A, Benammar N, et al (2007) Are interrupted SCA2 CAG repeat expansions responsible for parkinsonism? *Neurology* 69:1970–1975.
202. Sharma M, Mueller JC, Zimprich A, et al (2006) The sepiapterin reductase gene region reveals association in the PARK3 locus: analysis of familial and sporadic Parkinson's disease in European populations. *J Med Genet* 43:557–562.
203. Sharma M, Maraganore DM, Ioannidis JPA, et al (2011) Role of sepiapterin reductase gene at the PARK3 locus in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 32:2108.e1–5. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.05.024>
204. Leroy E, Boyer R, Auburger G, et al (1998) The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 395:451–452. <https://doi.org/10.1038/26652>
205. Lautier C, Goldwurm S, Dürr A, et al (2008) Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) Gene at the PARK11 Locus in Familial Parkinson Disease. *The American Journal of Human Genetics* 82:822–833. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.01.015>
206. Bonetti M, Ferraris A, Petracca M, et al (2009) GIGYF2 variants are not associated with Parkinson's disease in Italy. *Mov Disord* 24:1867–1868.
207. Di Fonzo A, Fabrizio E, Thomas A, et al (2009) GIGYF2 mutations are not a frequent cause of familial Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders* 15:703–705. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2009.05.001>
208. Nichols WC, Kissell DK, Pankratz N, et al (2009) Variation in GIGYF2 is not associated with Parkinson disease. *Neurology* 72:1886–1892.
209. Strauss KM, Martins LM, Plun-Favreau H, et al (2005) Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 14:2099–2111. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi215>
210. Krüger R, Sharma M, Riess O, et al (2011) A large-scale genetic association study to evaluate the contribution of Omi/HtrA2 (PARK13) to Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 32:548.e9-548.18.
211. Ross OA, Soto AI, Vilariño-Güell C, et al (2008) Genetic variation of Omi/HtrA2 and Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders* 14:539–543.
212. Bogaerts V, Nuytemans K, Reumers J, et al (2008) Genetic variability in the mitochondrial serine protease HTRA2 contributes to risk for Parkinson disease. *Hum Mutat* 29:832–840. <https://doi.org/10.1002/humu.20713>
213. Momma K, Funayama M, Li Y, et al (2009) A new mutation in the GCH1 gene presents as early-onset Parkinsonism. *Parkinsonism & Related Disorders* 15:160–161. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2007.12.010>
214. Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, et al (2006) Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 442:916–919. <https://doi.org/10.1038/nature05016>
215. Kelley BJ, Haidar W, Boeve BF, et al (2009) Prominent phenotypic variability associated with mutations in Progranulin. *Neurobiology of Aging* 30:739–751.
216. Quadri M, Cossu G, Saddi V, et al (2011) Broadening the phenotype of *TARDBP* mutations: the *TARDBP* Ala382Thr mutation and Parkinson's disease in Sardinia. *Neurogenetics* 12:203–209.

217. Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, et al (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in *tau* with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393:702–705.
218. Narożańska E, Jasińska-Myga B, Sitek EJ, et al (2011) Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 – the first Polish family. *European Journal of Neurology* 18:535–537.
219. Van Swieten J, Spillantini MG (2007) Hereditary Frontotemporal Dementia Caused by Tau Gene Mutations. *Brain Pathology* 17:63–73.
220. Davidzon G, Greene P, Mancuso M, et al (2006) Early-onset familial parkinsonism due to POLG mutations. *Ann Neurol* 59:859–862.
221. Hudson G, Schaefer AM, Taylor RW, et al (2007) Mutation of the Linker Region of the Polymerase γ -1 (POLG1 Gene Associated With Progressive External Ophthalmoplegia and Parkinsonism. *Arch Neurol* 64:553–557.
222. Remes AM, Hinttala R, Kärppä M, et al (2008) Parkinsonism associated with the homozygous W748S mutation in the POLG1 gene. *Parkinsonism & Related Disorders* 14:652–654. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2008.01.009>
223. Chartier-Harlin M-C, Dachsel JC, Vilarinho-Güell C, et al (2011) Translation Initiator EIF4G1 Mutations in Familial Parkinson Disease. *The American Journal of Human Genetics* 89:398–406. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.08.009>
224. Asakawa S, Tsunematsu K, Takayanagi A, et al (2001) The Genomic Structure and Promoter Region of the Human Parkin Gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 286:863–868.
225. Yoshii SR, Kishi C, Ishihara N, Mizushima N (2011) Parkin Mediates Proteasome-dependent Protein Degradation and Rupture of the Outer Mitochondrial Membrane. *J Biol Chem* 286:19630–19640.
226. Chan NC, Chan DC (2011) Parkin uses the UPS to ship off dysfunctional mitochondria. *Autophagy* 7:771–772. <https://doi.org/10.4161/auto.7.7.15453>
227. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, et al (1998) Mutations in the *parkin* gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392:605–608.
228. Lücking CB, Dürr A, Bonifati V, et al (2000) Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N Engl J Med* 342:1560–1567. <https://doi.org/10.1056/NEJM200005253422103>
229. Cookson MR, Lockhart PJ, McLendon C, et al (2003) RING finger 1 mutations in Parkin produce altered localization of the protein. *Hum Mol Genet* 12:2957–2965.
230. Gu W-J, Corti O, Araujo F, et al (2003) The C289G and C418R missense mutations cause rapid sequestration of human Parkin into insoluble aggregates. *Neurobiol Dis* 14:357–364
231. Wang C, Tan JMM, Ho MWL, et al (2005) Alterations in the solubility and intracellular localization of parkin by several familial Parkinson's disease-linked point mutations. *J Neurochem* 93:422–431.
232. Palacino JJ, Sagi D, Goldberg MS, et al (2004) Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J Biol Chem* 279:18614–18622.
233. Lohmann E, Periquet M, Bonifati V, et al (2003) How much phenotypic variation can be attributed to parkin genotype? *Ann Neurol* 54:176–185.
234. Valente EM, Bentivoglio AR, Dixon PH, et al (2001) Localization of a Novel Locus for Autosomal Recessive Early-Onset Parkinsonism, PARK6, on Human Chromosome 1p35-p36. *Am J Hum Genet* 68:895–900
235. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, et al (2004) Hereditary Early-Onset Parkinson's Disease Caused by Mutations in PINK1. *Science* 304:1158–1160.

236. Poole AC, Thomas RE, Andrews LA, et al (2008) The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *PNAS* 105:1638–1643.
237. Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, et al (2015) The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* 524:309–314.
238. Pickrell AM, Youle RJ (2015) The Roles of PINK1, Parkin and Mitochondrial Fidelity in Parkinson's Disease. *Neuron* 85:257–273.
239. Exner N, Treske B, Paquet D, et al (2007) Loss-of-Function of Human PINK1 Results in Mitochondrial Pathology and Can Be Rescued by Parkin. *J Neurosci* 27:12413–12418. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0719-07.2007>
240. Zhang L, Shimoji M, Thomas B, et al (2005) Mitochondrial localization of the Parkinson's disease related protein DJ-1: implications for pathogenesis. *Hum Mol Genet* 14:2063–2073. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi211>
241. Taira T, Saito Y, Niki T, et al (2004) DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep* 5:213–218.
242. Canet-Avilés RM, Wilson MA, Miller DW, et al (2004) The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9103–9108.
243. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, et al (2003) Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299:256–259. <https://doi.org/10.1126/science.1077209>
244. Annesi G, Savettieri G, Pugliese P, et al (2005) DJ-1 mutations and parkinsonism-dementia-amyotrophic lateral sclerosis complex. *Ann Neurol* 58:803–807.
245. Ramirez A, Heimbach A, Gründemann J, et al (2006) Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet* 38:1184–1191. <https://doi.org/10.1038/ng1884>
246. Williams DR, Hadeed A, al-Din ASN, et al (2005) Kufor Rakeb disease: autosomal recessive, levodopa-responsive parkinsonism with pyramidal degeneration, supranuclear gaze palsy, and dementia. *Mov Disord* 20:1264–1271.
247. Paisan-Ruiz Coro, Bhatia Kailash P., Li Abi, et al (2009) Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism. *Annals of Neurology* 65:19–23.
248. Shojaee S, Sina F, Banihosseini SS, et al (2008) Genome-wide Linkage Analysis of a Parkinsonian-Pyramidal Syndrome Pedigree by 500 K SNP Arrays. *Am J Hum Genet* 82:1375–1384. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.05.005>
249. Edvardson S, Cinnamon Y, Ta-Shma A, et al (2012) A Deleterious Mutation in DNAJC6 Encoding the Neuronal-Specific Clathrin-Uncoating Co-Chaperone Auxilin, Is Associated with Juvenile Parkinsonism. *PLOS ONE* 7:e36458.
250. Köroğlu Ç, Baysal L, Cetinkaya M, et al (2013) DNAJC6 is responsible for juvenile parkinsonism with phenotypic variability. *Parkinsonism & Related Disorders* 19:320–324. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2012.11.006>
251. Olgiati Simone, Quadri Marialuisa, Fang Mingyan, et al (2016) DNAJC6 Mutations Associated With Early-Onset Parkinson's Disease. *Annals of Neurology* 79:244–256. <https://doi.org/10.1002/ana.24553>
252. Krebs CE, Karkheiran S, Powell JC, et al (2013) The Sac1 domain of SYNJ1 identified mutated in a family with early-onset progressive Parkinsonism with generalized seizures. *Hum Mutat* 34:1200–1207.
253. Quadri M, Fang M, Picillo M, et al (2013) Mutation in the SYNJ1 gene associated with autosomal recessive, early-onset Parkinsonism. *Hum Mutat* 34:1208–1215.

254. Hardies K, Cai Y, Jardel C, et al (2016) Loss of SYNJ1 dual phosphatase activity leads to early onset refractory seizures and progressive neurological decline. *Brain* 139:2420–2430. <https://doi.org/10.1093/brain/aww180>
255. Guidubaldi Arianna, Piano Carla, Santorelli Filippo M., et al (2011) Novel mutations in SPG11 cause hereditary spastic paraplegia associated with early-onset levodopa-responsive Parkinsonism. *Movement Disorders* 26:553–556.
256. Lesage S, Drouet V, Majounie E, et al (2016) Loss of VPS13C Function in Autosomal-Recessive Parkinsonism Causes Mitochondrial Dysfunction and Increases PINK1/Parkin-Dependent Mitophagy. *Am J Hum Genet* 98:500–513.
257. Anheim M, Lagier-Tourenne C, Stevanin G, et al (2009) SPG11 spastic paraplegia. A new cause of juvenile parkinsonism. *J Neurol* 256:104–108. <https://doi.org/10.1007/s00415-009-0083-3>
258. Büeler H (2010) Mitochondrial dynamics, cell death and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Apoptosis* 15:1336–1353.
259. Camilleri A, Vassallo N (2014) The centrality of mitochondria in the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *CNS Neurosci Ther* 20:591–602.
260. Celardo I, Martins LM, Gandhi S (2014) Unravelling mitochondrial pathways to Parkinson's disease. *Br J Pharmacol* 171:1943–1957.
261. Zuo L, Motherwell MS (2013) The impact of reactive oxygen species and genetic mitochondrial mutations in Parkinson's disease. *Gene* 532:18–23.
262. Dexter DT, Jenner P (2013) Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radic Biol Med* 62:132–144.
263. Trinh J, Farrer M (2013) Advances in the genetics of Parkinson disease. *Nat Rev Neurol* 9:445–454. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2013.132>
264. Cotzias GC, Van Woert MH, Schiffer LM (1967) Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. *N Engl J Med* 276:374–379.
265. Cedarbaum JM, McDowell FH (1987) Sixteen-year follow-up of 100 patients begun on levodopa in 1968: emerging problems. *Adv Neurol* 45:469–472
266. Abbassi D, Ilbert R (2005) *Entre Bourguiba et Hannibal: identité tunisienne et histoire depuis l'indépendance*. Karthala, Paris, France
267. Collignon R (1915) *Bulletins et Mémoires de la Société d'anthropologie de Paris*. Masson, Paris
268. Cherni L, Pakstis AJ, Boussetta S, et al (2016) Genetic variation in Tunisia in the context of human diversity worldwide. *American Journal of Physical Anthropology* 161:62. <https://doi.org/10.1002/ajpa.23008>
269. Fadhlaoui-Zid K, Martinez-Cruz B, Khodjet-el-khil H, et al (2011) Genetic structure of Tunisian ethnic groups revealed by paternal lineages. *Am J Phys Anthropol* 146:271–280. <https://doi.org/10.1002/ajpa.21581>
270. Chaker S (2004) *Langue et littérature berbères*. In: - *Clio - Voyage Culturel*. http://www.clio.fr/BIBLIOTHEQUE/langue_et_litterature_berberes.asp. Accessed 3 Mar 2018
271. Lahn BT, Page DC (1997) Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 278:675–680
272. Underhill PA, Shen P, Lin AA, et al (2000) Y chromosome sequence variation and the history of human populations. *Nat Genet* 26:358–361.
273. Underhill PA, Passarino G, Lin AA, et al (2001) The phylogeography of Y chromosome binary haplotypes and the origins of modern human populations. *Ann Hum Genet* 65:43–62

274. Karafet TM, Mendez FL, Meilerman MB, et al (2008) New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. *Genome Res* 18:830–838. <https://doi.org/10.1101/gr.7172008>
275. Cruciani F, Trombetta B, Massaia A, et al (2011) A Revised Root for the Human Y Chromosomal Phylogenetic Tree: The Origin of Patrilineal Diversity in Africa. *The American Journal of Human Genetics* 88:814–818.
276. Zhong H, Shi H, Qi X-B, et al (2010) Global distribution of Y-chromosome haplogroup C reveals the prehistoric migration routes of African exodus and early settlement in East Asia. *Journal of Human Genetics* 55:428–435.
277. Cinnioğlu C, King R, Kivisild T, et al (2004) Excavating Y-chromosome haplotype strata in Anatolia. *Hum Genet* 114:127–148. <https://doi.org/10.1007/s00439-003-1031-4>
278. Rootsi S, Magri C, Kivisild T, et al (2004) Phylogeography of Y-chromosome haplogroup I reveals distinct domains of prehistoric gene flow in Europe. *Am J Hum Genet* 75:128–137. <https://doi.org/10.1086/422196>
279. Semino O, Magri C, Benuzzi G, et al (2004) Origin, diffusion, and differentiation of Y-chromosome haplogroups E and J: inferences on the neolithization of Europe and later migratory events in the Mediterranean area. *Am J Hum Genet* 74:1023–1034. <https://doi.org/10.1086/386295>
280. Scheinfeldt L, Friedlaender F, Friedlaender J, et al (2006) Unexpected NRY chromosome variation in Northern Island Melanesia. *Mol Biol Evol* 23:1628–1641.
281. Zegura SL, Karafet TM, Zhivotovsky LA, Hammer MF (2004) High-resolution SNPs and microsatellite haplotypes point to a single, recent entry of Native American Y chromosomes into the Americas. *Mol Biol Evol* 21:164–175.
282. Genséric H (2013) GÉNÉTIQUEMENT, LES MAGHRÉBINS NE SONT PAS DES ARABES. http://www.amazighworld.org/history/index_show.php?id=4106. Accessed 3 Mar 2018
283. Fadhlouï-Zid K, Dugoujon J-M, Elgaaïed A, et al (2004) Genetic diversity in Tunisia: a study based on the GM polymorphism of human immunoglobulins. *Hum Biol* 76:559–567
284. Yacoubi Loveslati B, Sanchez-Mazas A, Ennafaa H, et al (2001) A study of Gm allotypes and immunoglobulin heavy gamma IGHG genes in Berbers, Arabs and sub-Saharan Africans from Jerba Island, Tunisia. *European Journal of Immunogenetics* 28:531–538.
285. Abdennaji Guenounou B, Loueslati BY, Buhler S, et al (2006) HLA class II genetic diversity in southern Tunisia and the Mediterranean area. *International Journal of Immunogenetics* 33:93–103. <https://doi.org/10.1111/j.1744-313X.2006.00577.x>
286. Fadhlouï-Zid K, Buhler S, Dridi A, et al (2010) Polymorphism of HLA class II genes in Berbers from Southern Tunisia. *Tissue Antigens* 76:416–420.
287. Bosch E, Clarimón J, Pérez-Lezaun A, Calafell F (2001) STR data for 21 loci in northwestern Africa. *Forensic Science International* 116:41–51.
288. Khodjet-El-Khil H, Fadhlouï-Zid K, Gusmão L, et al (2008) Substructure of a Tunisian Berber Population as Inferred from 15 Autosomal Short Tandem Repeat Loci. *Human Biology* 80:435–448. <https://doi.org/10.3378/1534-6617-80.4.435>
289. Ennafaa H, Amor MB, Yacoubi-Loueslati B, et al (2006) Alu polymorphisms in Jerba Island population (Tunisia): comparative study in Arab and Berber groups. *Ann Hum Biol* 33:634–640

290. Frigi S, Ennafaa H, Ben Amor M, et al (2011) Assessing human genetic diversity in Tunisian Berber populations by Alu insertion polymorphisms. *Ann Hum Biol* 38:53–58. <https://doi.org/10.3109/03014460.2010.490241>
291. Khodjet el Khil H, Marrakchi RT, Loueslati BY, et al (2005) Distribution of Y chromosome lineages in Jerba island population. *Forensic Sci Int* 148:211–218.
292. Onofri V, Alessandrini F, Turchi C, et al (2008) Y-chromosome markers distribution in Northern Africa: High-resolution SNP and STR analysis in Tunisia and Morocco populations. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 1:235–236. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2007.10.173>
293. Uhlmann RF, Larson EB (1991) Effect of education on the mini-mental state examination as a screening test for dementia. *J Am Geriatr Soc* 39:876–880
294. Wang Y-P, Gorenstein C (2013) Assessment of depression in medical patients: A systematic review of the utility of the Beck Depression Inventory-II. *Clinics (Sao Paulo)* 68:1274–1287. [https://doi.org/10.6061/clinics/2013\(09\)15](https://doi.org/10.6061/clinics/2013(09)15)
295. Tomlinson CL, Stowe R, Patel S, et al (2010) Systematic review of levodopa dose equivalency reporting in Parkinson's disease. *Mov Disord* 25:2649–2653.
296. Jankovic J, McDermott M, Carter J, et al (1990) Variable expression of Parkinson's disease: a base-line analysis of the DATATOP cohort. The Parkinson Study Group. *Neurology* 40:1529–1534
297. Ashkenazy H, Erez E, Martz E, et al (2010) ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 38:W529–W533. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq399>
298. Mathe E, Olivier M, Kato S, et al (2006) Computational approaches for predicting the biological effect of p53 missense mutations: a comparison of three sequence analysis based methods. *Nucleic Acids Res* 34:1317–1325.
299. Choi Y, Chan AP (2015) PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics* 31:2745–2747. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv195>
300. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR (2013) Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet* Chapter 7:Unit7.20.
301. Ferrer-Costa C, Orozco M, de la Cruz X (2002) Characterization of disease-associated single amino acid polymorphisms in terms of sequence and structure properties. *J Mol Biol* 315:771–786. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5255>
302. Capriotti E, Calabrese R, Casadio R (2006) Predicting the insurgence of human genetic diseases associated to single point protein mutations with support vector machines and evolutionary information. *Bioinformatics* 22:2729–2734.
303. Calabrese R, Capriotti E, Fariselli P, et al (2009) Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins. *Hum Mutat* 30:1237–1244. <https://doi.org/10.1002/humu.21047>
304. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D (2014) MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* 11:361–362.
305. Li B, Krishnan VG, Mort ME, et al (2009) Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. *Bioinformatics* 25:2744–2750. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp528>
306. Capriotti E, Fariselli P, Casadio R (2005) I-Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. *Nucleic Acids Res* 33:W306–W310. <https://doi.org/10.1093/nar/gki375>

307. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30:e57
308. de Boer S, White SJ (2017) Genotyping Multiallelic Copy Number Variation with Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA). *Methods Mol Biol* 1492:147–153. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6442-0_9
309. Trinh J, Gustavsson EK, Vilariño-Güell C, et al (2016) DNMT3 and genetic modifiers of age of onset in LRRK2 Gly2019Ser parkinsonism: a genome-wide linkage and association study. *The Lancet Neurology* 15:1248–1256.
310. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* 11:1026–1030
311. Poitras E, Houde A (2002) La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology* 2:2–11
312. Venegas V, Wang J, Dimmock D, Wong L-J (2011) Real-time quantitative PCR analysis of mitochondrial DNA content. *Curr Protoc Hum Genet Chapter 19:Unit 19.7*. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg1907s68>
313. Dimmock D, Tang L-Y, Schmitt ES, Wong L-JC (2010) Quantitative Evaluation of the Mitochondrial DNA Depletion Syndrome. *Clinical Chemistry* 56:1119–1127.
314. West AB, Moore DJ, Biskup S, et al (2005) Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16842–16847. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507360102>
315. Jaleel M, Nichols RJ, Deak M, et al (2007) LRRK2 phosphorylates moesin at threonine-558: characterization of how Parkinson's disease mutants affect kinase activity. *Biochem J* 405:307–317. <https://doi.org/10.1042/BJ20070209>
316. Lesage S, Ibanez P, Lohmann E, et al (2005) G2019S LRRK2 mutation in French and North African families with Parkinson's disease. *Annals of Neurology* 58:784–787. <https://doi.org/10.1002/ana.20636>
317. Landoulsi Z, Benromdhan S, Ben Djebara M, et al (2017) Using KASP technique to screen LRRK2 G2019S mutation in a large Tunisian cohort. *BMC Med Genet* 18. <https://doi.org/10.1186/s12881-017-0432-5>
318. Di Fonzo A, Rohé CF, Ferreira J, et al (2005) A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease. *Lancet* 365:412–415. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17829-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17829-5)
319. Nichols WC, Pankratz N, Hernandez D, et al (2005) Genetic screening for a single common LRRK2 mutation in familial Parkinson's disease. *The Lancet* 365:410–412. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17828-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17828-3)
320. Gilks WP, Abou-Sleiman PM, Gandhi S, et al (2005) A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *Lancet* 365:415–416.
321. Vijayan B, Gopala S, Kishore A (2011) LRRK2 G2019S mutation does not contribute to Parkinson's disease in South India. *Neurology India* 59:157.
322. Cornejo-Olivas M, Torres L, Velit-Salazar MR, et al (2017) Variable frequency of LRRK2 variants in the Latin American research consortium on the genetics of Parkinson's disease (LARGE-PD), a case of ancestry. *NPJ Parkinsons Dis* 3. <https://doi.org/10.1038/s41531-017-0020-6>
323. Thaler A, Ash E, Gan-Or Z, et al (2009) The LRRK2 G2019S mutation as the cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *J Neural Transm (Vienna)* 116:1473–1482. <https://doi.org/10.1007/s00702-009-0303-0>

324. Ozelius LJ, Senthil G, Saunders-Pullman R, et al (2006) LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 354:424–425. <https://doi.org/10.1056/NEJMc055509>
325. Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS, et al (2008) Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *The Lancet Neurology* 7:583–590.
326. Change N, Mercier G, Lucotte G (2008) Genetic screening of the G2019S mutation of the LRRK2 gene in Southwest European, North African, and Sephardic Jewish subjects. *Genet Test* 12:333–339. <https://doi.org/10.1089/gte.2007.0098>
327. Warren L, Gibson R, Ishihara L, et al (2008) A founding LRRK2 haplotype shared by Tunisian, US, European and Middle Eastern families with Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders* 14:77–80.
328. Goldwurm S, Fonzo A, Simons E, et al (2005) The G6055A (G2019S) mutation in LRRK2 is frequent in both early and late onset Parkinson's disease and originates from a common ancestor. *J Med Genet* 42:e65.
329. Kachergus J, Mata IF, Hulihan M, et al (2005) Identification of a Novel LRRK2 Mutation Linked to Autosomal Dominant Parkinsonism: Evidence of a Common Founder across European Populations. *Am J Hum Genet* 76:672–680
330. Lesage S, Leutenegger A-L, Ibanez P, et al (2005) LRRK2 Haplotype Analyses in European and North African Families with Parkinson Disease: A Common Founder for the G2019S Mutation Dating from the 13th Century. *Am J Hum Genet* 77:330–332
331. Zabetian CP, Hutter CM, Yearout D, et al (2006) LRRK2 G2019S in Families with Parkinson Disease Who Originated from Europe and the Middle East: Evidence of Two Distinct Founding Events Beginning Two Millennia Ago. *Am J Hum Genet* 79:752–758
332. Zabetian CP, Morino H, Ujike H, et al (2006) Identification and haplotype analysis of LRRK2 G2019S in Japanese patients with Parkinson disease. *Neurology* 67:697–699. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000227732.37801.d4>
333. Tomiyama H, Li Y, Funayama M, et al (2006) Clinicogenetic study of mutations in LRRK2 exon 41 in Parkinson's disease patients from 18 countries. *Mov Disord* 21:1102–1108. <https://doi.org/10.1002/mds.20886>
334. Bar-Shira A, Hutter CM, Giladi N, et al (2009) Ashkenazi Parkinson's disease patients with the LRRK2 G2019S mutation share a common founder dating from the second to fifth centuries. *neurogenetics* 10:355–358.
335. Ben El Haj R, Salmi A, Regragui W, et al (2017) Evidence for prehistoric origins of the G2019S mutation in the North African Berber population. *PLoS One* 12:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181335>
336. Lucotte G, David D, Change N (2012) New contribution on the LRRK2 G2019S mutation associated to Parkinson's disease: age estimation of a common founder event of old age in Moroccan Berbers. *International Journal of Modern Anthropology* 1:11–22. <https://doi.org/10.4314/ijma.v1i5.1>
337. Al-Mubarak BR, Bohlega SA, Alkhairallah TS, et al (2015) Parkinson's Disease in Saudi Patients: A Genetic Study. *PLoS One* 10:.
338. Hashad DI, Abou-Zeid AA, Achmawy GA, et al (2011) G2019S mutation of the leucine-rich repeat kinase 2 gene in a cohort of Egyptian patients with Parkinson's disease. *Genet Test Mol Biomarkers* 15:861–866.
339. Desoky E, Khedr E, Khalil M, Gasser T (2015) Genetic Analysis of Leucin-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) G2019S Mutation in a Sample of Egyptian Patients with

- Parkinson's Disease, a Pilot Study. *British Journal of Medicine and Medical Research* 5:404–408. <https://doi.org/10.9734/BJMMR/2015/10458>
340. Cruciani F, La Fratta R, Santolamazza P, et al (2004) Phylogeographic Analysis of Haplogroup E3b (E-M215) Y Chromosomes Reveals Multiple Migratory Events Within and Out Of Africa. *Am J Hum Genet* 74:1014–1022
341. Kestenbaum M, Alcalay RN (2017) Clinical Features of LRRK2 Carriers with Parkinson's Disease. In: *Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2)*. Springer, Cham, pp 31–48
342. San Luciano M, Wang C, Ortega RA, et al (2017) Sex differences in LRRK2 G2019S and idiopathic Parkinson's Disease. *Ann Clin Transl Neurol* 4:801–810.
343. Marder K, Wang Y, Alcalay RN, et al (2015) Age-specific penetrance of LRRK2 G2019S in the Michael J. Fox Ashkenazi Jewish LRRK2 Consortium. *Neurology* 85:89–95. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001708>
344. Yahalom G, Orlev Y, Cohen OS, et al (2014) Motor progression of Parkinson's disease with the leucine-rich repeat kinase 2 G2019S mutation. *Movement Disorders* 29:1057–1060. <https://doi.org/10.1002/mds.25931>
345. Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS, et al (2008) Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol* 7:583–590.
346. Marras C, Schuele B, Munhoz RP, et al (2011) Phenotype in parkinsonian and nonparkinsonian LRRK2 G2019S mutation carriers. *Neurology* 77:325–333.
347. Alcalay RN, Mirelman A, Saunders-Pullman R, et al (2013) Parkinson Disease Phenotype in Ashkenazi Jews with and without LRRK2 G2019S mutations. *Mov Disord* 28:. <https://doi.org/10.1002/mds.25647>
348. Trinh J, Amouri R, Duda JE, et al (2014) A comparative study of Parkinson's disease and leucine-rich repeat kinase 2 p.G2019S parkinsonism. *Neurobiology of Aging* 35:1125–1131. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.015>
349. Bouhouche A, Tibar H, Ben El Haj R, et al (2017) LRRK2 G2019S Mutation: Prevalence and Clinical Features in Moroccans with Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis* 2017:. <https://doi.org/10.1155/2017/2412486>
350. Ishihara L, Gibson RA, Warren L, et al (2007) Screening for Lrrk2 G2019S and clinical comparison of Tunisian and North American Caucasian Parkinson's disease families. *Movement Disorders* 22:55–61.
351. Marras C, Alcalay RN, Caspell-Garcia C, et al (2016) Motor and nonmotor heterogeneity of LRRK2-related and idiopathic Parkinson's disease. *Mov Disord* 31:1192–1202. <https://doi.org/10.1002/mds.26614>
352. Mirelman A, Heman T, Yasinovsky K, et al (2013) Fall risk and gait in Parkinson's disease: The role of the LRRK2 G2019S mutation. *Movement Disorders* 28:1683–1690. <https://doi.org/10.1002/mds.25587>
353. Alcalay RN, Mejia-Santana H, Mirelman A, et al (2015) Neuropsychological performance in LRRK2 G2019S carriers with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 21:106–110. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2014.09.033>
354. Saunders-Pullman R, Mirelman A, Alcalay RN, et al (2018) Progression in the LRRK2 -Associated Parkinson Disease Population. *JAMA Neurology* 75:312.
355. Somme JH, Molano Salazar A, Gonzalez A, et al (2015) Cognitive and behavioral symptoms in Parkinson's disease patients with the G2019S and R1441G mutations of the LRRK2 gene. *Parkinsonism & Related Disorders* 21:494–499.
356. Srivatsal S, Cholerton B, Leverenz JB, et al (2015) Cognitive Profile of LRRK2-related Parkinson's Disease. *Mov Disord* 30:728–733.

357. Ben Sassi S, Nabli F, Hentati E, et al (2012) Cognitive dysfunction in Tunisian LRRK2 associated Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders* 18:243–246. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2011.10.009>
358. Cilia R, Siri C, Rusconi D, et al (2014) LRRK2 mutations in Parkinson's disease: Confirmation of a gender effect in the Italian population. *Parkinsonism Relat Disord* 20:911–914. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2014.04.016>
359. Gan-Or Z, Leblond CS, Mallett V, et al (2015) LRRK2 mutations in Parkinson disease; a sex effect or lack thereof? A meta-analysis. *Parkinsonism & Related Disorders* 21:778–782. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2015.05.002>
360. Georgiev D, Hamberg K, Hariz M, et al (2017) Gender differences in Parkinson's disease: A clinical perspective. *Acta Neurol Scand* 136:570–584.
361. Ishihara L, Warren L, Gibson R, et al (2006) Clinical Features of Parkinson Disease Patients With Homozygous Leucine-Rich Repeat Kinase 2 G2019S Mutations. *Archives of Neurology* 63:1250. <https://doi.org/10.1001/archneur.63.9.1250>
362. Mettlen M, Pucadyil T, Ramachandran R, Schmid SL (2009) Dissecting dynamin's role in clathrin-mediated endocytosis. *Biochem Soc Trans* 37:1022–1026.
363. Stafa K, Tsika E, Moser R, et al (2014) Functional interaction of Parkinson's disease-associated LRRK2 with members of the dynamin GTPase superfamily. *Hum Mol Genet* 23:2055–2077. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt600>
364. Fernández-Santiago R, Garrido A, Infante J, et al (2018) α -synuclein (SNCA) but not dynamin 3 (DNM3) influences age at onset of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) Parkinson's disease in Spain. *Mov Disord* 33:637–641.
365. Aharon-Peretz J, Rosenbaum H, Gershoni-Baruch R (2004) Mutations in the Glucocerebrosidase Gene and Parkinson's Disease in Ashkenazi Jews. *New England Journal of Medicine* 351:1972–1977.
366. Eblan MJ, Walker JM, Sidransky E (2005) The glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 352:728–731; author reply 728–731. <https://doi.org/10.1056/NEJM200502173520719>
367. Alfonso P, Rodríguez-Rey JC, Gañán A, et al (2004) Expression and functional characterization of mutated glucocerebrosidase alleles causing Gaucher disease in Spanish patients. *Blood Cells Mol Dis* 32:218–225
368. Pasmanik-Chor M, Madar-Shapiro L, Stein EO, et al (1997) Expression of mutated glucocerebrosidase alleles in human cells. *Hum Mol Genet* 6:887–895
369. Blech-Hermoni YN, Ziegler SG, Hruska KS, et al (2010) In silico and functional studies of the regulation of the glucocerebrosidase gene. *Mol Genet Metab* 99:275–282. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2009.10.189>
370. Manickam M, Ramanan P, Singh P, Talwar P (2014) In silico identification of genetic variants in glucocerebrosidase (GBA) gene involved in Gaucher's disease using multiple software tools. *Front Genet* 5:148.
371. Koprivica V, Stone DL, Park JK, et al (2000) Analysis and classification of 304 mutant alleles in patients with type 1 and type 3 Gaucher disease. *Am J Hum Genet* 66:1777–1786. <https://doi.org/10.1086/302925>
372. Gan-Or Z, Amshalom I, Kilarski LL, et al (2015) Differential effects of severe vs mild GBA mutations on Parkinson disease. *Neurology* 84:880–887.
373. Thaler A, Bregman N, Gurevich T, et al (2018) Parkinson's disease phenotype is influenced by the severity of the mutations in the GBA gene. *Parkinsonism Relat Disord*. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2018.05.009>

374. Suwannarat P, Keeratchamroen S, Wattanasirichaigoon D, et al (2007) Molecular characterization of type 3 (neuronopathic) Gaucher disease in Thai patients. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 39:348–352.
375. Nuytemans K, Meeus B, Crosiers D, et al Relative contribution of simple mutations vs. copy number variations in five Parkinson disease genes in the Belgian population. *Human Mutation* 30:1054–1061.
376. Ross OA, Soto-Ortolaza AI, Heckman MG, et al (2011) LRRK2 exonic variants and susceptibility to Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 10:898–908.
377. Di Fonzo A, Tassorelli C, De Mari M, et al (2006) Comprehensive analysis of the LRRK2 gene in sixty families with Parkinson's disease. *Eur J Hum Genet* 14:322–331. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201539>
378. Lesage S, Condroyer C, Lannuzel A, et al (2009) Molecular analyses of the LRRK2 gene in European and North African autosomal dominant Parkinson's disease. *J Med Genet* 46:458–464. <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.062612>
379. Paisán-Ruíz C, Nath P, Washecka N, et al Comprehensive analysis of LRRK2 in publicly available Parkinson's disease cases and neurologically normal controls. *Human Mutation* 29:485–490. <https://doi.org/10.1002/humu.20668>
380. Paisán-Ruíz C, Lang AE, Kawarai T, et al (2005) LRRK2 gene in Parkinson disease: mutation analysis and case control association study. *Neurology* 65:696–700.
381. Benitez BA, Davis AA, Jin SC, et al (2016) Resequencing analysis of five Mendelian genes and the top genes from genome-wide association studies in Parkinson's Disease. *Molecular Neurodegeneration* 11:29.
382. Foo JN, Tan LC, Liany H, et al (2014) Analysis of non-synonymous-coding variants of Parkinson's disease-related pathogenic and susceptibility genes in East Asian populations. *Hum Mol Genet* 23:3891–3897.
383. Pankratz N, Kissell DK, Pauciulo MW, et al (2009) Parkin dosage mutations have greater pathogenicity in familial PD than simple sequence mutations. *Neurology* 73:279–286. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181af7a33>
384. Mata IF, Alvarez V, Coto E, et al (2005) Homozygous partial genomic triplication of the parkin gene in early-onset parkinsonism. *Neuroscience Letters* 380:257–259.
385. Hedrich K, Kann M, Lanthaler AJ, et al (2001) The importance of gene dosage studies: mutational analysis of the parkin gene in early-onset parkinsonism. *Hum Mol Genet* 10:1649–1656
386. Foroud T, Uniacke SK, Liu L, et al (2003) Heterozygosity for a mutation in the parkin gene leads to later onset Parkinson disease. *Neurology* 60:796–801
387. Illarioshkin SN, Periquet M, Rawal N, et al (2003) Mutation analysis of the parkin gene in Russian families with autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Mov Disord* 18:914–919. <https://doi.org/10.1002/mds.10467>
388. Djarmati A, Hedrich K, Svetel M, et al (2004) Detection of Parkin (PARK2) and DJ1 (PARK7) mutations in early-onset Parkinson disease: Parkin mutation frequency depends on ethnic origin of patients. *Hum Mutat* 23:525.
389. Shyu W-C, Lin S-Z, Chiang M-F, et al (2005) Early-onset Parkinson's disease in a Chinese population: 99mTc-TRODAT-1 SPECT, Parkin gene analysis and clinical study. *Parkinsonism Relat Disord* 11:173–180.
390. Inzelberg R, Hattori N, Mizuno Y (2005) Dopaminergic dysfunction in unrelated, asymptomatic carriers of a single parkin mutation. *Neurology* 65:1843.
391. Chaudhary S, Behari M, Dihana M, et al (2006) Parkin mutations in familial and sporadic Parkinson's disease among Indians. *Parkinsonism Relat Disord* 12:239–245. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2005.12.004>

392. Chung EJ, Ki C-S, Lee WY, et al (2006) Clinical features and gene analysis in Korean patients with early-onset Parkinson disease. *Arch Neurol* 63:1170–1174.
393. Mani M, Lee SY, Lucast L, et al (2007) The dual phosphatase activity of synaptojanin1 is required for both efficient synaptic vesicle endocytosis and reavailability at nerve terminals. *Neuron* 56:1004–1018.
394. McPherson PS, Garcia EP, Slepnev VI, et al (1996) A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature* 379:353–357. <https://doi.org/10.1038/379353a0>
395. Di Paolo G, De Camilli P (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443:651–657.
396. Perera RM, Zoncu R, Lucast L, et al (2006) Two synaptojanin 1 isoforms are recruited to clathrin-coated pits at different stages. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:19332–19337. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609795104>
397. Tsujishita Y, Guo S, Stolz LE, et al (2001) Specificity determinants in phosphoinositide dephosphorylation: crystal structure of an archetypal inositol polyphosphate 5-phosphatase. *Cell* 105:379–389
398. Soda K, Balkin DM, Ferguson SM, et al (2012) Role of dynamin, synaptojanin, and endophilin in podocyte foot processes. *J Clin Invest* 122:4401–4411.
399. Krauß M, Haucke V (2007) Phosphoinositide-metabolizing enzymes at the interface between membrane traffic and cell signalling. *EMBO reports* 8:241–246.
400. Praefcke GJ, Ford MG, Schmid EM, et al (2004) Evolving nature of the AP2 α -appendage hub during clathrin-coated vesicle endocytosis. *The EMBO Journal* 23:4371–4383. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600445>
401. Haffner C, Takei K, Chen H, et al (1997) Synaptojanin 1: localization on coated endocytic intermediates in nerve terminals and interaction of its 170 kDa isoform with Eps15. *FEBS Letters* 419:175–180.
402. Mettlen M, Stoeber M, Loerke D, et al (2009) Endocytic Accessory Proteins Are Functionally Distinguished by Their Differential Effects on the Maturation of Clathrin-coated Pits. *Mol Biol Cell* 20:3251–3260.
403. Schmid EM, Ford MGJ, Burtey A, et al (2006) Role of the AP2 β -Appendage Hub in Recruiting Partners for Clathrin-Coated Vesicle Assembly. *PLoS Biol* 4:. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040262>
404. Olgiati S, De Rosa A, Quadri M, et al (2014) PARK20 caused by SYNJ1 homozygous Arg258Gln mutation in a new Italian family. *Neurogenetics* 15:183–188.
405. Kirola L, Behari M, Shishir C, Thelma BK (2016) Identification of a novel homozygous mutation Arg459Pro in SYNJ1 gene of an Indian family with autosomal recessive juvenile Parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord* 31:124–128. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.07.014>
406. Dymant DA, Smith AC, Humphreys P, et al (2015) Homozygous nonsense mutation in SYNJ1 associated with intractable epilepsy and tau pathology. *Neurobiol Aging* 36:1222.e1–5. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.005>
407. Taghavi S, Chaouni R, Tafakhori A, et al (2017) A Clinical and Molecular Genetic Study of 50 Families with Autosomal Recessive Parkinsonism Revealed Known and Novel Gene Mutations. *Mol Neurobiol*.
408. Picillo M, Ranieri A, Orefice G, et al (2014) Clinical progression of SYNJ1-related early onset atypical parkinsonism: 3-year follow up of the original Italian family. *J Neurol* 261:823–824. <https://doi.org/10.1007/s00415-014-7270-6>
409. Ishihara-Paul L, Hulihan MM, Kachergus J, et al (2008) PINK1 mutations and parkinsonism. *Neurology* 71:896–902.

410. Bonifati V, Rohé CF, Breedveld GJ, et al (2005) Early-onset parkinsonism associated with PINK1 mutations: frequency, genotypes, and phenotypes. *Neurology* 65:87–95. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000167546.39375.82>
411. Weng Y-H, Chou Y-HW, Wu W-S, et al (2007) PINK1 mutation in Taiwanese early-onset parkinsonism : clinical, genetic, and dopamine transporter studies. *J Neurol* 254:1347–1355. <https://doi.org/10.1007/s00415-007-0534-7>
412. Koros C, Simitsi A, Stefanis L (2017) Genetics of Parkinson's Disease. In: *International Review of Neurobiology*. Elsevier, pp 197–231
413. Kim CY, Alcalay RN (2017) Genetic Forms of Parkinson's Disease. *Semin Neurol* 37:135–146. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1601567>
414. Kasten M, Hartmann C, Hampf J, et al (2018) Genotype-Phenotype Relations for the Parkinson's Disease Genes Parkin, PINK1, DJ1: MDSGene Systematic Review. *Movement Disorders* 33:730–741. <https://doi.org/10.1002/mds.27352>
415. Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, et al (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res* 37:D233–D238. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn663>
416. Crawley AC (2007) Developmental Analysis of CNS Pathology in the Lysosomal Storage Disease α -Mannosidosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:11
417. Tulsiani DR, Touster O (1983) Swainsonine, a potent mannosidase inhibitor, elevates rat liver and brain lysosomal alpha-D-mannosidase, decreases Golgi alpha-D-mannosidase II, and increases the plasma levels of several acid hydrolases. *Arch Biochem Biophys* 224:594–600
418. NOVIKOFF, PM, TOUSTER O, NOVIKOFF AB, TULSIANI DP (1985) Effects of swainsonine on rat liver and kidney: biochemical and morphological studies. *J Cell Biol* 101:339–349
419. Crawley AC, Walkley SU (2007) Developmental Analysis of CNS Pathology in the Lysosomal Storage Disease α -Mannosidosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:687–697. <https://doi.org/10.1097/nen.0b013e31812503b6>
420. Siegel DA, Walkley SU (1994) Growth of ectopic dendrites on cortical pyramidal neurons in neuronal storage diseases correlates with abnormal accumulation of GM2 ganglioside. *J Neurochem* 62:1852–1862
421. Goodman LA, Livingston PO, Walkley SU (1991) Ectopic dendrites occur only on cortical pyramidal cells containing elevated GM2 ganglioside in alpha-mannosidosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:11330–11334
422. Vandeveld M, Fankhauser R, Bichsel P, et al (1982) Hereditary neurovisceral mannosidosis associated with alpha-mannosidase deficiency in a family of Persian cats. *Acta Neuropathol* 58:64–68
423. Vite CH, McGowan JC, Braund KG, et al (2001) Histopathology, electrodiagnostic testing, and magnetic resonance imaging show significant peripheral and central nervous system myelin abnormalities in the cat model of alpha-mannosidosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:817–828
424. Mootha VK, Bunkenborg J, Olsen JV, et al (2003) Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell* 115:629–640
425. Gilquin B, Taillebourg E, Cherradi N, et al (2010) The AAA+ ATPase ATAD3A Controls Mitochondrial Dynamics at the Interface of the Inner and Outer Membranes. *Mol Cell Biol* 30:1984–1996. <https://doi.org/10.1128/MCB.00007-10>

426. Fang H-Y, Chang C-L, Hsu S-H, et al (2010) ATPase family AAA domain-containing 3A is a novel anti-apoptotic factor in lung adenocarcinoma cells. *J Cell Sci* 123:1171–1180. <https://doi.org/10.1242/jcs.062034>
427. Hoffmann M, Bellance N, Rossignol R, et al (2009) *C. elegans* ATAD-3 Is Essential for Mitochondrial Activity and Development. *PLoS ONE* 4:e7644.
428. Harel T, Yoon WH, Garone C, et al (2016) Recurrent De Novo and Biallelic Variation of ATAD3A, Encoding a Mitochondrial Membrane Protein, Results in Distinct Neurological Syndromes. *The American Journal of Human Genetics* 99:831–845. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.08.007>
429. Cooper HM, Yang Y, Ylikallio E, et al (2017) ATPase-deficient mitochondrial inner membrane protein ATAD3A disturbs mitochondrial dynamics in dominant hereditary spastic paraplegia. *Hum Mol Genet* 26:1432–1443.
430. Rötig A, Poulton J (2009) Genetic causes of mitochondrial DNA depletion in humans. *Biochim Biophys Acta* 1792:1103–1108.
431. Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, et al (1998) Insulin-degrading Enzyme Regulates Extracellular Levels of Amyloid β -Protein by Degradation. *J Biol Chem* 273:32730–32738. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.49.32730>
432. Vekrellis K, Ye Z, Qiu WQ, et al (2000) Neurons regulate extracellular levels of amyloid beta-protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme. *J Neurosci* 20:1657–1665
433. Malito E, Ralat LA, Manolopoulou M, et al (2008) Molecular bases for the recognition of short peptide substrates and cysteine-directed modifications of human insulin-degrading enzyme. *Biochemistry* 47:12822–12834.
434. Miller BC, Eckman EA, Sambamurti K, et al (2003) Amyloid- β peptide levels in brain are inversely correlated with insulin activity levels in vivo. *PNAS* 100:6221–6226. <https://doi.org/10.1073/pnas.1031520100>
435. Leissring MA, Farris W, Chang AY, et al (2003) Enhanced Proteolysis of β -Amyloid in APP Transgenic Mice Prevents Plaque Formation, Secondary Pathology, and Premature Death. *Neuron* 40:1087–1093.
436. Farris W, Mansourian S, Chang Y, et al (2003) Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid β -protein, and the β -amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:4162–4167. <https://doi.org/10.1073/pnas.0230450100>
437. Hiltunen M, van Groen T, Jolkkonen J (2009) Functional Roles of Amyloid- β Protein Precursor and Amyloid- β Peptides: Evidence from Experimental Studies. *Journal of Alzheimer's Disease* 18:401–412.
438. Sisodia SS, Price DL (1995) Role of the beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *FASEB J* 9:366–370
439. LaFerla FM, Tinkle BT, Bieberich CJ, et al (1995) The Alzheimer's A beta peptide induces neurodegeneration and apoptotic cell death in transgenic mice. *Nat Genet* 9:21–30. <https://doi.org/10.1038/ng0195-21>
440. Terry RD (2006) Alzheimer's disease and the aging brain. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 19:125–128. <https://doi.org/10.1177/0891988706291079>
441. Carrell RW (2005) Cell toxicity and conformational disease. *Trends in Cell Biology* 15:574–580. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.09.005>
442. Tsigelny IF, Crews L, Desplats P, et al (2008) Mechanisms of Hybrid Oligomer Formation in the Pathogenesis of Combined Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *PLoS One* 3:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003135>

443. Oláh J, Vincze O, Virók D, et al (2011) Interactions of pathological hallmark proteins: tubulin polymerization promoting protein/p25, beta-amyloid, and alpha-synuclein. *J Biol Chem* 286:34088–34100.
444. Hu X, Kim JA, Castillo A, et al (2011) NBA1/MERIT40 and BRE Interaction Is Required for the Integrity of Two Distinct Deubiquitinating Enzyme BRCC36-containing Complexes. *J Biol Chem* 286:11734–11745.
445. Feng L, Huang J, Chen J (2009) MERIT40 facilitates BRCA1 localization and DNA damage repair. *Genes Dev* 23:719–728. <https://doi.org/10.1101/gad.1770609>
446. Gwinn-Hardy K, Singleton A, O'Suilleabhain P, et al (2001) Spinocerebellar ataxia type 3 phenotypically resembling parkinson disease in a black family. *Arch Neurol* 58:296–299
447. Unal Gulsuner H, Gulsuner S, Mercan FN, et al (2014) Mitochondrial serine protease HTRA2 p.G399S in a kindred with essential tremor and Parkinson disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111:18285–18290.
448. Caillet-Boudin M-L, Buée L, Sergeant N, Lefebvre B (2015) Regulation of human MAPT gene expression. *Molecular Neurodegeneration* 10:28.
449. Lindwall G, Cole RD (1984) Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem* 259:5301–5305
450. Wray S, Lewis PA (2010) A Tangled Web – Tau and Sporadic Parkinson's Disease. *Front Psychiatry* 1:. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2010.00150>

Annexes

Fiche Diagnostique de la Maladie de Parkinson

DONNEES PERSONELLES

Date : N° Dossier (préciser interne ou externe) :
Nom : Date de Naissance:
Age à l'examen : Sexe: M F Pays :
Adresse :
..... N° Tél :

ANTECEDENTS ET HABITUDES

Diabète Dyslipidémie Tabagisme Ethylisme
Cardiopathie AVC répétitifs Traumatisme crânien Tremblement essentiel

TRANSMISSION

Consanguinité : Non Oui Degré :
Cas similaire dans la famille : Non Oui Nombre de cas :
Mode de transmission :
Autres maladie génétiques familiales : Non Oui Autre :
Tremblement sénile Maladie d'Alzheimer

ELEMENTS DU DIAGNOSTIC

A-Syndrome parkinsonien :

1) Akinésie : Oui Non
2) Rigidité : Oui Non
3) Tremblement de repos : Oui Non
4) Instabilité posturale : Oui Non

B-Critères d'exclusion :

Instabilité posturale sévère et chutes précoce (<1 an) : Oui Non
Syndrome pyramidal franc : Oui Non
Syndrome cérébelleux : Oui Non
Signes corticaux pariétaux asymétriques : Oui Non
Signes sensitifs, apraxie, main étrangère : Oui Non
Incontinence précoce (< 1 an) : Oui Non
Démence précoce (<2 ans) : Oui Non
Paralyse supranucléaire de la verticalité : Oui Non
Dysphagie/dysarthrie : Oui Non
Progression rapide : Oui Non
Absence de réponse prolongée à Lévodopa : Oui Non
Signes d'atteinte de la corne antérieure : Oui Non
ATCD d'AVC répétés : Oui Non

C - Examens complémentaires : Faits Non faits 1) Scanner et/ou IRM cérébrale : Non fait Normal Anormal :

2) Avant 40 ans

- Cuprémie : Non fait Normal Elevé - Cuprurie : Non fait Normal Elevé - Céruléoplasmine : Non fait Normal Bas - Recherche d'anneau de Kayser Fleischer : Non fait Présent Absent 3) Recherche d'acanthocytes : Non fait Présent Absent **CARACTERISTIQUES DU SYNDROME PARKINSONIEN****A- Age de début** : **B- Durée d'évolution** :**B- Début** : Unilatéral : Oui Non Billatéral : Oui Non Membre sup : Droit Gauche Membre inf : Droit Gauche **B- Signes de début** :- Tremblement fin, distal : De repos D'attitude : M. sup G M. sup G M. inf G M. inf G

- Akinésie : siège :

- Dystonie : siège :

- Raideur ou crampes : siège.....

C-Examen actuel :

- Syndrome parkinsonien :

Forme : Tremblant Akinéto-rigide Tremo-akineto-rigide Unilatéral Billatéral Prédominant d'un coté - ROT : Présents Vifs Diminués Abolis **SIGNES ASSOCIÉES ET COMPLICATIONS**1- Douleurs et signes sensitifs : Non Oui - Crampes et contractions musculaires du cou, rachis lombaire ,mollets - Signes sensitifs (fourmillements brûlures,engourdissement) - Douleurs diffuses - Syndrome des jambes sans repos - Douleurs cordonales postérieures - Douleurs radiculaires et tronculaires(sciatalgies cruralgies...)

- 2- Troubles du sommeil : Non Oui
- Insomnie initiale
 - Insomnie de 2ème partie de nuit
 - Fragmentation du sommeil ++
 - Comportements nocturnes anormaux: agressivité, agitation, propos
 - Hallucinations et confusion

- 3- Troubles neurovégétatifs : Non Oui
- Digestifs : Non Oui
 - Hypersialorrhée Dysphagie RGO Nausée Constipation
 - Troubles vésicosphinctériens : Non Oui
 - Fuites-impériosité-pollakiurie-énurésie nocturne
 - Dysurie- Rétention
 - Dysfonction érectile-impuissance
 - Hypotension orthostatique: Non Oui

TRAITEMENTS

- DOPATHERAPIE : Non Oui
- Test L-dopa : Fait Non fait
 - Amélioration initiale : Non Oui
 - Si oui : durée (ans) :
 - Dose :
 - Si pas d'amélioration précisez l'observance du traitement : Bonne Mauvaise
 - Complications motrices : Fluctuations motrices Phénomène ON-OFF
 - Dyskinésie
 - ANTICHOLINERGIQUES : Non Oui
 - Dose : Durée :
 - AUTRES A PRECISER :

SCORE CLINIQUE

- SCORE UPDRS (annexe 1) :
- STADES DE HOEHN ET HAHR (annexe 2) :
- SCORE DE QUALITE DE VIE SF36 (annexe 3) :

Arbre Généalogique

Important :

1/Indiquer le sujet prélevé par une étoile, 2/ Dessiner l'arbre même s'il n'y a pas d'antécédent familiaux, 3/ Préciser s'il existe une consanguinité dans la famille

ECHELLE MOTRICE UDPRS

Examen moteur

1 Parole

- 0 = Normale
- 1 = Légère perte d'expression de la diction et/ou du volume vocal
- 2 = Voix monotone, bredouillée mais compréhensible : altération modérée
- 3 = Altération marquée, difficile à comprendre
- 4 = Incompréhensible

2 Expression faciale

- 0 = Normale
- 1 = Hypomimie légère, semble avoir un visage normalement impassible
- 2 = Diminution légère, mais franchement anormale de l'expression faciale
- 3 = Hypomimie modérée : lèvres entrouvertes
- 4 = Masque facial ou faciès figé avec perte importante ou totale de l'expression faciale : lèvres entrouvertes (0,6 cm ou plus)

3 Tremblement de repos

- 0 = Absent
- 1 = Léger et rarement présent
- 2 = Tremblement de faible amplitude mais persistant, ou d'amplitude modérée mais présent seulement de façon intermittente
- 3 = Tremblement modéré en amplitude et présent la plupart du temps
- 4 = Tremblement d'amplitude marquée et présent la plupart du temps

4 Tremblement d'action ou tremblement postural des mains

- 0 = Absent
- 1 = Léger, présent lors de l'action
- 2 = Modéré en amplitude, présent lors de l'action
- 3 = Modéré en amplitude, tant lors du maintien postural que lors de l'action
- 4 = Amplitude marquée : gêne l'alimentation

5 Rigidité (évaluée lors des mouvements passifs des principales articulations avec un malade relâché, en position assise. Ne pas tenir compte de la roue dentée)

- 0 = Absente
- 1 = Minimale ou apparaissant lors des manœuvres de sensibilisation
- 2 = Légère à modérée
- 3 = Marquée, mais la plupart des mouvements peuvent être effectués aisément
- 4 = Sévère, les mouvements sont effectués difficilement

6 Tapotement des doigts (le malade fait des mouvements rapides et de larges amplitudes du pouce sur l'index, chaque main séparément)

- 0 = Normal
- 1 = Ralentissement léger et/ou réduction d'amplitude
- 2 = Modérément perturbé, se fatigue nettement et rapidement peut avoir d'occasionnels arrêts du mouvement
- 3 = Sévèrement perturbé. Hésitation fréquente au démarrage du mouvement ou arrêt en cours de mouvement
- 4 = Peut à peine effectuer la tâche

7 Mouvements des mains (le malade ouvre et ferme rapidement les mains avec la plus grande amplitude possible, chaque main séparément)

- 0 = Normal
- 1 = Ralentissement léger et/ou réduction d'amplitude
- 2 = Modérément perturbé, se fatigue nettement et rapidement peut avoir d'occasionnels arrêts du mouvement
- 3 = Sévèrement perturbé. Hésitation fréquente au démarrage du mouvement ou arrêt en cours de mouvement
- 4 = Peut à peine effectuer la tâche

8 Mouvements alternatifs rapides des mains (mouvements de prosupination des mains verticalement ou horizontalement, avec la plus large amplitude possible, les deux mains séparément)

- 0 = Normal
- 1 = Ralentissement léger et/ou réduction d'amplitude
- 2 = Modérément perturbé, se fatigue nettement et rapidement peut avoir d'occasionnels arrêts du mouvement
- 3 = Sévèrement perturbé. Hésitation fréquente au démarrage du mouvement ou arrêt en cours de mouvement
- 4 = Peut à peine effectuer la tâche

ECHELLE MOTRICE UDPRS

9 *Agilité de la jambe (le patient tape le talon sur le sol de façon rapide en soulevant toute la jambe. L'amplitude doit être d'environ 7,5 cm en position assise)*

- 0 = Normal
- 1 = Ralentissement léger et/ou réduction d'amplitude
- 2 = Modérément perturbé, se fatigue nettement et rapidement peut avoir d'occasionnels arrêts du mouvement
- 3 = Sévèrement perturbé. Hésitation fréquente au démarrage du mouvement ou arrêt en cours de mouvement
- 4 = Peut à peine effectuer la tâche

10 *Se lever d'une chaise (le patient essaye de se lever d'une chaise à dos droit en bois ou en métal, les bras pliés devant la poitrine)*

- 0 = Normal
- 1 = Lentement ou a besoin de plus d'un essai
- 2 = Se pousse sur les bras du siège
- 3 = Tend à tomber en arrière et peut essayer plus d'une fois mais peut se lever sans aide
- 4 = Incapable de se lever sans aide

11 *Posture*

- 0 = Normalement droite
- 1 = Pas tout à fait droite : posture légèrement fléchie : cette attitude peut être normale pour une personne plus âgée
- 2 = Posture modérément fléchie, nettement anormale : peut être légèrement penché d'un côté
- 3 = Posture sévèrement fléchie avec cyphose : peut être modérément penchée d'un côté
- 4 = Flexion marquée avec posture anormale

12 *Démarche*

- 0 = Normale
- 1 = Marche lentement, peut traîner les pieds et faire des petits pas, mais sans festination ni propulsion
- 2 = Marche avec difficultés, mais nécessite peu ou pas d'aide : peut avoir un peu de festination ou des petits pas ou une propulsion
- 3 = Perturbations sévères de la marche, nécessitant une aide
- 4 = Ne peut pas marcher du tout, même avec aide

13 *Stabilité posturale (réponse à un déplacement postérieur soudain produit par une poussée sur les épaules alors que le patient est debout, les yeux ouverts et les pieds légèrement écartés)*

- 0 = Normal
- 1 = Rétropulsion mais rétablit l'équilibre sans aide
- 2 = Absence de réponse posturale : peut tomber s'il n'est pas retenu par l'examineur
- 3 = Très instable, tend à perdre l'équilibre spontanément
- 4 = Incapable de se tenir sans aide

14 *Bradykinésie corporelle et hypokinésie (combinant la lenteur, l'hésitation, la diminution du ballant des bras, l'amplitude faible et la pauvreté des mouvements en général)*

- 0 = Aucune
- 1 = Lenteur minimale, donnant aux mouvements un caractère délibéré, pourrait être normal pour certaines personnes. Possibilité d'une réduction d'amplitude
- 2 = Degré léger de lenteur et de pauvreté du mouvement qui est nettement anormal. De plus, une certaine réduction d'amplitude.
- 3 = Lenteur modérée, pauvreté et petite amplitude du mouvement
- 4 = Lenteur marquée, pauvreté et petite amplitude du mouvement

ECHELLE MOTRICE UDPRS

		ON	OFF
1 - Parole			
2 - Mimique			
3 - Tremblement de repos	MSD		
	MSG		
	Face		
	MID		
	MIG		
4 - Tremblement de posture	MSD		
	MSG		
5 - Rigidité	MSD		
	MSG		
	Cou		
	MID		
	MIG		
6 - Doigts	D		
	G		
7 - Mains	D		
	G		
8 - Marionnettes	G		
	D		
9 - Pieds	D		
	G		
10 - Lever			
11 - Posture			
12 - Marche			
13 - Stabilité			
14 - Akinésie			
TOTAL			
Dose de L-DOPA: _____			
Délai par rapport à la dernière prise de L-DOPA: _____			

STADES DE HOEHN ET YAHR

Stade 0: Pas de signe de la maladie.

Stade 1 : Atteinte unilatérale avec handicap fonctionnel minime ou nul.

Stade 1,5 : Maladie unilatérale, plus atteinte axiale.

Stade 2 : Atteinte bilatérale ou axiale, sans altération de l'équilibre.

Stade 2,5 : Atteinte bilatérale légère à modérée ; une certaine instabilité posturale.
Physiquement autonome.

Stade 3 : Atteinte bilatérale modérée ; apparition d'une altération de l'équilibre, mise en évidence lorsque le malade change de direction ou lorsqu'on le pousse alors qu'il se tient debout, pieds joints et yeux fermés. A ce stade, il présente une certaine gêne fonctionnelle dans ses activités mais peut poursuivre son travail, selon son emploi.

Stade 4 : Développement complet de la maladie qui entraîne une incapacité sévère. Le malade peut encore se tenir debout et marcher sans aide mais avec de grandes difficultés.

Stade 5 : Sans assistance, le malade ne peut se déplacer qu'en chaise roulante ou est alité.

تقييم موجز للحالة الذهنية

السن للولقب :
للمستوى التعليمي :
رتيخ الفحص :

تديد الازمان (نقطة لى كل جواب صحيح، المجموع 5 نقط لى القصى) :

الجمعة	في	اليوم	ثمنوة
؟	<input type="checkbox"/>	؟
؟	لشهر	في	قداش
؟	<input type="checkbox"/>
؟	شهر	نا	في
؟	<input type="checkbox"/>
؟	فصل	نا	في
؟	<input type="checkbox"/>
؟	عام	نا	في
؟	<input type="checkbox"/>

تديد الازمان (نقطة على كل جواب صحيح، المجموع 5 نقط على القصى) :

؟	نا	في	صيطار،	في	نا	بالصة	؟
؟	<input type="checkbox"/>
؟	نا	في	طبق	في	نا	؟
؟	<input type="checkbox"/>
؟	نا	في	مينة	في	نا	؟
؟	<input type="checkbox"/>

▪ اجزا في لئا ولية (الاجبة بقولة اذا كلات تتغلق بالجهة) ؟
□.....

▪ اجزا في لئا نولة بالدد) ؟
□.....

ال حفظ (3 نقت على القصى) ؟
□.....

▪ ماش فيقولك 3كلماتتعاو دهب عدي "قارص" هفتاح" ، "كورة". أعيبلق اعلكلمات
ضىي خطها لامريض دون أنتج اوز إل عاقتالث مرات. عن دم اي يجب لامريض، يجب أنتتوتلر
لكلماتتسرعة، كلم هي كلثلية. نرن دل ف نقطة لغى لكل كلمة صيحة، الم جموع نقت لغى
ألقصى.

□.....

نالباه لئ حساب :) 5 رقت عل ألقصى

إطرح لئحي (7 من 100 و لئت ماشي، ضى العملي فل خامسة بقطة لغى لكل عملي صيحة،
لم جموع نقت على الأصى)
□

إذا كان لامريض لاي يبل حساب، ععد نك نطلب منه أنيس ردال حروف الكونة لكلمة مدرسة
لباعكس) مم ألخ على الأول نقتة على كل حرف صيحة.

لذاكرة :) نقت لغى ألقصى

▪ ذكرني الثالث حاجات لئتي لئت تلك
الساعة.....
□

نقتة على كل جواب صيح الم جموع نقت لغى الأصى

اللغ-ة :) ال ملك الف هم ال لتبلة لل قراءه :) نقت على الأصى

▪ أشنوة هذا (اره ساعة يدوية) نقتة
واحدة).....
□

▪ أشنوة هذا (اره قلم، تشيلو) نقتة
واحدة).....
□

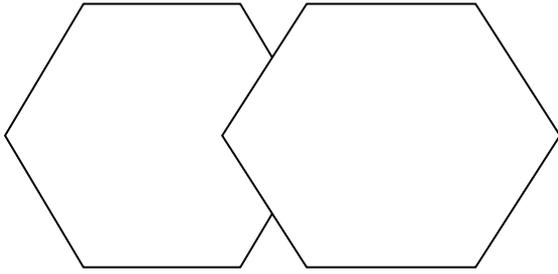
▪ تراه عاود الالم لاي ماش زقل هولك " لا لفاش ولا علاش" نقطة واحدة).....

▪ قرأ وإعمل نهذ) إلي ملقوب في الورقة " غمض رعيك" نقطة واحدة).....

أكتب جملة في يدك مفهومة (إلي تحب لحيه بق الورقة هذه) نقطة واحدة).....

▪ أعط لي ايض الثالث أو امرلك اليه : خذ لورقة هذي يدك الي بي نث مطويها على البعة ثم حطها في يجبك نقطة على كل مرحلة، ثالث نقط على الأقصى).....

نقل الرسم هذا على الورقة نقطة واحدة).....



لم جموع) لحي 30 نقطة)

.....



Etude clinique et génétique de la maladie de Parkinson dans la population Tunisienne

Sawssan Ben Romdhan

Résumé : La Tunisie a vu une grande variété d'envahisseurs et de migrants allant de la population berbère autochtone aux Arabes et Européens. Cette région est caractérisée par les grands pedigrees, les faibles taux de migration et les taux élevés de consanguinité qui augmentent le risque des maladies autosomiques récessives y compris les maladies neuro-dégénératives. Dans notre pays, la prévalence de la maladie de Parkinson (MP) augmente jusqu'à 43/100000 personnes et devient un problème de santé majeur. La MP est une maladie neuro-dégénérative dont la forme idiopathique débute en moyenne vers 60 ans. Au cours des 20 dernières années, plusieurs gènes ont été identifiés chez des patients qui ont développé leurs premiers symptômes avant l'âge de 40 ans. Notre étude a montré que la structure génétique de la MP en Tunisie est distincte des autres populations, puisque plus de 50% des cas avaient une origine génétique. La fréquence des formes monogéniques chez les patients avec un âge de début tardif de la MP était relativement élevée et similaire à celle des patients avec un âge de début précoce. Ces formes étaient essentiellement dues à la mutation *LRRK2*-p.G2019S (identifiée chez 42.8% des cas) qu'on a pu confirmer qu'elle est une mutation fondatrice apparue chez un seul ancêtre commun d'origine berbère. Sur le plan clinique, nous avons montré que les patients porteurs de la mutation *LRRK2*-p.G2019S avaient un âge de début de la MP plus précoce mais avec un phénotype plus bénin que celui des formes idiopathiques. Une deuxième mutation fondatrice d'origine berbère (p.Q456*) a été identifiée sur le gène *PINK1*. La fréquence élevée inhabituelle des mutations sur ce gène peut être limitée à la population tunisienne berbère. Nos résultats ont aussi confirmé que les mutations sur le gène *PARK2* et sur le gène *GBA* ne constituent pas un facteur de risque fréquent de la MP en Tunisie. En plus de ces mutations sur les gènes connus, nous avons identifié 4 nouveaux gènes candidats dans la MP. Cette structure génétique particulière de la MP en Tunisie pourrait être principalement le résultat de l'origine historique berbère de notre population Tunisienne.

Mots clés: La maladie de Parkinson, structure génétique, caractérisation clinique.